МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Факультет біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
_____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)
«___» _____ 2020 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)
«___» _____ 2020 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Біосинтез рибофлавіну Bacillus subtilis

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2
Шурхал Богдан Володимирович _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Удимович Віктор Миколайович _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)
_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Гавриленко О.А. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Факультет біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Пирог Т.П.
«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Шурхалу Богдану Володимировичу
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез рибофлавіну Bacillus subtilis

керівник роботи Удимович В.М., асистент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи
Об'єм ферментера 2 м^3, коефіцієнт заповнення 0.6, продуцент *Bacillus subtilis* GM44/pMX45 , назва готового продукту – вітамін B_2(рибофлавін)

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити Характеристика цільового продукту, обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, біосинтез цільового продукту, обґрунтування вибору технологічної схеми, матеріальний баланс і розрахунок обладнання, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва, автоматизація ділянки виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу
Апаратурна та технологічна схема«Культивування *Bacillus subtilis* для одержання рибофлавіну», схема автоматизованої ділянки виробництва.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	**23.04.2020**	**31.05.2020**

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1.Характеристика цільового продукту	20.03.2020-25.03.2020	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	25.03.2020-01.04-2020	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування,	01.04.2020-10.04.2020	
4	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту,	10.04.2020-20.04.2020	
5	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	20.04.2020-01.05.2020	
6	РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	01.05.2020-05.05.2020	
7	РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання	05.05.2020-10.05.2020	
8	РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми,	10.05.2020-15.05.2020	
9	РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	15.05.2020-23.05.2020	
10	РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва.	23.05.2020-31.05.2020	

Здобувач _____ _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дана курсова робота присвячена розробці технології виробництва рибофлавіну за допомогою продуцента *Bacillus subtilis* та його здатності синтезувати рибофлавін на середовищі з сахарозою, зерновим та дріжджовим екстрактами.

Було розроблено технологічну схему біосинтезу рибофлавіну новим продуцентом — штамом *Bacillus subtilis* GM44/pMX45, який за 70 годин синтезує 21 г/л рибофлавіну. Порівняно з іншими штамами-продуцентами рибофлавіну (*Eremothecium Ashbyii* та *Ashbyii gossypii*10895) *Bacillus subtilis* GM44/pMX45 має найменшу умовну вартість і росте на дешевому середовищі, що є дуже важливо в промисловості. Технологічна схема включає допоміжні роботи та технологічний процес. Допоміжні роботи включають в себе приготування та стерилізацію допоміжних розчинів та поживних середовищ для інокуляторів різних об`ємів. Технологічний процес складається з 3 стадій підготовки посівного матеріалу (в колбах на качалках і інокуляторах різних об`ємів) та виробничого культивування в ферментері об`ємом 2 $м^3$.

Для контролю виробництва були використані такі методи: мікробіологічний контроль; визначення біомаси ваговим методом; метод визначення якості рибофлавіну, який заснований на кількісному визначенні люміфлавіну та вимірюванні оптичної густини; визначення концентрації амінного азоту мідним

Курсова робота складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури , який складається з 50 літературних джерел. Додатки. Обсяг дипломного проекту – 114 сторінок. Містить 10 малюнків, 20 таблиць, апаратурну та технологічну схеми.

Ключові слова: *Bacillus subtilis* GM44/pMX45*, рибофлавін, B_2, поживне середовище, виробниче культивування*.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....3
ВСТУП.....6
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....14
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....17
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....18
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....19
3.1. Потреба у цільовому продукті.....19
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....21
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....22
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....23
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.....27
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....27
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....29
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....30
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....30
5.1.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера.....30
5.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....31
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....34
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....42
5.2. Обгрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....44
5.2.1. Обгрунтування стадії виділення цільового продукту.....45
5.2.2. Обгрунтування способу приготування кінцевої форми продукту.....46

РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання. 48
РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання 68
РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми.....74
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва 93
РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва.....110
ЛІТЕРАТУРА
ДОДАТКИ

ВСТУП

Офіційно визнана назва вітаміну B_2 - рибофлавін.

Назви, що використовувались раніше: вітамін G, лактофлавін, овофлавін, гепатофлавін, вердофлавін та урофлавін. Більшість з них вказують на джерело, з якого даний вітамін був виділений - молоко, яйця, печінка, рослини та сеча.

У 1879 році Бліт виділив з сироватки лактохром - жовту, водорозчинну флуоресцуючу речовину[1].

Через півстоліття - у 1932 році -Варбург та Крістіан виділяють жовтий фермент з пивних дріжджів та припускають, що він відіграє важливу роль у клітинному диханні. Через рік Кун, Георгі та ВагнерЙорег виділяють з яєчного білка та сироватки жовтий кристалічний пігмент, який стимулює ріст клітин, та ідентифікують його як вітамін B_2. Історія відкриття:

У 1934 р. група Куна в Хейдельберзі та група Каррера в Цюріху синтезують чистий рибофлавін.

1935 р. - відкриття Гільєрмоном явища понадсинтезу вітаміну В2 міцеліальними дріжджеподібними грибами.

1937 р. - фармацевтична рада Американської медичної асоціації присвоює вітаміну назву «рибофлавін».

1941 р. - група Себреля демонструє клінічні прояви нестачі рибофлавіну в експериментах на волонтерах.

1968 р. - Глатцель та його група пропонують використовувати тест вимірювання активності глутатіонредуктази еритроцитів для визначення статусу рибофлавіну[1]. Рибофлавін синтезується більшою частиною вищих рослин і багатьма мікроорганізмами, включаючи бактерії, дріжджі та гриби.

Тварини не здатні до самостійного синтезу рибофлавіну, і їхня потреба в ньому задовольняється мікрофлорою шлунково-кишкового тракту та їжею. Рибофлавін, або вітамін B_2, є попередником флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) — кофакторів для широкого кола ферментів метаболізму, має комерційну цінність як домішка в харчовій промисловості[2]. Кілька видів флавіногенних мікроорганізмів застосовуються в промисловості для виробництва рибофлавіну за допомогою ферментації.

Промислове виробництво рибофлавіну здійснюється трьома способами: хімічним, мікробіологічним і змішаним синтезом. Останній включає мікробний синтез рибози з подальшою хімічною модифікацією її в рибофлавін[1]. Рибофлавін виробляється різної якості: більш очищений, призначений для харчування та медичних цілей, і менш очищений, призначений для ринку кормів для тварин. Для фармацевтичних рецептур рибофлавін синтезують хімічно, в той час як кормові концентрати для птахів і домашньої худоби отримують ферментаційно, використовуючи *Eremothecium ashbyi* або *Ashbya gossypii*. Проте додаткові етапи виділення та очистки дають можливість з рибофлавіну, отриманого ферментаційно, одержати препарат медичної якості[4].

Актуальність: Рибофлавін є одним з найбільш широко розповсюджених вітамінів. Він міститься у всіх тваринних та рослинних клітинах, застосовується в сільському господарстві. Хоча нестача у рибофлафіні в розвинутих країнах зустрічається і не часто, проте в Україні на сьогодні у зв’язку зі складною соціально-економічною ситуацією населення не завжди має можливість харчуватися якісними продуктами з достатньою кількістю рибофлавіну, що може призводити до погіршення стану здоров’я, яка зустрічається і нині, тому мікробіологічний синтез рибофлавіну є актуальним на сьогодні. На сьогоднішній день основним виробником вітамінів в Україні є «Київський вітамінний завод», який майже немає конкурентів в Україні, окрім препаратів що імпортуються із-за кордону.

Тому виробництво рибофлавіну за допомогою *Bacillus subtilis* GM44/pMX45 є актуальним на сьогоднішній день.

Новизна: Вперше в Україні пропонується використовувати *Bacillus subtilis* GM44/pMX45 який синтезує 21 г/л рибофлавіну протягом 70 годин, а також розроблено принципову технологічну схему отримання рибофлавіну[5].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОФЛАВІНУ

Рибофлавін, або вітамін B_2, є незамінним компонентом харчування людей та тварин, оскільки він служить як попередник коферментів флавінмононуклеотида (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), які беруть участь в окиснювальному метаболізмі та інших процесах. Промислове виробництво рибофлавіну використовується у харчовій промисловості – у вигляді харчової добавки (жовтий барвник Е101); у фармацевтичній промисловості для лікування захворювань нервової системи, шкіри та очей. Більше 80 % рибофлавіну використовується у сільському господарстві як кормова добавка для тварин (свиней та птиці).

Вперше рибофлавін виділили у 1879 році із сироватки молока як жовту водорозчинну флуоресцуючу речовину і назвали її лактохромом. У 1933 р. вчені Р. Кун та П. Каррер виділили з яєчного білка та сироватки жовтий кристалічний пігмент та назвали його як вітамін B_2. Також Р. Кун з'ясував, що рибофлавін є важливим ростовим фактором. Основними джерелами в раціоні харчування є молоко та м'ясні продукти, а також зернові культури, жирна риба, фрукти та овочі (особливо темно-зелені овочі) містять досить високу концентрацію рибофлавіну.[1]

Добова потреба вітаміну B_2 для чоловіків становить 1,3 мг, для жінок – 1,1 мг. Цей вітамін надходить до організму разом з їжею (рибофлавіном збагачені такі продукти, як молоко, яєчний жовток, печінка) або в результаті діяльності мікрофлори кишечника. Дефіцит рибофлавіну спостерігається в тих популяціях, де є нестача молочних і м'ясних продуктів[1].

В медицині вітамін B_2 застосовують у вигляді вітамінних препаратів при недостачі його в раціоні людини, а також у вигляді ін'єкцій ФМН та ФАД при патологіях, пов'язаних з порушенням обміну флавінових нуклеотидів. ФМН і ФАД застосовують у лікуванні дистрофії сітківки ока, а також при захворюваннях печінки та підшлункової залози[6].

Входить до складу вітамінних комплексів, що застосовують для лікування катаракти, мігрені, малярії та інших захворювань шкіри, очей та нервової системи. Дефіцит рибофлавіну може спричиняти підвищення концентрації гомоцистеїну в плазмі крові, що пов’язано з підвищеним ризиком серцево-судинних захворювань. Дефіцит може також викликати нічну сліпоту та порушення в метаболізмі заліза[1].

Вітаміном B_2 збагачують деякі сорти білого хліба. Серед похідних ізоаллоксазинів є з'єднання, що мають протипухлинну та протизапальну дію[6].

1.1. Фізико-хімічні властивості рибофлавіну

1.1.1. Хімічна структура рибофлавіну

Рибофлавін (7,8 - диметил - 10 - (1' - D - рибітил - ізоаллоксазин) складається з гетероциклічної ізоаллоксазинової системи, що представлена трьома конденсованими циклами: ароматичним, піразиновим і піримідиновим. До азоту піразинового кільця приєднується спирт рибітол (Рис. 1.1). Рибофлавін функціонує в коензимних формах, що представлені його фосфорними ефірами – ФМН (рибофлавін-5-фосфат) та ФАД[6].

Рибофлавін повинен містити не менше 98,0 % і не більше 101,0 % (7,8 - диметил - 10 - [(2S, 3S, 4R) - 2,3,4,5 - тетрагідроксипентил] - 3H, 10H - бензоптеридин - 2,4 - діону, у перерахунку на суху речовину[7].

Назва «рибофлавін» пов’язана з тим, що до складу молекули рибофлавіну входить спирт рибітол, та через те, що речовина має жовтий колір.

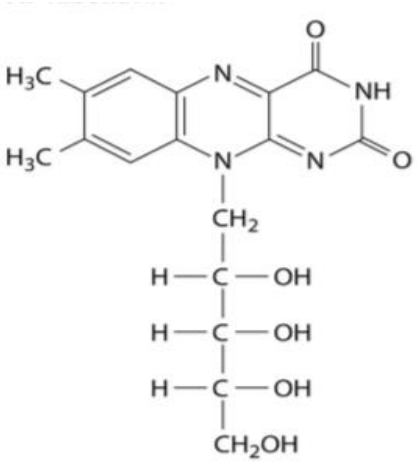


Рис. 1.1 Хімічна структура рибофлавіну

1.1.2. Опис та розчинність рибофлавіну

Рибофлавін кристалізується у вигляді помаранчево-жовтих голок з температурою плавлення + 282°С з розкладанням. Він нерозчинний в жирах та в розчинниках жирів, слаборозчинний у воді. При температурі + 27,5°С насичений водний розчин містить 0,012 % рибофлавіну, при + 40°С – 0,019 %, а при + 100°С – 0,23 %. У лужному середовищі рибофлавін краще розчинний, ніж у нейтральному. Слаюко розчинний в нормальному, бутиловому, аміловому, етиловому та метиловому спиртах, помірно розчинний у льодяній оцтовій та мурашиній кислотах. Добре розчинний у соляній кислоті

В нейтральних водних розчинах має зеленувато-жовте забарвлення, зумовлене наявністю азометинової групи, з інтенсивною жовто-зеленою флуоресценцією, яка зменшується до зникнення як у кислому, так і в лужному середовищі (максимум при pH 6 – 7). Рибофлавін в лужному середовищі переходить у люміфлавін, розчинний в хлороформі, і не володіє біологічними властивостями вітаміну B_2[1].

Рибофлавін нерозчинний в жирах та в розчинниках жирів, слабо розчинний у воді. При температурі 27,5ºС насичений водний розчин містить 0,012% рибофлавіну, при 40ºС – 0,01944%, а при 100ºС – 0,23%. У лужному середовищі рибофлавін краще розчинний ніж у нейтральному. Слабко розчинний в нормальному бутиловому, аміловому, етиловому (0,0045% при

27,5ºС) та метиловому спиртах. Рибофлавін помірно розчинний у льодяній оцтові та мурашиній кислотах. Добре розчинний у соляній кислоті[1].

1.1.3. Умови зберігання рибофлавіну

Рибофлавін зберігають у повіторнепроникному контейнері, у захищеному від світла місці, оскільки рибофлавін – світлочутлива речовина. Світлочутливість зумовлена наявністю в боковому ланцюзі в положенні 2 вільної гідроксильної групи. Під дією світла в нейтральному та кислому середовищі рибофлавін перетворюється на біологічно неактивний люміхром, який має сильну блакитну флуоресценцію. Прямі сонячні промені швидко руйнують рибофлавін при будь-якому значенні pH. Найбільш пагубну дію на рибофлавін мають промені світла з довжиною хвилі 440 нм[1].

Субстанцію рибофлавіну фасують в ламіновані алюмінієві мішки по 5 кг.

1.1.4. Біологічна роль рибофлавіну

Рибофлавін функціонує в 2 коензимних формах, що є його фосфорними ефірами: рибофлавін-5-фосфатом (ФМН) та флавінаденіндинуклеотидом (ФАД), а також у вигляді моно- та динуклеотидних форм – аналогів рибофлавіну.

Рибофлавін діє як посередник при переносі електронів у різних окисно-відновних реакціях. Він бере участь у великій кількості реакцій метаболізму вуглеводів, жирів та білків, а також в реакціях дихального ланцюга. Коферменти рибофлавіну грають важливу роль в перетворенні піридоксину (вітамін B_6) та фолієвої кислоти в їх активні коферментні форми; та в перетворенні триптофану в ніацин (нікотинова кислота або вітамін B_3)[1].

1.1.5. Метаболізм рибофлавіну в організмі людини

Жоден вітамін не функціонує в тому вигляді, в якому він потрапляє з їжею. Перш ніж реалізувати свої функції, він має пройти ряд певних етапів за допомогою спеціальних транспортних, ферментних та рецепторних білків.

Флавіни, що потрапляють з їжею, звільняються у шлунку під дією кислот і потім всмоктуються у верхній частині тонкого кишечнику за допомогою транспортного механізму за участю жовчних солей. В клітинах слизистої

оболонки кишечнику рибофлавін перетворюється в коферментну форму ФМН з подальшим зв’язуванням в системі транспорту з плазматичним альбуміном та переноситься у печінку, де перетворюється в іншу коферментну форму ФАД зв’язується зі спеціальними білками, які називаються флавіновими протеїнами.

У тканини рибофлавін потрапляє головним чином у формі ФАД, але концентрація його не висока і він не запасається там у великій кількості. Печінка – головний орган зберігання – містить близько третини загальної кількості рибофлавіну в організмі. Рівень вмісту рибофлавіну в плазмі крові відображає кількість рибофлавіну, що потрапляє з їжею і в нормі становить 30 – 40 мкг/л. Значна концентрація рибофлавіну спостерігається в тканинах сітківки, але його функція там невідома. Виділення рибофлавіну здійснюється головним чином з сечею, якій він придає жовтий колір. Невелика кількість рибофлавіну також виділяється разом з потом та жовчю. Рибофлавін, що знаходиться в калі, є головним чином результатом діяльності кишкових бактерій. У жінок в період годування груддю близько 10 % отриманого рибофлавіну виділяється в молоко[1]

РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента

Як біологічні агенти для біотехнологічного виробництва рибофлавіну широко використовують мікроорганізми, які належать до різних таксономічних груп. Це такі види, як *Candida famata, Arthrobacter globifornis, Clostridium acetobutylicum, Micrococcus glutamicus, Eremothecium ashbyii, Ashbya gossypii, Aspergillus niger, Mycobacterium stegmatis, Pichia guilliermondii, Bacillus subtilis* [8].

Природні штами B.subtilis синтезують рибофлавін тільки в кількості, необхідній для підтримки власної життєдіяльності і зовсім не виділяють його в середовище. У ВНДІ генетики та селекції промислових мікроорганізмів під керівництвом Степанова А.І. створений промисловий продуцент рибофлавіну на основі рекомбінантного штаму B.subtilis. Спочатку були отримані мутанти, стійкі до розеофлавіну – структурного аналогу рибофлавіну. Дані мутанти володіли здатністю виділяти у культуральне середовище до 10мг/л вітаміну. На другому етапі були отримані мутації в гені-регуляторі, що кодує регуляторний білок, здатний впливати на експресію рибофлавінового оперону. Це дозволило отримати штам, що продукував до 100мг/л вітаміну. На наступному етапі були отримані мутації стійкості до аналогу пурину, що також призвело до росту продукції рибофлавіну. Наступним етапом було створення рекомбінантного штаму B. subtilis. Генно-інженерними методами була сконструйована рекомбінантна плазміда pMX45, яка несла на собі розрегульований рибофлавіновий оперон B. subtilis та ген стійкості до еритроміцину[1]

Ця плазміда була внесена в штам B. subtilis, що за рахунок збільшення кількості копій рибофлавінового оперона дало можливість отримувати до 21 г/л вітаміну на комплексних поживних середовищах.

В результаті подальших селекційних робіт були отримані мутанти, ауксотрофні на аденіну, та мутанти з порушеною транскетолазою та глутаматсинтетазою[9].

2.2. Обгрунтування вибору умов культивування

Спосіб культивування *Bacillus subtilis* GM44/pMX45 обираємо на основі фізіолого-біохімічних ознак продуцента. Тому важливим є визначення таких умов:

I. Для культивування *Bacillus subtilis* GM44/pMX45 необхідно створити аеробні умови, так як продуцент є аеробом. Для забезпечення таких умов використовують барботер для подачі кисню та перемішуючий пристрій для інтенсифікації масообмінних процесів.

II. Існують два способи промислового культивування мікроорганізмів: ***поверхневий*** і ***глибинний.*** Перший спосіб використовують для культивування переважно цвільових грибів, які утворюють міцелій на поверхні твердого або рідкого субстрату. Щоб збільшити поверхню для росту грибів, у культуральну рідину додають пшеничні висівки (або відходи перероблення іншого зерна), зволожені й стерилізовані. Теплота, що виділяється в процесі росту грибів, відводиться продуванням кондиційованого повітря. Зріла культура грибів внаслідок обволікання частинок висівок міцелієм має вигляд щільної повстеподібної маси.

Дріжджі та бактерії не потребують наявності поверхні поділу фаз, тому їх вирощують в усьому об’ємі поживного середовища, тобто глибинним способом. Щоб забезпечити культивування лише потрібних мікроорганізмів, слід реально дотримуватися стерильних умов[10] .

Обираємо глибинний спосіб культивування, так як цей спосіб має ряд очевидних переваг, дозволяє значно скоротити виробничі площі; виключити

тяжку ручну роботу; поліпшити гігієну праці; спростити механізацію та автоматизацію виробництва; робить можливість переходу на безперервний спосіб культивування [11] .

Глибинне культивування може здійснюватися в різних типах ферментерів. В сучасних ферментерах численні параметри культивування (pH, температура, швидкість, аерація, обертання, переміщування тощо) контролюються автоматично [11] .

При глибинному способі культивування більш раціонально використовуються поживні речовини середовищ, що дає можливість значно скоротити відходи виробництва та отримувати препарати вітамінів з меншим вмістом домішок [11] .

Для культивування нашого продуцента поверхневий спосіб культивування є недоцільним так як він має ряд недоліків: недосконаліть конструкції застосовуваного обладнання, мала механізація технологічних процесів, проведення процесу в нестерильних умовах [11] .

III. Виробництво рибофлавіну може здійснюватись як безперервним так і періодичним способом. Періодичний спосіб культивування продуцентів вітамінів найбільш часто вживаний в промисловості, складається із підготовки компонентів поживних середовищ, їх стерилізації і самого процесу культивування, який починається після засіву стерильного поживного середовища посівним матеріалом [11] . Також біосинтез рибофлавіну здійснюється у періодичному процесі, тому що максимальний синтез вітаміну відбувається у стаціонарній фазі росту продуцента. Отже, тривале перебування штаму-продуцента в експоненційній фазі росту, яке спостерігається за безперервного культивування, є недоцільним. При безперервному режимі культивування культура постійно перебуває в експоненційний фазі, що не дає змоги одержати максимальну кількість рибофлавіну у культуральній рідині .

При даних умовах можливий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами, тому необхідно забезпечити асептичні умови під час

отримання ксиланази. Для запобігання контамінації проводиться стерилізація обладнання та компонентів поживних середовищ для культивування.

Отже, культивування продуцента рибофлавіну штамом *Bacillus subtilis* GM44/pMX45 здійснюється в аеробних умовах, глибинним способом у періодичному режимі протягом 70 годин при дотриманні усіх правил асептики.

Склад поживного середовища

Для виробничого культивування *Bacillus subtilis* з метою одержання рибофлавіну буде використовуватись поживне середовище наступного складу, г/л

Дріжджовий екстракт – 32

Сахароза – 20

Зерновий екстракт – 10,8

K_2HPO_4 – 9

Сечовина – 6

KH_2PO_4 – 3

$MgSO_4$ x $7H_2O$ – 0,6

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

Bacillus subtilis (сінна паличка) – безбарвні колонії або сірувато-білі, трохи зморшкуваті або утворюють бархатистий наліт, край хвилястий, розгалужений, 33 щільно прилягає до агарового середовища. Палички короткі й тонкі завдовжки 3 – 6 мкм. Спори овальні, розташовані ексцентрально[12].

Рис.1 Палички *Bacillus subtilis*

Фізіолого-біохімічні ознаки

1. Відношення до кисню – аероб,
2. Оптимальна температури – (38±2) °С.
3. Оптимальна pH (7-7,2)

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Домен:Бактерії (Bacteria)

Тип: Firmicutes

Клас: Bacilli

Ряд: Bacillales

Родина:Bacillaceae

Рід: Bacillus

Вид: Bacillus subtilis[12].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Рибофлавін, також вітамін B_2, або Лактофлавін — вітамін, що бере участь в процесах росту, пластичному обміні; регуляторно впливає на стан центральної нервової системи, процеси в рогівці, кришталику ока, забезпечує світловий і кольоровий зір; входить до складу ферментів, які регулюють важливі етапи обміну речовин, позитивно впливає на стан шкіри та слизових оболонок, функцію печінки та кровотворення[1].

Рибофлавін дуже важлива для людини речовина з групи розчинних у воді вітамінів**,** жовтий матеріал, що з легкістю абсорбується, коензим різних біохім. процесів, які перебігають в організмі. Це без перебільшень «вітамін краси», оскільки оптимальна його концентрація в різних органах і системах – запорука належного вигляду нігтів, шкірних і волосяних покривів. Це біоактивна речовина-калоризатор, оскільки визначення її біологічної ролі відбувається за входженням похідних у величезний перелік окислювально-відновних ферментів. Загалом, це ключовий складник підтримки здорового стану людей і тварин. А також це добавка до їжі, зареєстрована під кодом Е101 (харчовий барвник). Відтак логічним є застосування її у фармацевтиці, медицині й косметології, в харчопромі та сільському господарстві[2].

Біологічно активною формою рибофлавіну є флавінаденіндинуклеотид, що синтезується в організмі людини в нирках, печінці й інших тканинах. Інше похідне рибофлавіну — рибофлавін-5-фосфорна кислота зустрічається природному виді в дріжджах. Завдяки їй забезпечується нормальний плин окисно-відновних процесів в організмі.

Рибофлавін входить до складу жовтих пігментів флавінів, які слугують коферментами. Важливий для підтримки нормальної функції ока. Рибофлавін входить до складу зорового пурпуру, захищаючи сітківку ока від шкідливої дії ультрафіолетових променів. Вітамін В2 інтенсифікує процеси обміну речовин в організмі, беручи участь у метаболізмі білків, жирів і вуглеводів[1].

Згідно з статистичними даними, які представлені лише за 2014 рік через складну економічну та політичну ситуацію в Україні, понад 21 % дітей хворіють на кон'юнктивіт, а це близько 8 мільйонів[3].

Рибофлавін випускається у вигляді твердих капсул та знаходиться в основному в комплексі з різними вітамінами, оскільки сама нестача вітаміну B_2 зустрічається досить не часто. На сьогодні на фармацевтичному ринку України рибофлавін представлений у вигляді багатьох комплексних препаратів, серед яких можна відзначити такі як Гексавіт, Комплевіт, Декамевіт, Квадевіт, Неовітам, Ревіт, Супервіт, Ундевіт, Ундетаб, Юнівіт.

Таблиця 1.1

Препарати, що містять рибофлавін на ринку України

№	Назва препарату	Кількість компонентів	Масова частка рибофлавіну, мг	Ціна*
1	Декамевіт	12	10	75
2	Гексавіт	6	2	220
3	Комплевіт	8	15	50
4	Квадевіт	16	2,5	85
5	Неовітам	10	4	100
6	Ревіт	4	1	11

7	Супервіт	18	1,6	95
8	Ундевіт	11	2	16
9	Ундетаб	11	2	25
10	Юнівіт	12	0,3	90

***-** вказана середня ціна по аптеках міста Києва згідно з сайтом https://tabletki.ua на 2019 рік

****-**дані препарати випускаються «Київським вітамінним заводом»

3.2 Розрахунок потужності виробництва

На сьогодні виробництво рибофлавіну представлене у вигляді комплексних препаратів. Зважаючи на те, що в Україні є велика кількість препаратів, що представлені для споживачів, пропонується провести розрахунок виробництва рибофлавіну для його подальшого використання у виробництві вітчизняного препарату «Комплевіт», що сьогодні вироблятьється АТ «Київський вітамінний завод»[4].

Розраховуємо потужність виробництва:

Розраховуємо масу діючої речовини на 1 курс лікування: згідно інструкції препарату «Комплевіт», на один курс лікування, який триває 20 днів, і який рекомендовано повторити через два місяці,тому потрібно 80 пігулок. Маса B_2 в препараті $80 \times 0{,}015 = 1200$ мг $= 1{,}2$ г B_2

На фармацевтичному ринку України представлено щонайменше ще 10 препаратів українського виробництва, що містять рибофлавін. Отже ми можемо визначити теоретичну кількість хворих на коньюктивіт, що будуть користуватися нашим препаратом:

$$8000000 \div 10 = 800000 \text{ хворих}$$

У перерахунку на діючу речовину необхідно одному хворому необхідно 1,2 г рибофлавіну.

Отже, річна потужність підприємства становитиме:

800000×1,2 г = 960000 г= 960 кг/рік.

Продуцент *Bacillus subtilis* GM44/pMX45, що використовується для біосинтезу, продукує 21 г/л рибофлавіну за 70 год[5]

Розраховуємо кількість КР для одержання 960 кг рибофлавіну:

21 г – 1 л

960000 г – Х л;

Х = 45714 л = 45,7 $м^3$ культуральної рідини.

Враховуючи сумарні витрати продукту при виділенні (20%) необхідно одержати таку кількість КР:

Vкр = 45,7 /(1-0.2) = 57,1 $м^3$

Отже, для забезпечення фармацевтичного ринку України вітаміном B_2 потрібно одержати 57,1 $м^3$ культуральної рідини (з урахуванням втрат при виділенні 20%) Vrп .

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

3.3.1. Розрахунок кількості продукту

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 150, тоді кількість продукту на добу (Vд) становитиме:

Gнтд = Gнт/Трд=960/150=6, 4 кг

де Тцф – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (70 год) та час підготовки ферментера до роботи. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (1 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження апарату (1

год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Отже, Тцф = 70+1,5+1+0,5+1+1+2+0,5+1=80 год

Кількість готового препарату за цикл становить:

$$Gцк = Gнтд \cdot Тц/24=6,4 \cdot 80/24=21,3$$

Враховуючи частку сухих речовин в готовому продукті, яка складає 0,9, об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні Есв, м3:

$$Vкр = К1 \cdot Gцк \cdot СРгп/Хкр \cdot (1-Есв)=1,1 \cdot 21,3 \cdot 0,9/21 \cdot (1-0,1)=1,12$$

К1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій. Приймаємо К1 = 1,1.

Кількість циклів становить:

$$Nцк = Gнт/Gцк=960/21,3=45 \text{ циклів}$$

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті крапле виносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10% (Еф).

Вихід препарату у кг з 1 $м^3$ культуральної рідини становить:

$$Ркр = Gцк/Vкр=21,3/1,12=19,1 \text{ кг}$$

геометричний об’єм ферментера має становити:

$$Vг = Vкр/Кзап = 1,12/0,6=1,9 \text{ } м^3,$$

де Кзап = 0,6 – коефіцієнт заповнення.

Знаходимо найближчий за геометричний об’ємом ферментер Vф = 2 $м^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення Кзап = Vф / Vгф = 1120 / 2000 = 0,56 , що не перевищує заданого значення (0,4 – 0,65)

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують Vкр = 1120 л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

Vроб.1 = Vкр/(1-Еф) = 1120/(1-0,1) = 1245 л, де Еф – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом Vроб.1= 1245 л.

Розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (Vф), що становить Vф1 = Vроб.1/Кзап = 1245 /0,6 =2074 л.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер Vсф = 2 $м^3$ (див. додаток 4), уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення Кзап1=Vроб.1/ Vсф = 1245 /2000 = 0,62.

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,4 – 0,65.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

Vпсl = Vроб.1/(1+Хф) = 1245/(1+0,1) = 1131 л, де Хф = 0,1 – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

Vпм1 = Vроб.1– Vпс1 = 1245 – 1131 = 114 л.

Для одержання 114 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

Vроб.2 = Vпм1/(1-Епа) = 114 /(1-0,1) = 127 л.

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити

Vпс2 = Vроб.2/(l+Хпа) = 127 /(1+0,1) = 115 л, де Хпа = 0,1 – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

Vпм2 = Vроб.2 – Vпс2 = 127– 115 = 12 л.

Кількість інокуляту $V_{роб.2}$ = 127 л можна одержати під час культивування продуцента у посівному апараті об'ємом:

Vпа2= Vроб.2/ Кзап = 127 /0,6 = 211 л.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер Vсф = 0,25 $м^3$ (див. додаток 4), уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення

$К_{з2}$=Vроб.2/ Vсф = 127 /250 = 0,5.

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,4 – 0,65.

Для одержання 12 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

Vроб.3= Vпм2/(1-Еін) = 12 /(1-0,1) = 13,3 л.

Кількість посівного матеріалу (доза) для інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища в інокуляторі. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

Vпс3 = Vроб.3/(1+Хін) = 13,3 /(1+0,1) = 12 л, де Хін = 0,1 – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить:

Vпм3 = Vроб.3 – Vпс3 = 13,3 – 12 = 1,3 л.

Кількість інокуляту можна одержати під час культивування продуцента в інокуляторі геометричним об'ємом

Vін3 = Vроб.3/Кзап = 13,3 /0,6 = 22 л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер Vсф = 20 л (див.додаток 4), уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення Кз3=Vроб.3/ Vсф = 13,3 /20 = 0,66.

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,4 – 0,65.

Для одержання 1,3 л посівного матеріалу в колбах враховуємо втрати, які становлять 1%

Vроб.4= Vпм3/(1-Екол) = 1,3 /(1-0,01) = 1,31 л.

Кількість посівного матеріалу Vроб.4 = 1,31 л можна одержати під час культивування продуцента в качалочних колбах об'ємом Vколб = 750 мл та коефіцієнтом заповнення Кзк = 0,2.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитеме:

Nколб = Vпм4/(Vколб × Кзк) = 1310/(750 × 0,2) = 8,7 . Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 9 качалочних колб

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Схема біотрансформації ростового субстрату

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *B. subtillis* є глюкоза . У Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes присутня вся інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у штаму *B. subtillis* , в даному випадку шлях метаболізму (гліколіз) згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (*рис 1*).

Глюкоза за участю глюкозоспецифісного ферменту (КФ 2.7.1.69) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на β-D-фруктозу 6-фосфат. Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перетворення β-D-фруктози 6-фосфат у β-D-фруктозу 1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β-D-фруктозу 1,6-фосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат . До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід 3-фосфат , під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на гліцерат 1,3-фосфат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат 3-фосфат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат 3-фосфат індукує його перетворення на гліцерат 2-фосфат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат 2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

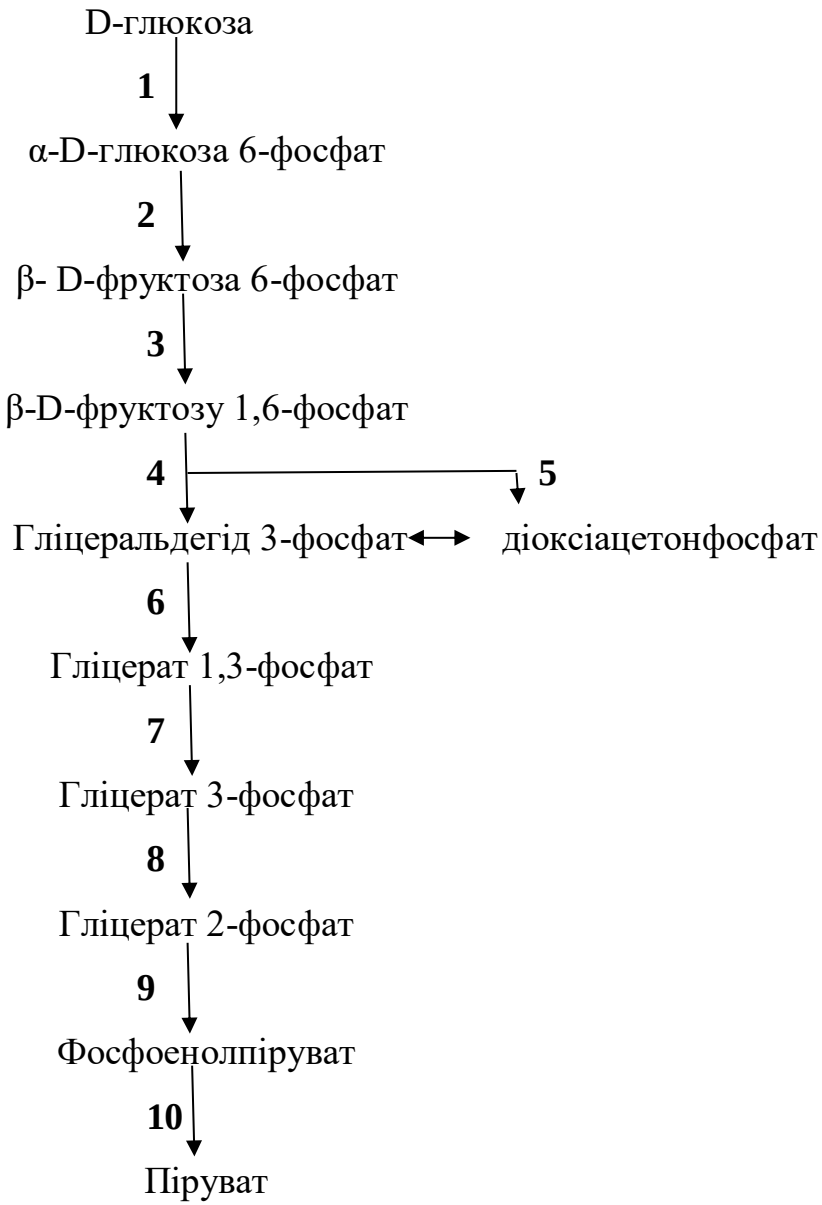


Рис 1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Меєйргофа-Парнаса

Ферменти:

1 – глюкозоспецифічний фермент (КФ 2.7.1.69); **2** – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); **3** – фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11); **4** – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); **5** – тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); **6** – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); **7** – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); **8** – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); **9** – енолаза (КФ 4.2.1.11); **10** – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Метаболічним попередником рибофлавіну є гуанозинтрифосфат, який під дією циклогідролази перетворюється на похідне піримідину, який далі трансформується у амінорибітол-аміноурацил за допомогою (КФ 1.1.1.193) 5-фосфорибозиламіно урацилредуктази. Далі амінорибітол-аміноурацил перетворюється у 5-аміно-6-(5-фосфорибозиламіно)-урацил за допомогою (КФ 3.5.4.26) 5-аміно-6-(5-фосфорибозиламіно)урацилредуктази. Після цього йде перетворення у 5-аміно-6 рибітиламіноурацил.

У пентозофосфатному шляху з рибозо-5-фосфат утворюється C_4-сполука (3,4-дигідрокси-2-бутанол-4-фосфат), за участю (КФ 3.5.4.25) 3,4-дигідроокси-2-бутанол-4-фосфатсинтаза, яка конденсується з амінорибітил-аміноурацил з утворенням 6,7-диметил-8-рибітиллумазин (КФ 2.5.1.78 - 6,7-диметил-8-рибітолсинтетаза).

6,7-диметил-8-рибітиллумазин під дією рибофлавінсинтетази перетворюється на рибофлавін. Рибофлавін може взаємодіяти з високоенергетичними фосфатами, переважно з АТФ, з утворенням рибофлавін-5-фосфату, за участю (КФ 1.5.1.39) редуктази [НАД (Ф) Н] (ФМН).

При взаємодії ФМН з АТФ утворюється флавінаденіндинуклеотид (ФАД), за допомогою (КФ 1.5.1.38) FMN редуктази.

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування та вибору ферментера

Головним елементом біотехнологічного процесу є ферментер. Основною вимогою якого є можливість проведення процесу культивування продуценту в асептичних умовах при інтенсивній аерації середовища.

За способом підведення енергії на аерацію та перемішування промислові ферментери можна розділити на: апарати з механічним перемішуванням та барботажем (комбінований підвод енергії), з ежекційною системою аерації (підвод енергії до рідкої фази) та барботажні (підвод енергії до газової фази) [11].

Bacillus subtilis – аероб, тому її культивування здійснюють за присутності кисню. Для представленої роботи використовується ферментер Labfors Lux (*рис 5.1.*) об'ємом 2 м^3 [13]. Обраний ферментер забезпечений пристосуваннями для достатньої аерації і перемішування культури, підтримки необхідної температури, а також контрольно-вимірювальним приладами. Аерація відбувається в результаті подання стерильного, підігрітого до необхідної температури повітря через спеціальні пристосування – барботери – і перемішування культуральної рідини мішалками. При цьому відбувається більше розчинення кисню завдяки його кращому диспергуванню в середовищі. Завдяки наявності відкритих турбінних мішалок та повітря, яке подається через барботер, досягнутий достатній рівень масообміну.

Рис. 5.1. Ферментер марки Labfors Lux

Підтримання температури, оптимальної для гарного росту продуцента рибофлавіну і прояву їм підвищеної фізіолого-біохімічної активності, забезпечується сорочкою. Змійовики використовуються також для подачі пари в процесі стерилізації або води для охолодження. На відміну від барботажних та барботажно-ерліфтних ферментерів, запропонований для використання апарат має високі масообмінні характеристики по кисню, в ньому можна легко варіювати режими перемішування та масообміну, суттєво меншими є витрати стерильного повітря, порівняно велика величина робочого об'єму, забезпечується рівномірний розподіл мікроорганізмів та компонентів поживного середовища [14].

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Bacillus subtilis GM44/pMX45 є аеробом, тому для розвитку і синтезу цільового продукту необхідною умовою є подача до ферментеру стерильного аераційного повітря.

Технологічно й економічно виправданим для виробництва рибофлавіну є очищення повітря за допомогою волокнистих і пористих матеріалів. Таким способом вдається отримати повітря з дуже високим ступенем очистки, що дозволяє його використання для керування культуральної рідини. Завислі в повітрі частки затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному та дифузійному механізму осадження. [16]

У відповідності з існуючими стандартами фільтрувальні елементи класифікуються на групи і класи залежно від якості фільтрування (ефективності і проникності):

- фільтри грубої очистки;
- фільтри тонкої очистки;
- індивідуальні фільтри.[15]

Після забору, повітря потрапляє на фільтр грубої очистки, де досягається ступінь його очищення понад 90%. Фільтри грубого очищення застосовуються відразу після забірних решіток повітря та в якості попередньої очистки для систем кондиціювання повітря. Фільтри грубої очистки призначені для затримки великих механічних частинок розміром більше 5 мкм (пух, листя, волосся, цементний пил і т. ін.). Вони складаються з каркасу з нержавіючої сталі, в який встановлюється фільтруючий матеріал. Продуктивність по повітрю кожного фільтра не більше 1500 $м^3$/год.

Пропонується використовувати коміркові фільтри грубої очистки, такі як ФЯУ, ФЯП, ФЯР, які відрізняються лише типом фільтруючого матеріалу.

Основні типи фільтруючих матеріалів:

- ультраскло,
- хімволокно,

- поліуретан,
- поліестер,
- фільтрувальний папір та інші.

У якості фільтрувального матерілу ми обираємо хімволокно, через його переваги:

- Багаторазове викристання за рахунок заміни тільки фільтруючого матеріалу.
- Низький початковий опір.
- Жорстка металева рамка.
- Пожежобезпечний матеріал.

Фільтри для тонкого очищення повітря найбільш часто застосовують в якості другого ступеня очищення. Пропонується використання картриджного фільтра моделі FMW. Це ефективний фільтр, який має компактну конструкцію і ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 2000 $м^3$/год [17].

Переваги даного фільтра:

- безперервне автоматичне очищення фільтруючих картриджів стисненим повітрям;
- подвійна система очищення картриджів за допомогою часового таймера і датчика перепаду тиску;
- ефективність очищення до 99% для часток розміром до 0,5 мікрон;
- легкість в обслуговуванні - необхідно тільки звільнити пилозбірники від пилу,
- в конструкції використовуються екологічно чисті матеріали;
- стійка конструкція, яка є витривала до впливу зовнішніх факторів,

Для остаточної очистки повітря від частинок, що містяться в ньому, і мікрофлори застосовують фільтри HEPA фірми « New filter». Фільтруючий матеріал – скловолокно, упаковане вигляді малих складок(мінігофр). Цей матеріал гідрофобний, стійкий до хімічно агресивних середовищ і може

експлуатуватися при температурі не вище 70 °С і відносній вологості до 100 %. Ступінь очистки 99,996%[18]

Проаналізувавши вище наведені дані, на першій стадії очистки повітря найдоцільніше для нас буде використовувати фільтри грубої очистки з ефективністю фільтрації 80%. Обираємо фільтр типу ФЯП, на основі особливостей фільтрувального матеріалу. На наступній стадії найкраще буде використати фільтри тонкої очистки картриджного типу, моделі FMW, з ефективність 99%. Фільтри типу HEPA використовують на останніх стадіях очистки повітря, тобто безпосередньо перед подачею в ферментер. Фільтр затримує 99,996

Стерилізують фільтри парою. Зміну фільтрів ведуть 1 раз на місяць[18].

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво вітаміну рибофлавіну здійснюється упродовж 150 днів (див. розділ 1). Генеральне прибирання проводять один раз на місяць (з урахуванням кількості трудоднів – 5 разів), а щоденне – перед кожною робочою зміною (1–3 рази на добу), беручи до уваги кількість трудоднів – 150 разів.

Відстань між стінами та апаратами становить 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісними апаратами складає 1,5 метра. Також при розрахуванні площі виробничого приміщення слід врахувати внутрішній діаметр обладнання (*табл.2.1.*) та розмір рубашки .

Виробництво вітаміну B_2 здійснюється упродовж 150 днів (див. розділ 1), що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об’ємом 2 $м^3$, інокулятори об’ємом 0,25 $м^3$ та 20 л, реактори-змішувачі для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, качалки, а також бокс та лабораторне устаткування.

Виробництво включатиме наступні цехи: цех виробничого біосинтезу та цех вирощування інокуляту, качалочна кімната, мікробіологічна лабораторія, де знаходяться холодильники, термостати, бокс, автоклав, сухо жарові шафи, та біохімічна (технологічна) лабораторія, оснащена апаратурою для проведення

різних видів контролю (pH-метр, хроматограф, ФЕК тощо) та ваги для приготування поживних середовищ. Відстань між стінами та апаратами становить 1,0 - 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісними апаратами складає 1 метр.

На *рис. 1* наведено приблизний план приміщення.

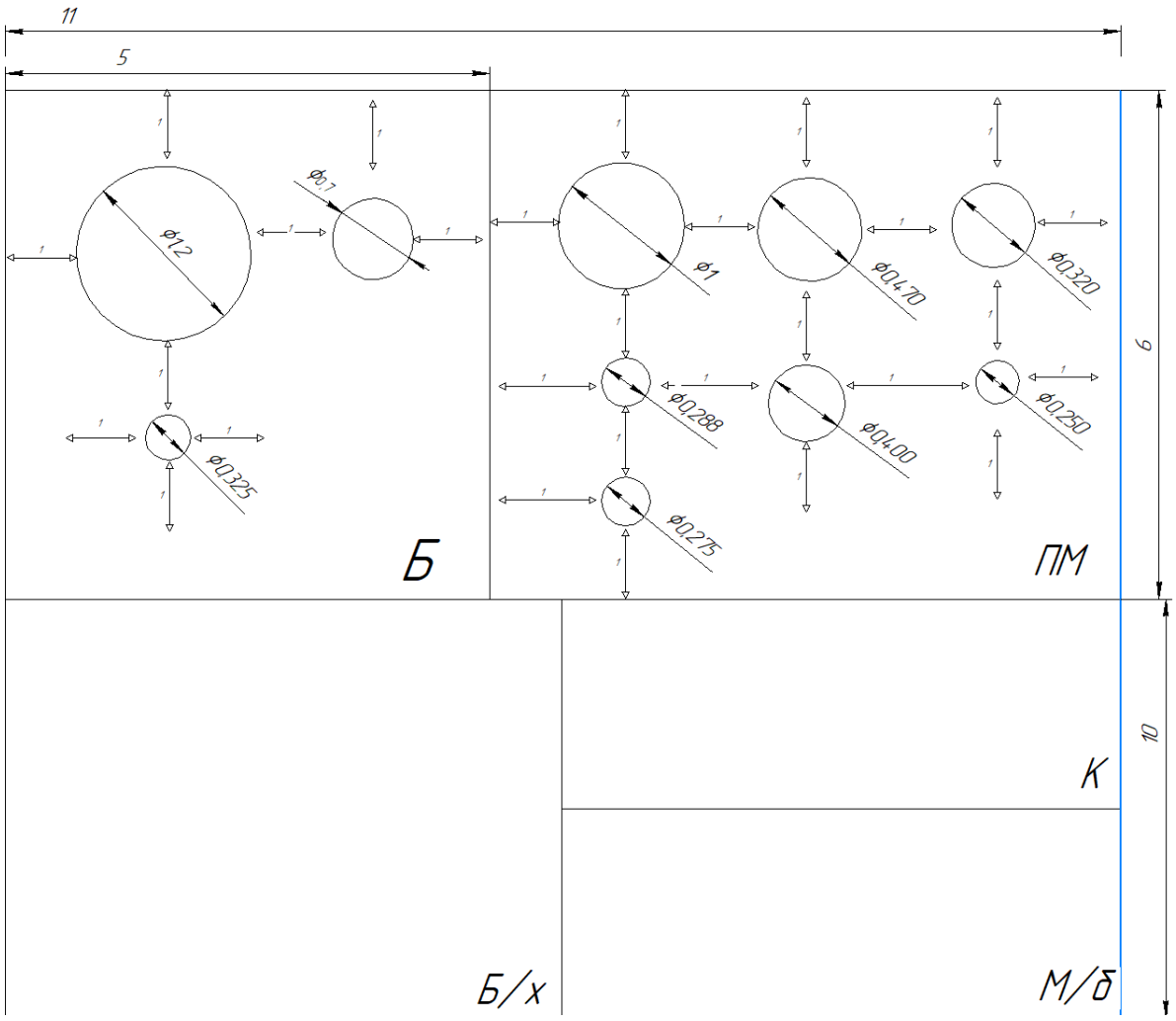


Рис. 1. План виробничого приміщення для виробництва інозину

Б – цех виробничого біосинтезу (ферментер об'ємом 2 м^3, 250 л, 20 л)

ПМ – цех підготовки посівного матеріалу (реактори-змішувачі для приготування середовища для виробничого біосинтезу об'ємом 2 м^3, 250 л, 20 л);

М/б – мікробіологічна лабораторія;

Б/х – біохімічна (технологічна) лабораторія;

К – приміщення з качалками.

Таблиця 5.1

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва рибофлавіну *Bacillus subtilis* GM44/pMX45

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	2000	1200	2,550
Реактор-змішувач для приготування середовища для виробничого біосинтезу композиції А	1250	1,000	2,300
Реактор-змішувач для приготування середовища для виробничого біосинтезу композиції Б	250	0,470	1,150
Реактор-змішувач для приготування середовища для виробничого біосинтезу композиції В	100	0,320	0,650
Інокулятор(1)	250	0,700	1,200
Реактор-змішувач для приготування середовища в інокуляторі (1) композиції А	120	0,400	0,600
Реактор-змішувач для приготування середовища в інокуляторі (1) композиції Б	30	0,288	0,525
Реактор-змішувач для приготування середовища в інокуляторі (1) композиції В	10	0,250	0,300
Інокулятор (2)	20	0,325	0,350
Реактор-змішувач для приготування середовища для культивування в інокуляторі (2) композиція А	15	0,275	0,325
Всього	4,200	4,387	2,550

Примітка*. Дані з сайту https://bio-rus.ru

Оскільки для миття обладнання буде використовуватись СІП-мийка, а також ручне миття для чисти малоємнісного обладнання, загальна площа миття становить 760 м^3.

Для підтримання чистоти в виробничих приміщеннях підлогу необхідно мити кожного дня, тобто 150 разів. Обробка стін, вікон та підлоги, тобто генеральне прибирання здійснюється щомісячно, відповідно 5 разів. Необхідно розрахувати кількість миючих засобів. Для цього розраховуємо приблизну

площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 3,5 м.

Оптимальна площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить (враховуючи місце на майданчику обслуговування для вивантаження кришки ферментера та збірника) 176 м^2 (16×11 м), площа стін – ((11 × 3,5 + (16 × 3,5)) × 2 =189 м^2, загальна площа – 176 + 189 = 365 м^2.

Кількість виробничих циклів для синтезу рибофлавіну становить 45. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 45 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$759 \times 45 = 34\,155 \text{ л}$$

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі миття та дезинфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва рибофлавіну

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м^2 (м^3)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м^2 (л)
Обладнання, інвентар, комунікації	759 л	45	34155 л
Підлога	176 м^2	150	26400 м^2
Стіни, двері, вікна	189 м^2	5	945 м^2

Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів для культивування *Bacillus subtilis GM44/pMX45*

Щоб обрати мийний (для обладнань і комунікацій) та дезинфікувальний (для стін, підлоги, вікон, дверей) засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. На 1 м^2 приблизно затрачається 100 мл робочого розчину миючого чи дезінфікувального засобу

(згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502)[19].

Для забезпечення асептичності процесу культивування перед початком процесу технологічне обладнання, що використовується миють та дезінфікують. До миючих та дезинфікуючих засобів існують наступні вимоги:

- повинні мати високу протимікробну активність відносно всіх збудників інфекційних, вірусних і паразитарних захворювань;
- мати невисоку токсичність для людей і тварин, не пошкоджувати шкіру і слизові оболонки;
- бути дешевими;
- не мати запаху і властивостей барвників;
- швидку дію та тривалість дії;
- не повинні псувати предмети, що підлягають дезінфекції.

Серед всіх миючих засобів було обрано найбільш кращі засоби, які задовольняють вище перелічені умови та з розрахунку було обрано 3 миючих засоби для генерального прибирання (1 засіб на один місяць). Це зроблено для того щоб мікроорганізми не мали резистентності до даних речовин і в нас не було забруднення обладнання, адже все це вплине на технологічний процес.
Нижче наведено коротку характеристику кожного вибраного миючого засобу.

Каустична сода - відмінний універсальний дезінфектант з потужним бактерицидним ефектом, що засноване на сильних лужних характеристиках. Застосовується для хімічної дезінфекції приміщень, обладнання та інвентарю. У вигляді 2-3% -го гарячого (70°С) розчину справляється з великою кількістю інфекцій, спровокованих бактеріями і вірусами. Даним миючим засобом можна обробляти обладнання, інвертар, комунікації[19].

Вімол - засіб мийний технічний застосовується для механізованого способу мийки шляхом рециркуляції його розчинів, а також вручну шляхом занурення деталей обладнання, інвентарю та тари в робочі розчини препарату на

підприємствах АПК. Він може використовуватися як активна миюча добавка до розчинів каустичної соди для підвищення миючого дії. Вімол може бути застосовано для мийки обладнання, виготовленого з алюмінію, нержавіючої сталі, синтетичних матеріалів, скла, а також обладнання, покритого емаллю[20].

Обгрунтування миючих засобів для оброблення стін, підлоги та вікон

Вибір миючого засобу для стін, підлоги, вікон має також важливе значення адже те як і яким миючим засобом обробляється приміщення в кінцевому етапі впливає на процес, якість та вихідну продукцію виробництва.

В даному випадку щоденне прибирання приміщення буде відбуватися за допомогою води – вологе прибирання та генеральне прибирання буде відбуватися раз в місяць (тобто 3 рази за весь цикл виробництва) миючими засобами, які є кращими порівняно з іншими аналогами.

Нище наведено коротку інформацію про кожен миючий засіб вибраний для даного виробництва.

Гембар – економічний препарат для дезінфекції поверхонь, інвентарю і посуду. Не містить лугу, альдегиду, фенолу, окислювальних і хлорпохідних сполук. Гуанідинова полімерна сполука, яка є синтетичним аналогом природних гуанідинових сполук. Розчин (25% концентрат). Препарат має пролонговану бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію. Інактивує мікроби, в тому числі туберкульозу, грибки, віруси, у тому числі повно-, адено-, гепатиту Б, герпеса, енцефалітний, грипу, ВІЛ та інше[19].

Дезекон ОМ - лужний низькопінний концентрований дезінфекційний засіб на основі композиції четвертинних амонієвих солей, амінів і бігуанідів для дезінфекції, комплексної мийки, дезодорування. Засіб має бактерицидні (включаючи збудників туберкульозу, *P.aeruginosa, S.aureus*), віруліцидні (включаючи віруси гепатитів В, С, ВІЛ, герпесу, грипу), фунгіцидні (проти збудників кандидозів і дерматомікозів, а також цвілевих грибів *A.niger*) властивості. При підвищенні температури розчинів їх антимікробну активність і миюча здатність збільшуються[21].

Дезефект - ефективний і безпечний рідкий концентрований дезінфекційний засіб з мийною дією для дезінфекції. Дезефект має антимікробні властивості проти широкого спектра грам + і грам- бактерій (включаючи збудників гнійно-септичних та інших інфекцій, збудників холери, туберкульозу, легіонельозу), вірусів (в т.ч. вірусів грипу, герпесу, аденовірусів, ВІЛ, вірусів гепатитів А, В, С, рото-, поліо-, ентеровірусів тощо), патогенних грибів роду *Candida*, збудників дерматомікозів, цвілевих грибів, а також володіє спороцидною дією[22].

Таблиця 5.3

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва рибофлавіну

Назва мийного/дезінфікувального засобу	**Об'єкт миття та/або дезінфекції**	**Концентра-ція робочого розчину, %**	**Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м^2 (л)**	**Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л**	**Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікува-льного засобу, грн**	**Вартість 1 л робочого розчину**	**Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн**
Каустична сода[1]	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	17077	768 456	18,50	0,37	283 328
Вімол [2]	Обладнання, інвентар, комунікації	0,5	17077	768 456	22	0,11	84 530
Гембар [3]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	9125	915	150	0,44	402
Дезекон ОМ [4]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	9125	915	290	0,29	265
Хлорантоїн[5]	Стіни, підлога, вікна, двері	0,25	20 100	2 000	250	0,63	12 663

Примітка: ціни наведені станом на жовтень 2019 р.1. https://flagma.ua/kausticheskaya-soda-so1398893-1.html; 2; https://prom.ua/p1046260033-vimol.html 3; http://www.attis.com.ua/site/liquid/gembar.html 4; https://prom.ua/p616953561-dezekon.html 5https://farmakos.ua/ua/hlor.html

Отже, в *таблиці 5.3.*, наведено препарати які будуть викристовуватися для для миття обладнання, комунікацій, стін, вікон та дверей. Дані миючи засоби було обрані зважаючи на їх ціну, оскільки враховуючи концентрацію даних розчинів, та їх вартість за один літр (кілограм), витрати на їх придбання для всього періоду виробництва становлять найменше. Також потрібно брати до уваги те, що дані миючі засоби не мають стороннього засобу та не є шкідливими для персоналу.

Каустична сода не залишає розводи на внутрішній частині ферментера та легко видаляється з нього.

Кожні 3 місяці миючі засоби необхідно змінювати, для унеможливлення утворення резистентних штамів мікроорганізмів.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу рибофлавіну використовується середовище наступного складу (г/л):

- дріжджовий екстракт – 32;
- Сахароза– 20;
- Зерновий екстракт – 10;
- K_2HPO_4 – 9;
- Сечовина – 6;
- KH_2PO_4 – 3;
- $MgSO_4$ x $7H_2O$ – 0,6

5.1.4.1.Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Bacillus subtilis* GM44/pMX45, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Сахароза, дріжджовий екстракт та зерновий екстракт стерилізуємо в колбі при температурі: 112 °С, впродовж 30 хв і тиску 0,05МПа.

Композиція Б: $MgSO_4$ х $7H_2O$ стерилізуємо в колбі при температурі: 131 °С, протягом 40 хв, і тиску 0,15 МПа)

Композиція В: K_2HPO_4, KH_2PO_4 стерилізуємо в колбі при температурі: 131 °С, протягом 40 хв, і тиску 0,15 МПа)

Композиція Г: Сечовина стерилізуємо в колбі при температурі: 112 °С, протягом 20 хв, і тиску 0,05 МПа)

5.1.4.2.Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л

Оскільки об'єми поживних середовищ не є великими (окрім композиції А) то ми можемо стерелізувати в автоклаві. Композицію А ми стерилізуємо в реакторі-змішувачі.

Композиція А: Сахароза, дріжджовий екстракт та зерновий екстракт стерелізується в посівному апараті об'ємом 20л при: 112 °С, впродовж 30 хв і тиску 0,05МПа.

Композиція Б: $MgSO_4$ х $7H_2O$ стерилізуємо в колбі при температурі: 131 °С, протягом 40 хв, і тиску 0,15 МПа)

Композиція В: K_2HPO_4, KH_2PO_4 стерилізуємо в колбі при температурі: 131 °С, протягом 40 хв, і тиску 0,15 МПа)

Композиція Г: Сечовина стерилізуємо в колбі при температурі: 112 °С, протягом 20 хв, і тиску 0,05 МПа)

5.1.4.3.Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 л

Оскільки об'єми поживних середовищ занадто великі для стерилізації в автоклаві, їх треба стерилізувати безпосередньо в збірниках та посівному

апараті. Перед кожним посівним апаратом буде розміщено збірник відповідного об’єму для приготування композиції.

Композиція А: Сахароза, дріжджовий екстракт та зерновий екстракт стерелізується в збірнику при: 112 °С, впродовж 30 хв і тиску 0,05МПа.

Композиція Б: Композицію Б готують в реакторі-змішувачі де її підкислюють 6% соляною кислотою для запобігання випаду солей в осад. Після змішування суміш подається до посівного апарату 200 л, де обирається режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа

Композиція В: Сечовина, дріжджовий екстракт та зерновий екстракт стерелізується в збірнику при: 112 °С, 20 хв, 0,15 МПа)

5.1.4.4.Виробниче культивування в ферментаторі на 2 м^3

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: Сахароза, дріжджовий екстракт та зерновий екстракт стерелізується в збірнику при: 112 °С, впродовж 30 хв і тиску 0,05МПа.

Композиція Б: Композицію Б готують в реакторі-змішувачі де її підкислюють 6% соляною кислотою для запобігання випаду K_2HPO_4, KH_2PO_4 , $MgSO_4$ x $7H_2O$ в осад. Після змішування суміш подається до виробничого ферментеру об’ємом 2000 л, де обирається режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа

Композиція В: Сечовина (режим стерилізації: 112 °С, 20 хв, 0,05 МПа)

5.2. Обґрунтування стадій виділення рибофлавіну

Культуральна рідина після ферментації є складною фізико-хімічною системою, до складу якої входять:

- рибофлавін - 20 г / л, в тому числі 18-19 г / л у вигляді кристалів і 1-2 г / л в розчиненому стані;
- клітини продуцента займають обсяг близько 5%;
- нерозчинні компоненти ферментаційної середовища (дріжджі та ін.);

- неорганічні солі з компонентів середовища, а також з розчинів,що використовувалися для регуляції pH;
- органічні невикористані компоненти середовища;
- продукти метаболізму бактерій (ацетоін, діацетил бутандіол і ін.).

Загальна кількість сухих речовин становить 10-15%.

Виділення та очистка рибофлавіну фармацевтичної якості складається з наступних стадій:

1. Осаджння гідросульфітом натрію
2. Центрифугування
3. Автоліз
4. Центрифугування
5. Висушування

Після біосинтезу цільового продукту культуральна рідина відправляється до збірника перед стадією виділення з культуральної рідини.

1.3 Обгрунтування вибору способу виділення рибофлавіну

Осадження гідросульфітом натрію

Якщо до культуральної рідини додати і розчинити якусь нейтральну речовину, наприклад неорганічну сіль або органічний розчинник, то деякі речовини втрачають розчинність і випадають в осад. Втрата розчинності речовиною пов’язана із зменшенням ступеня гідратованості молекул і переходом води від молекул, що осаджуються до розчинника або солі.

Для проведення процесів змішування вихідних розчинів і реагентів використовують реактори-змішувачі, фільтри або центрифуги[24].

Під час осадження розчинність речовини у розчиннику повинна бути обмеженою. З цією метою встановлюють pH 4,5 – 5,0 за допомогою ацетатного буферу перед осадженням. Осадження рибофлавіну проводять за допомогою гідросульфіту натрію ($NaHSO_3$).

Центрифугування

Після осадження відділити кристали рибофлавіну можна за допомогою фільтрувальної центрифуги. Фільтрувальні центрифуги поєднують обидва принципи відділення дисперсної фази: фільтрування та осадження. Вони можуть одержувати осади з меншим вмістом вологи, дозволяють промивати осад без вивантаження його з центрифуги [24].

Наприклад фільтрувальна центрифуга типу HT/GMP (Рис. 5.3).

Такі центрифуги підходить для фільтрування кристалів рибофлавіну, оскільки відсутні скребкові ножі, що можуть пошкодити структуру кристалів. Натомість видалення твердої фракції відбувається шляхом вивертання фільтрувальної тканини за рахунок впливу відцентрової сили. Надлишковий тиск запобігає витіканню суспензії з апарату. Всередині апарату є 3 рухомі частини – фільтр, вал і барабан. Апарат повністю герметичний[24].

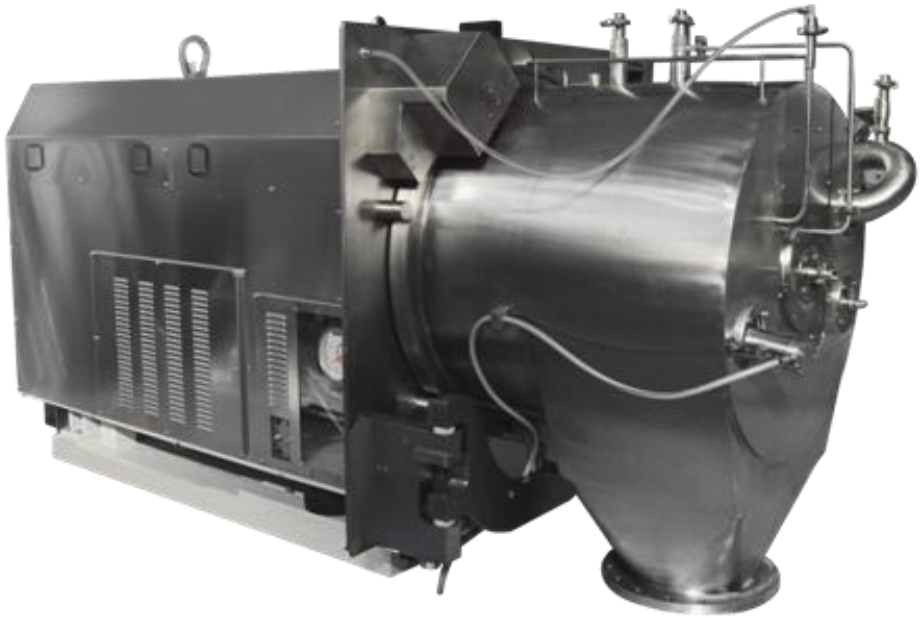


Рис. 5.3 Фільтрувальна центрифуга типу HT/GMP

Переваги цієї центрифуги наступні:

- висока ефективність;
- удосконалена система CIP і валідація;
- можливість висушування продукту[24].

1.3 Обгрунтування вибору способу сушіння

Сушіння проводять за допомогою вакуум-сушильної шафи. Цей тип сушарок являє собою горизонтальний циліндричний апарат або прямокутну шафу з відкидною передньою кришкою. Спосіб сушіння – контактний.

У шафу на полиці закладають вологий матеріал, створюють вакуум, починають обігрівання шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують, коли матеріал буде мати певну залишкову вологість, після чого готовий сухий матеріал вивантажують.

Вакуумні шафи мають ряд недоліків: підвищенні працевитрати, можливість контакту працюючих з матеріалом, що висушується[10].

Прикладом може бути вакуум-сушильна шафа *СВП-500 (Рис*. 5.4) Силіконовие ущільнення на двері створюють стійкість підтримки вакууму і температури всередині камери. Деки виготовленісварним способом і не мають щілин, що дозволяє повністю витягуючи висушений матеріал. Крім самої камери, нагріваються також і полиці, на яких розкладено вологий матеріал. Спеціальна конструкція робить двері повністю газонепроникними і стійкими до глибокого вакууму. Поява конденсату в будь-якій точці сушильної камери запобігається задопомогою спеціального розподільника обігріваючої рідини, який забезпечує рівномірний розподіл тепла по всіх внутрішніх поверхнях шафи. Дно камери виконано під нахилом вперед в бік дверей, що полегшує чистку камери і витяг миючих засобів. [25].

Рис. 5.4 Вакуум-сушильна шафа *СВП-500*

Рибофлавін висушують при температурі 80 – 90°С та при тиску, нижчому за атмосферний[26].

РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ

З техніко економічного розрахунку потреба в рибофлавіні складає $G_{нд}$ = 960 кг. За умовами замовника цю кількість вітаміну потрібно виробити за $T_{рд}$ = 150 днів. За літературними даними максимальний синтез антибіотика досягається 21 г/л за умов росту штаму *B.subtillis* GM44/pMX45 на середовищі такого складу (г/л): дріжджовий екстракт – C_1 = 32,0; Сахароза– C_2 = 20,0;Зерновий екстракт – $C_з$ = 10,8, K_2HPO_4 – C_4= 9.0; Сечовина –C_5= 6.0; KH_2PO_4 –C_6= 3; $MgSO_4$ x $7H_2O$ – C_7=0,6. Всього – $C_Σ$ = 81,40 г/л.

Посівний матеріал вирощують на поживному середовищі такого складу (г/л): дріжджовий екстракт – C_1 = 32,0; Сахароза– C_2 = 20,0;Зерновий екстракт – $C_з$ = 10,8, K_2HPO_4 – C_4= 9.0; Сечовина –C_5= 6.0; KH_2PO_4 –C_6= 3; $MgSO_4$ x $7H_2O$ – C_7=0,6. Всього – $C_Σ$ = 81,40 г/л.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{Цф} = T_ф + T_{по}$ = 70 + 10 = 80 год, де $T_{по}$ – час підготовчих операцій; коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) $K_і$ = 1,1; коефіцієнт заповнення ферментера, частка (0,5 –0,65); приймаємо $K_з$ = 0,54; коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка $K_{па}$ = 0,54; коефіцієнт заповнення інокулятора, частка $K_{зі}$ = 0,66; коефіцієнт заповнення колб, частка $K_{кол}$ = 0,2.

Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{СВ}$ = 0,1; кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05 – 0,1) $X_ф$ = 0,1; кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,02 – 0,1) $X_{па}$ = 0,1; кількість посівного матеріалу для інокуляторів, частка (0,02 – 0,1) $X_{ін}$ = 0,1;

кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка (0,02 – 0,1) $X_{кол}$ = 0,1; втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка (0,1 – 0,2) $E_ф$ = 0,1; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в посівних апаратах, частка (0,1 – 0,2) $E_{па}$ = 0,1; втрати посівного матеріал при його культивуванні в інокуляторах, частка (0,05 – 0,1) $E_{ін}$ = 0,1; втрати посівного матеріал при його культивуванні в колбах, частка (0,01 – 0,05) $E_{кол}$ = 0,01

6.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів)

1.1. Кількість продукту на добу:

$$G_{нтд} = G_{нд}/T_{рд} = 960/150 = 6,4 \text{ кг/добу.}$$

1.2. Кількість готового продукту за цикл:

$$G_{цк} = G_{пд} \cdot T_{цф}/24 = 6,4 \cdot 80/24 = 21,3 \text{ кг/цикл.}$$

1.3. Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$Vкр = K1 \bullet Gцк \bullet СРгп/Хкр \cdot (1-Есв) = 1,1 \bullet 21,3 \bullet 0,9/21 \bullet (1-0,1) = 1,12 \text{ м}^3$$

1.4. Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$Nцк = Gнт/Gцк = 960/21,3 = 45 \text{ циклів}$$

6.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

6.2.1Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі $E_ф$ = 0,1 становить:

$$V_ф = V_{кр}/(1-E_ф) = 1,12/(1-0,1) = 1,25 \text{ м}^3.$$

Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера:

$$V_{пс} = V_ф/(1+X_ф)= 1,25/(1+0,1) = 1,13 \text{ м}^3.$$

Витрати посівного матеріалу на засів виробничого ферментера:

$$V_{пмф} = V_ф – V_{псф} = 1,25 – 1,13 = 0,12 \text{ м}^3.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $К_{зф}$ = 0,6 його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{гф} = V_ф/К_{зф} = 1,25/0,54 = 2,3$ м^3.

Визначення кількості стадій вирощування посівного матеріалу

Оскільки кількість посівного матеріалу становить Хф=Хі=Хколб=0,1% від кількості поживного середовища визначаємо кількість посівного матеріалу для інших стадій. Приблизна кількість посівного матеріалу для всіх інших стадій становитиме:

Посівний матеріал з інокулятора герметичним об’ємом Vін= 120 л

Vпмф=120 л

Vін=Vпмф/Кз=120/0,6=0,25 м^3

За таблицею 11.1 вибираємо інокулятор геометричним об’ємом 0,25 м^3

Посівний матеріал з інокулятора герметичним об’ємом Vін=0,02 м^3

$V_{пін_1}$=Vпмф·Хін=120·0,1=12 л

$V_{ін}=V_{пін_1}$/Кз=12/0,6=20

За таблицею 11.1 вибираємо інокулятор геометричним об’ємом 0,02 м^3

Посівний матеріал з качалочних колб одержуємо:

$V_{пін_2}$=Vпін1·Хін=12·0,1=1,2 л

Всього колб – nколб=Vпмк/Vколб·Кзколб=1,2/0,75·0,2=8 колби

Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментерів

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного
середовища $V_{пс}$ складають:

$G_{заг} = V_{пс} \cdot C_{\sum} = 1{,}13 \cdot 81{,}4 = 92$ кг, в тому числі покомпонентно, кг:

Дріжджовий екстракт - $G_1 = G_{заг} \cdot C_1/C_{\sum} = 92 \cdot 32/81{,}4 = 36{,}2$

Сахароза – $G_2 = G_{заг} \cdot C_2/C_{\sum} = 92 \cdot 20/81{,}4 = 22{,}6$

Зерновий екстракт – $G_3 = G_{заг} \cdot C_3/C_{\sum} = 92 \cdot 10{,}8/81{,}4 = 12{,}2$

K_2HPO_4 – $G_4 = G_{заг} \cdot C_4/C_{\sum} = 92 \cdot 9/81{,}4 = 10{,}8$

Сечовина– $G_5 = G_{заг} \cdot C_5/C_{\sum} = 92 \cdot 6/81{,}4 = 6{,}8$

KH_2PO_4 – $G_6 - G_{заг} \cdot C_6/C_{\sum} = 92 \cdot 3/81{,}4 = 3{,}4$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $G_7 = G_{заг} \cdot C_7/C_{\sum} = 92 \cdot 0{,}6/81{,}4 = 0{,}7$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Кількість води визначають за наступною формулою

$V_в = V_{пс} - G_{заг} - (V_{пс}К_{кон})$,

де $К_{кон}$ – частка конденсату у загальні кількості води, що йде на приготування середовища, а $V_{пс}К_{кон}$ – загальна кількість утвореного конденсату.

В залежності від способу стерилізації та використовуваного обладнання величина $К_{кон}$може складати:

$К_{кон} = 0$ при стерилізації закритих колбах або бутилях в автоклаві;

$К_{кон} = 0{,}1 \div 0{,}15$при стерилізації компонентів у реакторах-змішувачах, інокуляторах або ферментеріпри подачі гострої пари безпосередньо в середовище;

$К_{кон} = 0{,}2$ при стерилізації компонентів в УБС.

Оскільки об'єм поживного середовища для виробничого ферментера
(без конденсату) складає $V_{пс} = 1{,}13$ м^3**,** приймаємо рішення щодо використання для стерилізації у реакторах – змішувачувачах.

Тоді загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС в збірниках становитиме:

$V_к = V_{пс}К_{кон} = 1,13 \cdot 0,1 = 113$ л.

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компоненті поживного середовища буде:

$V_в = V_{пс} - V_к - G_{заг} = 1130 - 113 - 92 = 925$ л.

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1л = 1кг.

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

Дріжджовий екстракт – $G_{1в} = V_в \cdot C_1/C_\sum = 925 \cdot 32/81,4 = 363,6$

Сахароза – $G_{2в} = V_в \cdot C_2/C_\sum = 925 \cdot 20/81,4 = 227,3$

Зерновий екстракт– $G_{3в} = V_в \cdot C_3/C_\sum = 925 \cdot 10,8/81,4 = 122,8$

K_2HPO_4– $G_{4в} = V_в \cdot C_4/C_\sum = 925 \cdot 9/81,4 = 102,3$

Сечовина– $G_{5в} = V_в \cdot C_5/C_\sum = 925 \cdot 6/81,4 = 68,2$

KH_2PO_4 – $G_{6в} = V_в \cdot C_6/C_\sum = 925 \cdot 3/81,4 = 34,1$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $G_{7в} = V_в \cdot C_7/C_\sum = 925 \cdot 0,6/81,4 = 6,9$

Розраховуємо кількість конденсату по компонентно, л

Дріжджовий екстракт – $G_{1в} = V_к \cdot C_1/C_\sum = 113 \cdot 32/81,4 = 44,4$

Сахароза – $G_{2в} = V_к \cdot C_2/C_\sum = 113 \cdot 20/81,4 = 27,7$

Зерновий екстракт– $G_{3в} = V_к \cdot C_3/C_\sum = 113 \cdot 10,8/81,4 = 15$

K_2HPO_4– $G_{4в} = V_к \cdot C_4/C_\sum = 113 \cdot 9/81,4 = 12,5$

Сечовина– $G_{5в} = V_к \cdot C_5/C_\sum = 113 \cdot 6/81,4 = 8,3$

KH_2PO_4 – $G_{6в} = V_к \cdot C_6/C_\sum = 113 \cdot 3/81,4 = 4,1$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $G_{7в} = V_к \cdot C_7/C_\sum = 113 \cdot 0,6/81,4 = 1$

Таблиця 6.1.

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в виробничому ферментері

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1,13 м^3 середовища, кг (л)	Композиція	Об’єм композиції, V, л

Дріжджовий екстракт	32	36,2	А	871,7
Вода		363,6		
Зерновий екстракт	10,8	12,2		
Вода		122,8		
Сахароза	20	22,6		
Вода		227,3		
Конденсат		***87,1***		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6	0,7	Б	175,1
Вода		6,9		
K_2HPO_4	9	10,8		
Вода		102,3		
KH_2PO_4	3	3,4		
Вода		34,1		
Конденсат		***17,6***		
Сечовина	6	6,8	В	83,3
Вода		68,2		
Конденсат		***8,3***		
Загальний конденсат		113		113
Разом:		**1130**		**1130**

3.2.2.Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$V_{па} = V_{пмф}/(1-E_{па}) = 120/(1- 0,1) = 133$ л.

Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

$V_{псп} = V_{па}/(1+X_{па}) = 133/(1+0,1) = 121$ л.

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання посівного апарата:

$V_{пмп} = V_{па} - V_{псп} = 133 - 121 = 12$ л.

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об’єм поживного середовища $V_{псп}$ складають:

$G_{заг} = V_{псп}\, C_{\Sigma} = 121 \cdot 81,4 = 9,8$ кг, в тому числі покомпонентно, кг:

Дріжджовий екстракт - $G_1 = G_{заг} \cdot C_1/C_{\Sigma} = 9,8 \cdot 32/81,4 = 3,85$

Сахароза – $G_2 = G_{заг} \cdot C_2/C_{\sum} = 9,8 \cdot 20/81,4 = 2,4$

Зерновий екстракт – $G_3 = G_{заг} \cdot C_3/C_{\sum} = 9,8 \cdot 10,8/81,4 = 1,3$

K_2HPO_4 – $G_4 = G_{заг} \cdot C_4/C_{\sum} = 9,8 \cdot 9/81,4 = 1,08$

Сечовина– $G_5 = G_{заг} \cdot C_5/C_{\sum} = 9,8 \cdot 6/81,4 = 0,7$

KH_2PO_4 – $G_6 - G_{заг} \cdot C_6/C_{\sum} = 9,8 \cdot 3/81,4 = 0,36$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $G_7 = G_{заг} \cdot C_7/C_{\sum} = 9,8 \cdot 0,6/81,4 = 0,07$

Стерилізація компонентів в композиціях буде проводитись в збірниках, тому приймаємо $K_{кон} = 0,1$

Тоді загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС в збірниках становитиме:

$V_к = V_{пс}K_{кон} = 121 \cdot 0,1 = 12$ л

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде становити:

$$V_в = V_{псп} - G_{заг} = 121 - 9,8 - 12 = 98,2 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

Дріжджовий екстракт – $G_{1в} = V_в \cdot C_1/C_{\sum} = 98,2 \cdot 32/81,4 = 38,6$

Сахароза – $G_{2в} = V_в \cdot C_2/C_{\sum} = 98,2 \cdot 20/81,4 = 24$

Зерновий екстракт– $G_{3в} = V_в \cdot C_3/C_{\sum} = 98,2 \cdot 10,8/81,4 = 13$

K_2HPO_4– $G_{4в} = V_в \cdot C_4/C_{\sum} = 98,2 \cdot 9/81,4 = 11$

Сечовина– $G_{5в} = V_в \cdot C_5/C_{\sum} = 98,2 \cdot 6/81,4 = 7$

KH_2PO_4 – $G_{6в} = V_в \cdot C_6/C_{\sum} = 98,2 \cdot 3/81,4 = 4,6$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $G_{7в} = V_в \cdot C_7/C_{\sum} = 98,2 \cdot 0,6/81,4 = 0,7$

Розраховуємо кількість конденсату по компонентно, л

Дріжджовий екстракт – $G_{1в} = V_к \cdot C_1/C_{\sum} = 12 \cdot 32/81,4 = 4,7$

Сахароза – $G_{2в} = V_к \cdot C_2/C_{\sum} = 12 \cdot 20/81,4 = 3$

Зерновий екстракт– $G_{3в} = V_к \cdot C_3/C_{\sum} = 12 \cdot 10,8/81,4 = 1,6$

K_2HPO_4– $G_{4в} = V_к \cdot C_4/C_{\sum} = 12 \cdot 9/81,4 = 1,3$

Сечовина– $G_{5в} = V_к \cdot C_5/C_{\sum} = 12 \cdot 6/81,4 = 1$

KH_2PO_4 – $G_{6в} = V_к \cdot C_6/C_{\sum} = 12 \cdot 3/81,4 = 0,44$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $G_{7в} = V_к \cdot C_7/C_\sum = 12 \cdot 0{,}6/81{,}4 = 0{,}1$

Таблиця 6.2.

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 121 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Дріжджовий екстракт	32	3,8	А	92,3
Вода		38,6		
Зерновий екстракт	10,8	1,3		
Вода		13		
Сахароза	20	2,4		
Вода		24		
Конденсат		***9,2***		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6	0,072	Б	18,7
Вода		0,72		
K_2HPO_4	9	1		
Вода		10,8		
KH_2PO_4	3	0,36		
Вода		3,6		
Конденсат		***1,9***		
Сечовина	6	0,72	В	8,9
Вода		7,2		
Конденсат		***1***		
Загальний конденсат		12		12
Разом:		**121**		**121**

6.2.3Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{ін1} = V_{пмп}/(1-E_{ін}) = 12/(1-0{,}1) = 13{,}2 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в ферментері буде:

$$V_{\text{псі1}} = V_{\text{ін1}}/(1+X_{\text{ін}}) = 13{,}3/(1+0{,}1) = 12 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання інокулятора:

$$V_{\text{пмі1}} = V_{\text{ін1}} - V_{\text{псі1}} = 13{,}2 - 12 = 1{,}2 \text{ л.}$$

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псі1}} C_{\Sigma} = 12 \cdot 81{,}4 = 977 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г}$$

Дріжджовий екстракт - $G_1 = G_{\text{заг}} \cdot C_1/C_{\sum} = 977 \cdot 32/81{,}4 = 384$

Сахароза – $G_2 = G_{\text{заг}} \cdot C_2/C_{\sum} = 977 \cdot 20/81{,}4 = 240$

Зерновий екстракт – $G_3 = G_{\text{заг}} \cdot C_3/C_{\sum} = 977 \cdot 10{,}8/81{,}4 = 130$

K_2HPO_4 – $G_4 = G_{\text{заг}} \cdot C_4/C_{\sum} = 977 \cdot 9/81{,}4 = 108$

Сечовина– $G_5 = G_{\text{заг}} \cdot C_5/C_{\sum} = 977 \cdot 6/81{,}4 = 72$

KH_2PO_4 – $G_6 - G_{\text{заг}} \cdot C_6/C_{\sum} = 977 \cdot 3/81{,}4 = 36$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $G_7 = G_{\text{заг}} \cdot C_7/C_{\sum} = 977 \cdot 0{,}6/81{,}4 = 7$

Стерилізація компонентів в композиціях буде проводитись в бутлях та в колбах в автоклаві, тому приймаємо $K_{\text{кон}} = 0$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде становити:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псп}} - G_{\text{заг}} = 12 - 0{,}977 = 11 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

Дріжджовий екстракт – $G_{1\text{в}} = V_{\text{в}} \cdot C_1/C_{\sum} = 11 \cdot 32/81{,}4 = 4{,}3$

Сахароза – $G_{2\text{в}} = V_{\text{в}} \cdot C_2/C_{\sum} = 11 \cdot 20/81{,}4 = 2{,}7$

Зерновий екстракт– $G_{3\text{в}} = V_{\text{в}} \cdot C_3/C_{\sum} = 11 \cdot 10{,}8/81{,}4 = 1{,}4$

K_2HPO_4– $G_{4\text{в}} = V_{\text{в}} \cdot C_4/C_{\sum} = 11 \cdot 9/81{,}4 = 1{,}2$

Сечовина– $G_{5\text{в}} = V_{\text{в}} \cdot C_5/C_{\sum} = 11 \cdot 6/81{,}4 = 0{,}8$

KH_2PO_4 – $G_{6\text{в}} = V_{\text{в}} \cdot C_6/C_{\sum} = 11 \cdot 3/81{,}4 = 0{,}4$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $G_{7\text{в}} = V_{\text{в}} \cdot C_7/C_{\sum} = 11 \cdot 0{,}6/81{,}4 = 0{,}08$

Таблиця 6.3.

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 12 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Дріжджовий екстракт	32	384	А	9,2
Вода		4,3		
Зерновий екстракт	10,8	130		
Вода		1,45		
Сахароза	20	240		
Вода		2,7		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6	7	Б	0,09
Вода		0,081		
K_2HPO_4	9	108	В	1,76
Вода		1,2		
KH_2PO_4	3	36		
Вода		0,4		
Сечовина	6	72	Г	0,88
Вода		0,8		
Конденсат		-		-
Разом:		**12**		**12**

6.2.4Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$V_{псм} = V_{кол}/(1-E_{ін}) = 1,2 /(1-0,1) = 1,33$ л.

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$V_{пск} = V_{псм}/(1+X_{кол}) = 1,33/(1+0,1) = 1,2$ л.

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, л:

$V_{пмк} = V_{псм} - V_{пск} = 1,33 - 1,2 = 0,13 = 130$ мл.

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{пс}$ складають:

$G_{заг} = V_{пск}C_{\Sigma} = 1,2 \cdot 81,4 = 98$ г, в тому числі покомпонентно, г :

Дріжджовий екстракт - $G_1 = G_{заг} \cdot C_1/C_{\Sigma} = 98 \cdot 32/81,4 = 39$

Сахароза – $G_2 = G_{заг} \cdot C_2/C_{\Sigma} = 98 \cdot 20/81,4 = 24$

Зерновий екстракт – $G_3 = G_{заг} \cdot C_3/C_{\Sigma} = 98 \cdot 10,8/81,4 = 13$

K_2HPO_4 – $G_4 = G_{заг} \cdot C_4/C_{\Sigma} = 98 \cdot 9/81,4 = 11$

Сечовина– $G_5 = G_{заг} \cdot C_5/C_{\Sigma} = 98 \cdot 6/81,4 = 7$

KH_2PO_4 – $G_6 = G_{заг} \cdot C_6/C_{\Sigma} = 98 \cdot 3/81,4 = 4$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $G_7 = G_{заг} \cdot C_7/C_{\Sigma} = 98 \cdot 0,6/81,4 = 1$

Стерилізація компонентів в композиціях буде проводитись в колбах в автоклаві, тому приймаємо $K_{кон} = 0$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде становити:

$$V_в = V_{псп} - G_{заг} = 1,2 - 0,098 = 1,1 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл.

Дріжджовий екстракт – $G_{1в} = V_в \cdot C_1/C_{\Sigma} = 0,955 \cdot 32/81,4 = 432$

Сахароза – $G_{2в} = V_в \cdot C_2/C_{\Sigma} = 0,955 \cdot 20/81,4 = 270$

Зерновий екстракт– $G_{3в} = V_в \cdot C_3/C_{\Sigma} = 0,955 \cdot 10,8/81,4 = 146$

K_2HPO_4– $G_{4в} = V_в \cdot C_4/C_{\Sigma} = 0,955 \cdot 9/81,4 = 122$

Сечовина– $G_{5в} = V_в \cdot C_5/C_{\Sigma} = 0,955 \cdot 6/81,4 = 81$

KH_2PO_4 – $G_{6в} = V_в \cdot C_6/C_{\Sigma} = 0,955 \cdot 3/81,4 = 41$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – $G_{7в} = V_в \cdot C_7/C_{\Sigma} = 0,955 \cdot 0,6/81,4 = 8$

Таблиця 6.4

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

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1,2 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Дріжджовий екстракт	32	39	А	924
Вода		432		
Зерновий екстракт	10,8	13		
Вода		146		
Сахароза	20	24		
Вода		270		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6	1	Б	9
Вода		8		
K_2HPO_4	9	11	В	176
Вода		122		
KH_2PO_4	3	4		
Вода		41		
Сечовина	6	7	Г	88
Вода		81		
Конденсат		-		-
Разом:		**1200**		**1200**

6.3. РОЗРАХУНОК МАТЕРІАЛЬНОГО БАЛАНСУ

Таблиця 6.5.

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, $дм^3$	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, $дм^3$
1	*2*	*3*	*4*	*5*
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ			
1.1.	Дріжджовий екстракт	0.039	Нестерильне ПС	1.07
1.2.	Сахароза	0.024		
1.3.	Зерновий екстракт	0.013		
1.4.	K_2HPO_4	0.011		
1.5.	Сечовина	0.007		
1.6.	KH_2PO_4	0.004		
1.7.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001		
1.8.	Вода	1.1		
	Всього:	**1.2**	Всього:	**1.2**
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ			
2.1.	Нестерильне ПС	1.2	Стерильне ПС	1,2
	Всього:	**1.2**	Всього:	1.2
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ			
3.1.	Стерильне ПС	1.2	Посівний матеріал	1.2
3.2.	Посівний матеріал з колби	0,130		
	Всього:	**1.33**	Всього:	1.33
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА			
4.1.	Дріжджовий екстракт	0.384	Нестерильне ПС	12
4.2.	Сахароза	0.240		
4.3.	Зерновий екстракт	0.130		
4.4.	K_2HPO_4	0.108		
4.5.	Сечовина	0.072		
4.6.	KH_2PO_4	0.036		
4.7.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.007		
4.8.	Вода	11		
	Всього:	**12**	Всього:	**12**

Продовження табл. 6.5

5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩАДЛЯ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА В АВТОКЛАВІ			
5.1.	Нестерильне ПС	12	Стерильне ПС	12
			(втрат немає)	0,0
	Всього:	**12**	Всього:	**12**
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ			
6.1.	Стерильне ПС	12	Посівний матеріал	12
6.2.	Посівний матеріал з колб на качалках	1.2		
6.3.	Втрати (частка)	0,1		1,2
	Всього:	**13,2**	Всього:	**13,2**
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА			
7.1.	Дріжджовий екстракт	3,8	Нестерильне ПС	**121**
7.2.	Сахароза	2,4		
7.3.	Зерновий екстракт	1,3		
7.4.	K_2HPO_4	1		
7.5.	Сечовина	0.72		
7.6.	KH_2PO_4	0.36		
7.7.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.072		
7.8.	Вода	98,2		
	Всього:	**121**	Всього:	**121**
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА			
8.1.	Нестерильне ПС	121	Стерильне ПС	**121**
8.2.	Конденсат	12	(втрат немає)	0,0
	Всього:	**121**	Всього:	**121**
9.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ			
9.1.	Стерильне ПС	121	Посівний матеріал	121
9.2.	Посівний матеріал з малого інокулятора	12		
9.3.	Втрати (частка)	0,1		12
	Всього:	**133**	Всього:	**133**
10	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
10.1.	Дріжджовий екстракт	36,2	Нестерильне ПС	**1017**
10.2.	Сахароза	22,6		
10.3.	Зерновий екстракт	12,2		
10.4.	K_2HPO_4	10,8		
10.5.	Сечовина	6,8		
10.6.	KH_2PO_4	3,4		

10.7.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.7		
10.8.	Вода	925		
	Всього:	**1017**	Всього:	**1017**
11.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА			
11.1.	Нестерильне ПС	1017	Стерильне ПС	1130
11.2.	Розбавлення конденсатом 10%	113		
	Всього:	**1130**	Всього:	**1130**
12.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ			
12.1.	Стерильне поживне середовище	1130	Культуральна рідина на фільтрацію	1125
12.2.	Посівний матеріал з посівного апарата	121		
12.3.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	125
	Всього:	**1250**	Всього:	**1250**

6.4.РОЗРАХУНОК ТА ПІДБІР ФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ ТА ЄМНІСНОЇ АПАРАТУРИ

6.4.1. Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання

6.4.1.1 ***Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів***

Приблизний загальний геометричний об’єм ферментерів при заданому $К_з = 0,6$:

$$V_{гф} = V_ф/К_з = 1,25/0,6 = 2.08 \text{ м}^3$$

Вибираємо з таблиці найближчий за номінальним об'ємом ферментер:

$$V_{нф} = 2 \text{ м}^3.$$

Кількість виробничих ферментерів при заданому $К_з$:

$$N_{фр} = V_{гф}/V_{нф} = 2.08/2 = 1.04 – \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів:

$$К_{зф} = V_ф/(V_{нф} \cdot N_{фр}) = 1,25/(2 \cdot 1) = 0,62.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,4 – 0,6), то приймаємо до установки $N_{фр}$= 1 (+ 1) запасний ферментери.

6.4.1.2. ***Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів***

Приблизний загальний геометричний об’єм посівного апарата при заданому $К_з$ = 0,6:

$$V_{гпа} = V_{па}/К_з = 133/0,6 = 221 \text{ л}$$

Вибираємо з таблиці найближчий за номінальним об’ємом посівний апарат: $V_{нпа}$ = 0,25 м^3

Кількість посівних апаратів при заданому $К_з$:

$$N_{пар} = V_{гпа}/V_{нпа} = 221/250 = 0,88 \text{ – приймаємо 1}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці посівних апаратів:

$$К_{зпа} = V_{па}/(V_{нпа} \cdot N_{пар}) = 133/(250 \cdot 1) = 0,53$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65), то приймаємо до установки $N_{фр}$= 1 (+ 1) запасний посівний апарат.

6.4.1.3. ***Уточнюючий розрахунок кількості інокулятора***

Приблизний загальний геометричний об’єм інокулятора при заданому

$К_з$ = 0,6:

$$V_{гін1} = V_{ін1}/К_з = 13,3/0,6 = 22,1 \text{ л}$$

Вибираємо з таблиці найближчий за номінальним об'ємом інокулятор: $V_{ін1}$ = 0,02 м^3 = 20 л.

Кількість інокуляторів при заданому $К_з$:

$$N_{ін1р} = V_{гін1}/V_{ін1} = 20,8/20 = 1,1 \text{ – приймаємо 1}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці інокуляторів:

$$Кзін = V_{ін1}/(V_{нін1} \cdot N_{ін1р}) = 13,3/(20 \cdot 1) = 0,65$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,4 – 0,65), то приймаємо до установки $N_{ін1р}$= 1 (+1) запасний інокулятори.

6.4.1.4. Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

Приблизний загальний необхідний об’єм качалочних колб при заданому $К_{кол}$ = 0,2:

$$V_{гкол} = V_{кол}/К_{кол} = 1,2/0,2 = 6 \text{ л.}$$

Об'єм 1 качалочної колби $V_{нкол}$ = 0,750 л.

Кількість качалочних колб при заданому $К_{кол}$ = 0,2:

$N_{кол} = V_{гкол}/V_{нкол}$ = 6/0,75 = 6 – приймаємо 6 колб.

6.4.2. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 2 м^3

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,8: $V_{Аг} = V_А/К_{зб} = 0,872/0,8 = 1,09$ м^3

Вибираємо з *Додатку 4* найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр}$ = 1,25 м^3

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Аг}/V_{нр} = 1,09/1,25 = 0,87$ од. Приймаємо - 1 од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $К_{зр} = V_А/(V_{нр}N_р) = 0,872/(1,25\cdot1) = 0,7$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

б) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,8: $V_{Бг} = V_Б/К_{зб} = 175,1/0,8 = 219$ л

Вибираємо з *Додатку 4* найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр}$ = 0,25 м^3

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить: $N_р = V_{Бг}/V_{нр} = 219/250 = 0,88$. Приймаємо – 1 од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $К_{зр} = V_Б/(V_{нр}\,N_р) = 175,1/(0,25\cdot1) = 0,7$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), то приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції Б – 1 + 1 запасний.

в) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції В. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,8: $V_{Бг} = V_Б/К_{зб} = 83,3/0,8 = 104,1$ л

Вибираємо з *Додатку 4* найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр}$ = 0,1 м^3

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить: $N_р = V_{Бг}/V_{нр} = 104,1/100 = 1,04$. Приймаємо – 1 од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $К_{зр} = V_Б/(V_{нр} N_р) = 83,3/(0,1 \cdot 1) = 0,83$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), то приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції Г – 1 + 1 запасний.

***6.4.3*Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 250 л**

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,8: $V_{Аг} = V_А/К_{зб} = 92,3/0,8 = 115,3$ л

Оскільки жоден ферментер з *Додатку 4* не підходить, то замовляємо збірник номінальним об'ємом реактор: $V_{нр}$ = 0,12 м^3

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Аг}/V_{нр} = 115,3/120 = 0,96$, приймаємо 1.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $К_{зр} = V_А/(V_{нр} N_р 0 = 92,3/(120 \cdot 1) = 0,76$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

б) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,8: $V_{Аг} = V_А/К_{зб} = 18,7/0,8 = 23,3$ л

Обираємо з *Додатку 4* збірник номінальним об'ємом реактор: $V_{нр}$ = 0,03 м^3

Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Аг}/V_{нр}$ = 23,3/30 = 0,77. Приймаємо -1 од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $K_{зр} = V_А/(V_{нр}\ N_р)$ =23,3/(30·1) = 0,7

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції Б – 1 + 1 запасний

в) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції В. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб}$ = 0,8: $V_{Бг} = V_Б/K_{зб}$ = 8,9/0,8 = 11,1 л

Вибираємо з *Додатку 4* найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр}$ = 0,01 м^3

Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить: $N_р = V_{Бг}/V_{нр}$ = 11,1/10 = 1,1. Приймаємо – 1 од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $K_{зр} = V_Б/(V_{нр}\ N_р)$ = 11,1/(15·1) = 0,85

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), то приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції В – 1 + 1 запасний.

*6.4.*4Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 20 л

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб}$ = 0,8: $V_{Аг} = V_А/K_{зб}$ = 9,2/0,8 = 11,5 л

Оскільки жоден ферментер з *Додатку 4* не підходить, то замовляємо збірник номінальним об'ємом реактор: $V_{нр}$ =0,015 м^3

Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Аг}/V_{нр}$ = 11,5/15 = 0,76, приймаємо 1.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора: $К_{зр} = V_А/(V_{нр}\ N_р0$ =9,2/(15·1) = 0,7

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу вітаміну B_2 зображено в *табл. 7.1.*

Таблиця 7.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
СМ1	СІП-мийка	1	СІП-мийка ПРОМВІТ обладнана: реактор-змішувач для миючого розчину , ємність для відпрацьованого мийного розчину (з корозійностійкої нержавіючої сталі, яке виконує завдання підготовки, нагріву і циркуляції миючих розчинів всередині технологічного обладнання і трубопроводів, без необхідності їх розбору, з метою автоматизованого видалення забруднень), дозатор та двома насосами Grundfos для CIP мийки витримують температуру до 180 °C та виготовлені з нержавіючої сталі, що дає можливість витримати агресивні миючі засоби, що зустрічаються в процесах очищення. СІП насоси мають електро-полірування, щоб забезпечити відсутність приклеювання залишків до внутрішньої поверхні.[27]

Д-2	Об’ємно- ваговий дозатор	1	МС 30 Об’ємний дозатор, точний контроль дозування, продуктивність 0,05 – 620 кг/год[28]
Р-3	Збірник для Гембару	1	Реактор з нержавіючої сталі об’ємом 2,5 $м^3$, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв (Україна)[29].
ПЗ-5	Повітрозабірник	1	Обладнений металевою сіткою для видалення механічних забруднень[30].
Ф-4	Фільтр грубої очистки	1	Фільтруючий матеріал – хімволокно ФВР, Е=90% (Україна) [31].
К-6	Компресор	1	Компресор GX7 фірми AtlasCopco (Швеція), потужність 14 л/с, робочий тиск 1 МПа [32].
Т-7	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач серії АС-13,5 фірми «Уралкомпрессормарш»(Росія) продуктивністю 13,5 $нм^3$/год [33].
Р-9	Ресивер	1	Ресиврер серії РВ 430/16 фірми «Уралкомпрессормарш» (Росія), об’єм 430 л, робочий тиск 1,6 МПа [34].
Т-9	Теплообмінник нагрівач	1	Корпуса теплообмінника ЕО фірми Airone (Росія) виготовлений із оцинкованої сталі товщиною [35].
Ф-10	Фільтр головний	1	Фільтруючий матеріал – волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е=99%[31].
Д-11	Об’ємно- ваговий дозатор	1	МС 30 Об’ємний дозатор, точний контроль дозування, продуктивність 0,05 – 620 кг/год[36]

Р-12	Реактор змішувач для композиції А	1	Реактор з нержавіючої сталі об’ємом, 1,25м^3, ø = 1000 мм, h = 2300 мм з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв[29].
Н-13	Відцентровий насос	1	Насос JET 110B з двигуном 1100 Вт, 3 м^3/год[37]
Д-15	Об’ємно- ваговий дозатор	1	МС 30 Об’ємний дозатор, точний контроль дозування, продуктивність 0,05 – 620 кг/год[36]
Н-16	Відцентровий насос	1	Насос Jebao з двигуном 36 Вт, 500 л/год[38]
Р-17	Реактор змішувач для композиції Б	1	Реактор з нержавіючої сталі об’ємом, 250 л, ø = 470 мм, h = 1200 мм з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв[29].
Д-17	Об’ємно- ваговий дозатор	1	МС 30 Об’ємний дозатор, точний контроль дозування, продуктивність 0,05 – 620 кг/год[36]
Н-18	Відцентровий насос	1	Насос Jebao з двигуном 36 Вт, 500 л/год[38]
Р-19	Реактор змішувач для композиції В	1	Реактор з нержавіючої сталі об’ємом, 100 л, ø = 320 мм, h = 650 мм з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв[29].
Д-20	Об’ємно- ваговий дозатор	1	МС 30 Об’ємний дозатор, точний контроль дозування, продуктивність 0,05 – 620 кг/год[36].
Р-22	Реактор змішувач	1	Реактор з нержавіючої сталі об’ємом, 120 л, ø = 400 мм, h = 600

	для композиції А		мм з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв[29].
Н-23	Відцентровий насос	1	Насос Jebao з двигуном 36 Вт, 500 год[38]
Д-24	Об’ємно- ваговий дозатор	1	МС 30 Об’ємний дозатор, точний контроль дозування, продуктивність 0,05 – 620 кг/год[36]
Р-26	Реактор змішувач для композиції Б	1	Реактор з нержавіючої сталі об’ємом, 30 л, ø = 300 мм, h = 525 мм з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв[29].
Д-27	Об’ємно- ваговий дозатор	1	МС 30 Об’ємний дозатор, точний контроль дозування, продуктивність 0,05 – 620 кг/год[36]
Р-28	Реактор змішувач для композиції В	1	Реактор з нержавіючої сталі об’ємом, 10 л, ø = 250 мм, h = 350 мм з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв[29].
Д-29	Об’ємно- ваговий дозатор	1	МС 30 Об’ємний дозатор, точний контроль дозування, продуктивність 0,05 – 620 кг/год[36]
ІН-31	Інокулятор	1	Ферментер «*BIOSTAT® Cplus*», виготовлений з нержавіючої сталі, об’єм 20 л, ø = 350 мм, h = 600 мм швидкість перемішування 2-1000 об/хв[39].
ІН-34	Інокулятор	1	Ферментер « Bioengineering» (Швейцарія) нержавіюча сталь, 250 л, ø = 800 мм, h = 1600 мм швидкість перемішування 8-600 об/хв[40].

ЗП-35	Засівний пристрій	1	Засівний бачок фірми Biostat® D-DCU (Німеччина) об’єм 3 л[41]
Н-40	Відцентровий насос	1	Насос багатоступінчастий Leo 0.75 кВт 46.5 м 5 $м^3$ / год (775434) відцентровий Aquatica[42]
Ф-14 Ф-21 Ф-25 Ф-30 Ф-32 Ф-33 Ф-36 Ф-38 Ф-39 Ф-41	Індивідуальні фільтри	10	Фільтри фірми « Bioengineering», типу Autosterile фільтруючий матеріал – волокно перхлорвінілової смоли, Е= 99,999 %[43]
ФР-37	Ферментер	1	Ферментер виготовлений з нержавіючої сталі фірми « Bioengineering», об’ємом 2 $м^3$, ø = 1200 мм, h = 2500 мм швидкість перемішування 220 об/хв[40].
Р-38 Р-42	Збірник культуральної рідини з мішалкою та сорочкою	1	Реактор-збірник з НЖ сталі на 2 $м^3$ з мішалкою та сорочкою, Виробник : Zhejiang, China[29]
Н-40	Відцентровий насос	1	Насос JET 110B з двигуном 1100 Вт, 3 $м^3$/год[37]
Д-39	Об’ємно- ваговий	2	МС 30 Об’ємний дозатор, точний контроль дозування,

Д-43	дозатор		продуктивність 0,05 – 620 кг/год [36]
ФЦ-41 ФЦ-44	Фільтрувальна центрифуга	2	Центрифуга HT/GMP з інвертуємим фільтром. Розвантаження осаду відбувається за допомогою інверсії фільтрувальної тканини, що дозволяє зберегти структуру кристалів. Завдяки інертизації азотом в роторі є невеликий надлишковий тиск, що запобігає витіканню суміші з центрифуги. Виготовляє фірма «Comi Condor» [44].
ВСШ-45	Вакуум-сушильна шафа	1	Вакуум-сушильна шафа СВП-500 Площа сушіння 4 $м^2$. Обладнана знімними піддонами для багаторазового сушіння продуктів. Матеріали, що контактують з продуктом, виконані із нержавіючої сталі [25].
ПМ-46	Пакувальна машина	1	Горизонтальна фасувальна машина дой-пак фірми «Volpak» потужністю 320 пакетів/хв [45].

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу вітаміну B_2 включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез вітаміну рибофлавніу *B.subtillis* GM44/pMX45).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину каустичної соди

Для миття обладнання та комунікацій протягом 1 циклу необхідно 2,3 $м^3$ мийного засобу (див. розд. 2). Робочий розчин каустичної соди (2 %) готують в установці CIP-мийка. Для цього зважують за допомогою об'ємно-вагового дозатора 52 кг каустичної соди, додають 2248 л води та вмикають перемішуючий пристрій на 30 хв.(СМ1)

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину Гембару

Зі складу надходить концентрат Гембару (25 %), який розводять водою до потрібної концентрації (0,5 %). Готують у збірнику(Р3) об'ємом 800 л. Щоб отримати 560 л (0,5 %) розчину Гембару наливають 24 л 25% Гембару та 536 л водопровідної води і вмикають перемішуючий пристрій на 30 хв.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

На підприємстві з метою дотримання чистоти проводять щоденне та генеральне прибирання (1 раз на місяць) приміщень.

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Щоденне прибирання приміщень проводять після кожної зміни вологим способом. Його проводять у виробничих, лабораторних, підсобних і побутових приміщеннях. При проведенні вологого прибирання використовують 0,5 % робочий розчин Гембар *(від ДР 1.1.2).*

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання приміщень.

Генеральне прибирання проводять раз у місяць 0,5 %–м робочим розчином «Гембар» (*від ДР 1.1.2*.). Стіни, двері, стелі, та інші поверхні зрошують з гідропульту 0,5 % розчином Гембару з розрахунку 100 мл/м^2. Після закінчення зрошення приміщення закривають на 30-40 хвилин, після цього вилучають надлишок розчину за допомогою губки. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином.

ДР 1.3. Підготовка технічного обладнення та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття обладнання

Для миття ємнісного обладнання використовують станцію CIP – мийки, питну воду і 2 %–й робочий розчин каустичної соди *(від ДР 1.1.1.).*

ДР 1.3.2. Ополіскування обладнення

Після миття ємнісного обладння ополіскування здійснюють водою, протягом 30 хвилин, для виключення можливості нанесення шкоди здоров'ю персоналу розчином лугу.

ДР 1.3.3. Технічний огляд

Перед процесом стерилізації проводять візуальний технологічний огляд обладнання на наявність пошкоджень, вм'ятин, впадин, в яких можуть залишатись залишки можливого забруднення, що може призвести до перехресної контамінації. Всі знайдені несправності усувають.

ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність

Після проведення миття та ремонтних робіт перевіряють обладнання на герметичність, для цього в апарат вносять невелику кількість леткої галогенвмісної речовини, закривають усю запірну арматуру, нагрівають апарат до температури 80 ^{0}С і подають аераційне повітря до надлишкового тиску 0,2 МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря, фіксують покази манометра і витримують апарат 30–60 хв. Після закінчення часу витримки звіряють покази манометра, якщо різниця менше 0,01 МПа, то апарат вважають герметичним. При більшому відхилені починають пошук нещільностей шляхом перевірки усіх місць з'єднань за допомогою галогенного течієпошукача. При наближені щупа течієпошукача до нещільності фіксуються пари галогенвмісної речовини, що засвідчує наявність нещільності. При знаходженні усіх нещільностей їх усувають шляхом підтягування різьбових з'єднань або замінюють прокладки. Потім апарат знову перевіряють на герметичність.

ДР 1.3.5. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають глуху пару і нагрівають його до 80–90 ^{0}С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130–135 ^{0}С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 ^{0}С і надлишкового тиску Р = 0,003–0,005 МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Забір атмосферного повітря для аерації здійснюють на висоті 11 м пристроєм для забору повітря(ПЗ5).

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення

Після забору атмосферного повітря, воно очищується від грубого аерозолю на фільтрі грубої очистки(Ф4). Ступінь очищення – 90 %.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Зважаючи на потребу у великій кількості підготовленого аераційного повітря, необхідно здійснити його накопичення. Для цього повітря стискають у компресорі(К6) до 0,35 МПа, стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250 ^{0}С і збільшення вмісту вологи.

ДР 2.4. Охолодження повітря

Зважаючи на те, що температура повітря після накопичення становить 120-250 ^{0}С його необхідно «охолодити» до комфортного зачення. Тому, стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі повітря(Т7) до температури 25 ^{0}С для відведення надлишкової вологи.

ДР 2.5. Видалення зайвої вологи

Зважаючи на те, що після охолодження з’являється зайва волога у вигляді конденсату, то її необхідно видалити. Повітря подають на ресивер(Р8) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи (W = 60 %).

ДР 2.6. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря підігрівають до 35 ^{0}С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють у теплообміннику(Т9).

ДР 2.7. Очищення на головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі(Ф10). Ступінь очищення – 96 %. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

ДР 2.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,999 %.

ДР 3. Приготування титрувальних агентів

Оскільки для ефективнішого культивування нашого продуцента потрібно підтримувати стабільне pH в межах 7±0,2, нам необхідно підготувати відповідні розчини для підтримки pH(титранти).

ДР 3.1. Приготування і стерилізація розчину гідроксиду натрію

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування розчинів 6 % NaOH наведений у *табл. 5.1*.

Таблиця 8.1.

Розрахунок кількості кристалічного NaOH і води питної для приготування 6 %–го розчину NaOH для підлужнення середовища

Об'єм середовища, який необхідно підлужнити	**Об'єм 6% розчину NaOH для підлужнення**	**Тара, в якій готується, стерилізується і зберігається 6 % розчин NaOH**	**Маса кристалічного NaOH**	**Об'єм води питної**
Для композиції Б				
19 л	38 мл	Колба, 50 мл	1,14 г	37 мл
175 л	350 мл	Колба, 500 мл	10,5 г	339,5 мл
Для підтримання pH= 7±0,2				
120	240 мл	Колба, 500 мл	7	233
1330	2660 мл	1 колба, 3 л	80	2580

ДР 3.1.1. Приготування розчину гідроксиду натрію для запобігання випадання солей в осад в реакторі-змішувачі об'ємом 30 л

Для приготування 38 мл 6 % розчину гідроксиду натрію на технічних вагах зважують 1,14 г NaOH. Наважку переносять в колбу об'ємом 50 мл. Мірним циліндром вимірюють 37 мл дистильованої води та доливають в колбу до лугу, перемішують, закривають ватно – марлевою пробкою та переливають в реактор-змішувач об'ємом 30л(до ДР4.3.2.).

ДР 3.1.2. Приготування розчину гідроксиду натрію для запобігання випадання солей в осад в реакторі-змішувачі об'ємом 250л

Для приготування 350 мл титрувального розчину зважують на технічних вагах 10,5 г NaOH. Наважку переносять в колбу об'ємом 500мл. Мірним циліндром вимірюють 339,5 мл дистильованої води та доливають в колбу до лугу, перемішують, закривають ватно–марлевою пробкою та переливають в реактор-змішувач об'ємом 30л(до ДР4.4.2).

ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація розчину гідроксиду натрію для підлужнення в посівному апараті об'ємом 200 л

Для приготування 240 мл 6 % розчину гідроксиду натрію на технічних вагах зважують 7 г NaOH. Наважку переносять в колбу об'ємом 500 мл. Мірним циліндром вимірюють 233 мл дистильованої води та доливають в колбу до лугу, перемішують, закривають ватно – марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131 °С (0,15 МПа). Після стерилізації гідроксид натрію вносять до посівного апарату(до ДР)

ДР 3.1.4. Приготування та стерилізація розчину гідроксиду натрію для підлужнення в виробничому ферментері об'ємом 2000 л

Для приготування 2660 мл 6 % розчину гідроксиду натрію на технічних вагах зважують 80 г NaOH. Наважку переносять в 3 колби об'ємом 1000 мл. Мірним циліндром вимірюють 2580 мл дистильованої води та доливають в колби до лугу, перемішують, закривають ватно – марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131 °С (0,15 МПа). Після стерилізації гідроксид натрію вносять до виробничого ферментера(до ДР)

ДР 3.2. Приготування розчину хлоридної кислоти

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування розчинів 6 % HCl наведений у *табл. 5.2*.

Розрахунок кількості HCl і води питної для приготування 6 %–го розчину HCl для підлужнення середовища

Таблиця 8.2.

Об'єм середовища, який необхідно підлужнити	**Об'єм 6% розчину HCl для підкислення**	**Тара, в якій готується і зберігається 6 % розчин HCl**	**Маса HCl**	**Об'єм води питної**
120	240 мл	Колба, 500 мл	7	233
1330	2660 мл	3 колби 1 л	80	2580

Розрахунок кількості HCl і води питної для приготування 6 %–го розчину HCl для підлужнення середовища

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація розчину соляної кислоти для підлужнення в посівному апараті об'ємом 200 л

Для приготування 240 мл 6 % розчину соляної кислоти доливають 7 мл HCl 13% розчину соляної кислоти. Наважку переносять в колбу об'ємом 500 мл. Мірним циліндром вимірюють 233 мл дистильованої води та доливають в колбу до лугу, перемішують, закривають ватно – марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131 °С (0,15 МПа). Після стерилізації соляну кислоту вносять до посівного апарату(до ДР)

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація розчину соляної кислоти для підлужнення в виробничому ферментері об'ємом 2000 л

Для приготування 2660 мл 6 % розчину соляної кислоти доливають 80 мл HCl 13% розчину соляної кислоти. Наважку переносять в 3 колби об'ємом 1000 мл. Мірним циліндром вимірюють 2580 мл дистильованої води та

доливають в колби до лугу, перемішують, закривають ватно – марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131 °С (0,15 МПа). Після стерилізації соляну кислоту вносять до виробничого ферментера(до ДР)

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживних середовищ для колб на качалках

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл. 5.1.*

Таблиця 8.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,2 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1,2 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Дріжджовий екстракт	32	39	А	924
Вода		432		
Зерновий екстракт	10,8	13		
Вода		146		
Сахароза	20	24		
Вода		270		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6	1	Б	9
Вода		8		
K_2HPO_4	9	11	В	176
Вода		122		
KH_2PO_4	3	4		
Вода		41		
Сечовина	6	7	Г	88
Вода		81		
Конденсат		-		-
Разом:		**1200**		**1200**

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 24 г сахарози, 13 г зернового екстракту та 39 г дріжджового екстракту. Наважку переносять у колбу об'ємом 2 л, добавляють 924 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 30 хв і тиску 0,05МПа.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 1 г $MgSO_4$ х $7H_2O$. Розчиняємо у 8 мл питної води, переносимо у колбу об'ємом 50 мл. Закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізуємо у автоклаві протягом 40 хв, за температури 131 °С і тиску 0,15МПа.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 11 г K_2HPO_4 , 4 KH_2PO_4. Розчиняють у 163 мл питної води, переносимо у колбу об'ємом 500 мл. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві протягом 40 хв, за температури 131 °С і тиску 0,15МПа.

ДР 4.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 7 г сечовини. Розчиняють у 80 мл питної води, переносять у колбу об'ємом 250 мл. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві протягом 30 хв, за температури 112 °С і тиску 0,05МПа.

ДР 4.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 20 л інокулятора

Для вирощування інокуляту потрібно 12 л поживного середовища. Враховуючи, об'єм рідкого посівного матеріалу - 1,2 л, загальна кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становить 10,8 л. Вміст компонентів для приготування 12 л середовища наведено в *табл. 5.4*

Таблиця 8.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 12 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 12 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Дріжджовий екстракт	32	384	А	9,2
Вода		4,3		
Зерновий екстракт	10,8	130		
Вода		1,45		
Сахароза	20	240		
Вода		2,7		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6	7	Б	0,09
Вода		0,081		
K_2HPO_4	9	108	В	1,76
Вода		1,2		
KH_2PO_4	3	36		
Вода		0,4		
Сечовина	6	72	Г	0,88
Вода		0,8		
Конденсат		-		-
Разом:		**12**		**12**

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 240 г сахарози, 130 г зернового екстракту та 384 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають в інокулятор(ІН31) об'ємом 20л. Після цього в інокулятор(ІН31) заливають 8,45 л питної води. Стерилізують подаванням гострої пари, при температурі 112°С упродовж 30 хв і тиску 0,05МПа.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 7 г $MgSO_4 \times 7H_2O$. Наважку поміщають в колбу об'ємом 250 л, добавляють 81 мл питної води, перемішують та поміщають в автоклав. Стерилізують в автоклаві за температури 131°С протягом 40 хв і тиску 0,15МПа.

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 108 г K_2HPO_4 , 36 KH_2PO_4. Наважки поміщають у дві колбу об'ємом 2 л, добавляють 1200 мл питної води , перемішують та поміщають в автоклав. Стерилізують в автоклаві за температури 131°С протягом 40 хв і тиску 0,15МПа.

ДР 4.2.4. Приготування і стерилізація композиції Г

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 72 г сечовини. Наважку поміщають у 1 колбу об'ємом 2 л, добавляють 800 мл питної, перемішують на поміщають в автоклав. Стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С протягом 30 хв і тиску 0,05МПа.

ДР 4.3 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 200 л інокулятора

Для вирощування інокуляту потрібно 120 л поживного середовища. Враховуючи, об'єм рідкого посівного матеріалу - 12 л, загальна кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становить 108 л. Вміст компонентів для приготування 12 л середовища наведено в *табл. 5.5*

Таблиця 8.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 120 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 120 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Дріжджовий екстракт	32	3,8	А	92,3
Вода		38,6		
Зерновий екстракт	10,8	1,3		
Вода		13		
Сахароза	20	2,4		
Вода		24		
Конденсат		***9,2***		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6	0,072	Б	18,7
Вода		0,72		

K_2HPO_4	9	1		
Вода		10,8		
KH_2PO_4	3	0,36		
Вода		3,6		
Конденсат		***1,9***		
Сечовина	6	0,72	В	8,9
Вода		7,2		
Конденсат		***1***		
Загальний конденсат		12		12
Разом:		**120**		**120**

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об`ємно-ваговий дозатор(Д24) у збірник(Р22) об'ємом 120 л відважують 2,4 кг сахарози, 1,3 кг зернового екстракту та 3,8 кг дріжджового екстракту. Після цього у збірник заливають 84,8 л питної води враховуючи конденсат. Стерилізують подаванням гострої пари, яка подається в нижній спуск апарату при температурі 112°С упродовж 30 хв і тиску 0,05МПа.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об`ємно-ваговий дозатор(Д27) у збірник(Р26) об'ємом 30л відвантажують 72 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1 кг K_2HPO_4, 0,36 кг KH_2PO_4, після цього добавляють 16,9 л питної води, враховуючи конденсат, додають соляну кислоту(від ДР3.1.1), для запобігання випадання солей в осад та вмикають мішалку, після перемішування її вимикають. Після перемішування суміш подають самопливом до ферментера(), де її стерилізують подаванням гострої пари , при температурі 131°С упродовж 40 хв і тиску 0,15МПа.

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

Через об`ємно-ваговий дозатор(Д29) у збірник(Р28) об'ємом 15 л відважують 0,72 кг сечовини. Заливають 8,2 л питної води, вмикають мішалку, після перемішування її вимикають. Стерилізують у збірнику при температурі 112 °С протягом 30 хв і тиску 0,05МПа.

ДР 4.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого ферментера об'ємом 2 м³.

Для вирощування інокуляту потрібно 1130 л поживного середовища. Враховуючи, об'єм рідкого посівного матеріалу - 120 л, загальна кількість води, яка необхідна для приготування поживного середовища становить 1010 л. Вміст компонентів для приготування 1130 л середовища наведено в *табл. 5.6*

Таблиця 8.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1130 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1,13 м^3 середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Дріжджовий екстракт	32	36,2	А	871,7
Вода		363,6		
Зерновий екстракт	10,8	12,2		
Вода		122,8		
Сахароза	20	22,6		
Вода		227,3		
Конденсат		***87,1***		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6	0,7	Б	175,1
Вода		6,9		
K_2HPO_4	9	10,8		
Вода		102,3		
KH_2PO_4	3	3,4		
Вода		34,1		
Конденсат		***17,6***		
Сечовина	6	6,8	В	83,3
Вода		68,2		
Конденсат		***8,3***		
Загальний конденсат		113		113
Разом:		**1130**		**1130**

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об`ємно-ваговий дозатор(Д11) у збірник(Р12) об'ємом 1,25 м^3 відважують 22,6 кг сахарози, 12,2 кг зернового екстракту та 36,2 кг дріжджового екстракту. Після цього у збірник заливають 801 л питної води

враховуючи конденсат. Стерилізують подаванням гострої пари, яка подається в нижній спуск апарату при температурі 112°С упродовж 30 хв.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об`ємно-ваговий дозатор(Д15) у збірник(Р17) об'ємом 250 л На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 0,7 кг $MgSO_4 \times 7H_2O$, 10,8 кг K_2HPO_4, 3,4 кг KH_2PO_4. Наважку поміщають у збірник об'ємом 250 л, добавляють 161 л питної води, враховуючи конденсат, додають соляну кислоту (від ДР3.1.2), для запобігання випадання солей в осад та вмикають мішалку, після перемішування її вимикають. Після перемішування суміш подають самопливом до ферментера, де її стерилізують подаванням гострої пари , при температурі 131°С упродовж 40 хв і тиску 0,15МПа.

ДР 4.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

Через об`ємно-ваговий дозатор(Д20) у збірник(Р19) об'ємом 100 л відважують 6,8 кг сечовини. Заливають 68,2 л питної води, вмикають мішалку, після перемішування її вимикають. Стерилізують у збірнику при температурі 112 °С протягом 30 хв і тиску 0,05МПа.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП.5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bacillus subtilis* GM44/pMX45 зберігають у пробірках зі скошеним агаром в холодильнику при від 3 до 5°С.

Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Всі роботи за колекційною культурою проходять суворо в асептичних умовах

ТП 5.2. Одержання робочої культури з колекційної

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках на середовищі скошеного агару, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі і вирощують при температурі 37 °С упродовж 18 год.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані з ізольованих колоній (від *ТП 4.2*) пересівають петлею в пробірки зі скошеним агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 48 год.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у завчасно підготовлену колбу об'ємом 2 л в асептичних умовах вносять 924 мл розчину композиції А (від *ДР 4.1.1*), 9 мл розчину композиції Б (від *ДР 4.1.2*), 176 мл композиції В (від *ДР 4.1.3*) та 88 мл композиції Г (від *ДР 4.1.4*). Перемішують і розливають по 200 мл в 6 стерильних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з культурою *Bacillus subtilis* GM44/pMX45, вирощеною на агаризованому середовищі, вносять 10 мл стерильної питної води, за допомогою петлі суспендують клітини і піпеткою в асептичних умовах відбираюсть одержану суспензію та вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують біомасу, одержану з однієї пробірки.

Культивування здійснюється у колбах на качалці (220 об/хв) при 37-40°С упродовж 35-40 год.. Проводять мікробіологічний контроль.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л.

В інокулятор(ІН31) об'ємом 20 л з 9,2 попередньо простерилізованою в інокуляторі композицією А (від *ДР 4.2.1*), в асептичних умовах вносять 1,76 л композиції В (від *ДР 4.2.3*) та 0,9 л композиції Г (від *ДР 4.2.4*) та перекачують посівний матеріал із засівної колби через патрубок відкривши вентиль (від *ТП 5.4*) і вмикають перемішуючий пристрій. У ферментер подається стерильне стиснуте повітря (від ДР 2.8), а виводиться відпрацьоване. У сорочку ферментера подається гаряча, а також виводиться оборотна вода.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 38-40 °С, тривалість – 35-40 год. Швидкість перемішування становить 220 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують самопливом в інокулятор об'ємом 200 л.

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 250 л.

В посівний апарат(ІН34) об'ємом 250 л з 18,7 л попередньо простерилізованою гострою парою композицією Б (від *ДР 4.3.2*) в асептичних умовах вносять 8,9л композиції В (від *ДР 4.3.3*) та 92,3 л стерильного розчину композиції А (від *ДР 4.3.1*) та перекачують посівний матеріал з інокулятора(ІН31) самолином (від *ТП 5.5*) і вмикають перемішуючий пристрій. У ферментер подається стерильне стиснуте повітря (від ДР 2.8), а виводиться відпрацьоване. У сорочку ферментера подається гаряча вода, а також виводиться оборотна вода.

Температура вирощування посівного матеріалу в виробничому ферментері – 38-40 °С, тривалість – 35-40 год. Швидкість перемішування становить 220 об/хв та pH 7±0,2 значення якого кореагували за допомогою 6% водного гідроксиду натрію(від ДР3.1.3) і 6% розчину соляної кислоти (від ДР3.2.1). Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискування в виробничий ферментер об'ємом 2000 л.

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування

В попередньо простерилізований ферментер(ФР37) об'ємом 2 м^3 з 175,1 л простерилізованою гострою парою композицією Б (від *ДР 4.4.2*), в аспетичних умовах вносять 83,3 л стерильного розчину композиції В (від *ДР 4.4.3*) в асептичних умовах вносять 872 л стерильного розчину композиції А (від *ДР 4.4.1*) та перекачують посівний матеріал із посівного апарату(ІН34)

через трубу перетискування (від *ТП 5.6*). У ферментер подається стерильне стиснуте повітря (від ДР 2.8), а виводиться відпрацьоване. У кожух ферментера подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода. Перемішуючим пристроєм слугує турбінна мішалка відкритого типу, якою обладнаний ферментер. Швидкість перемішування становить 220 об/хв. Тривалість виробничого культивування становить 70 годин при температурі 38-40 °С та pH 7±0,2 значення якого кореагували за допомогою 6% водного гідроксиду натрію(від ДР3.1.4) і 6% розчину соляної кислоти (від ДР3.2.2).

Кожні 5-6 годин відбирають проби для аналізу процесу ферментації (концентрації біомаси, кількість вуглецю і азоту) у культуральній рідині.

Процес ферментації проводили в умовах високої аерації і закінчили при досягненні вмісту рибофлавіну до 21 г/л.

ТП7.Виділення рибофлавіну

ТП.7.1 Осадження

Культуральну рідину (КР) перекачують із виробничого ферментера ФР- за допомогою відцентрового насоса Н-40 до збірника культуральної рідини З-38. Для зниження концентрації рибофлавіну, що знаходиться в розчиненому стані, в культуральну рідину при безперервному перемішуванні без доступу повітря додають гідросульфіт, натрію (який є відновником) в співвідношенні 1: 1 по відношенню до рибофлавіну. При цьому випадає осад зеленого кольору, властивий лейкофлавіну.

ТП 7.2 Центрифугування

Після розчинення суспензію відцентровим насосом Н-40 перекачують до центрифуги Ц-41 де її центрифугують при 10-15 ° С. Фугат зливають в каналізацію.

ТП 7.3 Автоліз

Осад далі піддають автолізу. Для цього до осаду додають оцтову кислоту і етилацетат (1,2-1,3 і 0,7-0,8% відповідно по відношенню до обсягу осаду.

Процес проводять при вільному доступі кисню при безперервному перемішуванні і температурі 45-50 °С протягом 20-24 год. При цьому лейкорібофлавін окислюється до рибофлавіну, що супроводжується переходом зеленого забарвлення в жовте.

ТП 7.4 Розбавлення водою

Після закінчення автолізу автолізат розводять водою в 2-2,5 рази за обсягом до змісту сухих речовин 10-12% водопровідною водою

ТП 7.5 Центрифугування

Розбавлений автолізат переносять до центрифуги Ц-44 де його центрифугують з метою відокремлення осаду, що містить рибофлавін

ТП 8 Отримання сухої субстанції рибофлавіну

ТП 8.1 Вакуумна сушка

Кристали завантажують вручну на піддони вакуум-сушильної шафи ВСШ-45. Сушіння відбувається при температурі 80 – 90 ºС та при тиску, нижчому за атмосферний. Висушені кристали рибофлавіну передаються на стадію ПМВ 4.

ПМВ 9. Упаковка субстанції в ламіновані алюмінієві мішки

Кристали рибофлавіну упаковують в ламіновані алюмінієві мішки по 5 кг за допомогою пакувальної машини ПМ-46. Після пакування розфасована субстанція пакується у вторинну упаковку – картонні туби. Туби відправляються на склад.

ЗВ 10. Знешкодження відходів

ЗВ 10.1. Знешкодження рідких відходів

Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води стерилізують і нейтралізують. Надалі їх спрямовують на очисні споруди.

ЗВ 10.2. Знешкодження газоподібних відходів

Очищення викидів з ферментерів здійснюють за допомогою скруберів.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1 Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль передбачає: забезпечення і підтримання умов, необхідних для нормальної життєдіяльності мікроорганізмів-продуцентів; контроль виробничого процесу та готової продукції; своєчасне виявлення контамінації та встановлення джерела її появи[46].

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованим середовищем і аналізується за допомогою світлової мікроскопії.

Протягом вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу відбирають кожні 8 годин проби культуральної рідини для аналізу. Відібрані проби мікроскопіюють. З метою виявлення можливих заражень здійснюється посів проб на чашки Петрі з агаризованими середовищами .

Критерієм чистоти культури є однорідність виросліх колоній штаму *Bacillus subtilis* GM44/pMX45, та відсутність колоній інших мікроорганізмів. Посіви інкубують декілька діб при температурі 37°С на середовищах. У процесі вирощування штам утворює сухі, дробнозморшкуваті колонії, бархатисті, безбарвні або рожеві. Край колонії хвилястий.

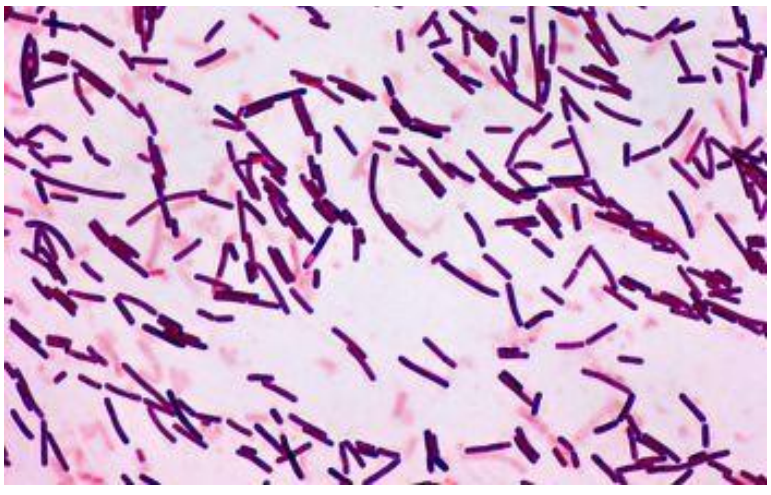


Рис.6.1.Колонії *B.subtilis* під мікроскопом[47]

Також проводять мікробіологічний контроль чистоти поживного середовища. Для цього в асептичних умовах відбирають пробу (з колб – за допомогою піпетки, з інокулятора та ферментера – за допомогою пробовідбірника). Далі наливають по кілька крапель у чашки Петрі з агаром, розподіляють по поверхні чашки і ставлять у термостати на 30°С та 37°С. Підтвердженням чистоти є відсутність будь-якої мікробіоти.

9.2. Визначення концентрації біомаси.

Концентрацію біомаси визначаємо за оптичною густиною клітинної суспензії із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком [48].

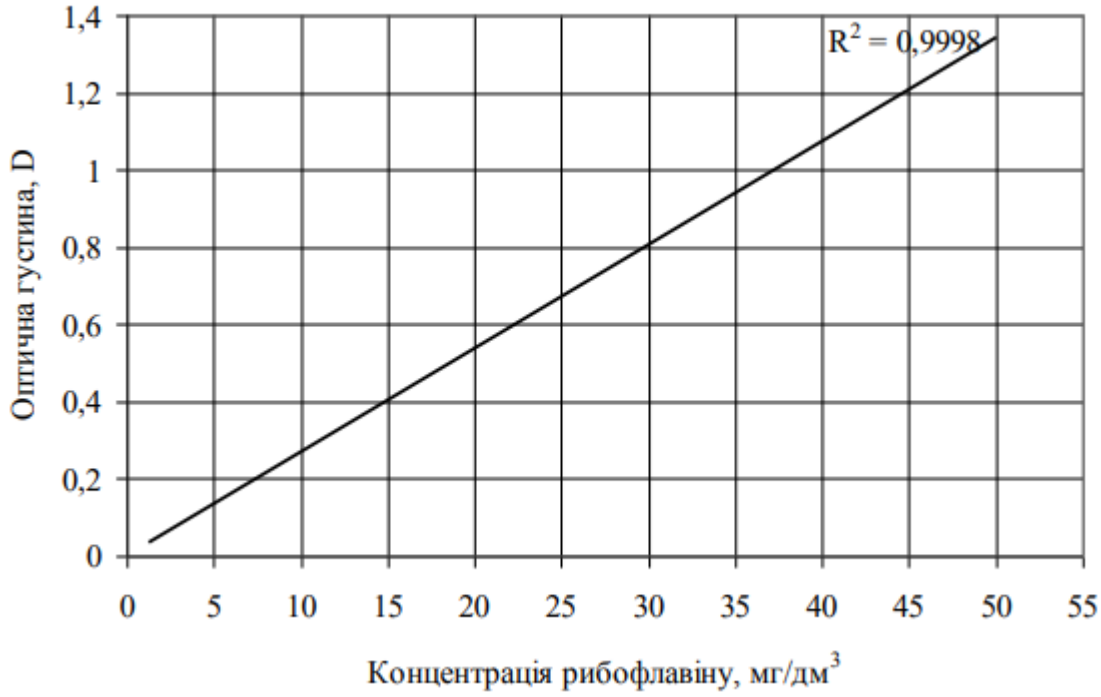
У пробірки із 9 мл стерильної водопровідної води вносимо по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина (при 540 нм), отримані дані перераховують за калібрувальним графіком [48].

9.3 Визначення концентрації рибофлавіну

Згідно з патентом[5] кількість насинтезованого рибофлавіну визначали спектрофотометрично при 464 нм.

Суть методу грунтується на здатності рибофлавіну відбивати флуорисцентне випромінювання за частоти хвилі 450-520 нм

Зразок для визначення готують наступним чином: з ферментера відбирають пробу культуральої рідини. Для визначення беруть 1мл культуральної рідини і вносять у мірну колбу 5мл. Далі додаємо рівний об’єм 20% ТХО та інкубуємо у темноті при +38ºС протягом 12 годин. Через наявність заважаючих пігментів до трихлороцтового екстракту додавали по краплям насичений розчин перманганату калію до фіолетового забарвлення (1–2 краплі), що не зникає. Надлишок перманганату видаляли додаванням по краплям 3% перекису водню до повного зникнення фіолетового забарвлення, після цього пробу доводили 0,1 М фосфатним буфером до мітки 5 см3 . Визначення проводили спектрофотометрично при 464 нм в кюветі 1 $см^3$. Вміст рибофлавіну визначали за калібрувальним графіком[49].



9.4 Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в середовищі є сахароза. Її вміст будемо визначати за допомогою біосенсорів. Концентрація даного джерела вуглецю визначається методом з використанням біосенсорів з інвертазою та амперометричним датчиком.

$$\text{Сахароза} \xrightarrow{\text{інвертаза}} \beta\text{-D-фруктоза} +$$

$$+ \alpha\text{-D-глюкоза} \xrightarrow{\text{мутаротаза}} \beta\text{-D-глюкоза} + O_2 \rightarrow$$

$$\xrightarrow{\beta\text{-глюкозооксидаза}} \text{Глюколактан} + H_2O_2;$$

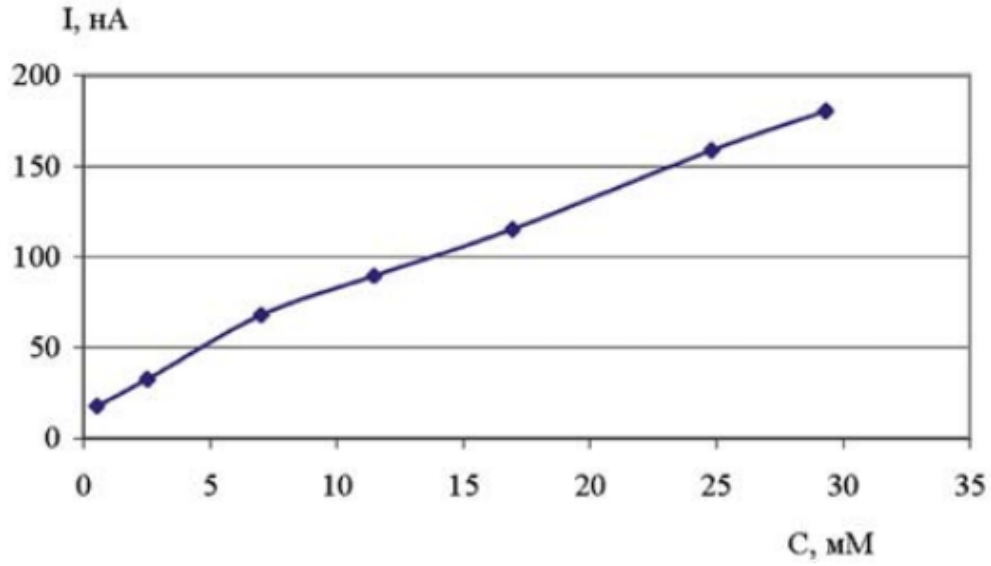
Принцип роботи біосенсора базується на тому, що аналізована речовина дифундує через напівпроникну мембрану тонкого шару біологічного матеріалу, в якому відбувається реакція з утворенням відповідних електрохімічних продуктів, що піддаються окисненню або відновленню на електродах. Селективність біосенсора залежить від природи чутливого шару.

Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 1500 об/хв 15-20 хв, далі відцентрифуговану суспензію фільтрують через фільтрувальний папір, фільтрат відбирають у окрему ємність для аналізів.

Відбирається 10 мл проби, його розводять у 250-1000 разів, далі від розведеного розчину відбирають 5-10 мл і переносять у 20 мл 20 мМ буферного розчину системи: KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 з pH 7.2. До даної системи додають інвертазу.

Вимірювання концентрації сахарози здійснюється за допомогою амперометричного перетворювального приладу

Величина, що вимірюється - це сила струму, що визначається у нА. Концентрацію глюкози визначають за градуювальним графіком залежності сили струму (нА) і концентрації глюкози (мМ)



9.5. Визначення концентрації амінного азоту.

Джерелом азоту в ферментаційному середовищі є джіжджовий екстракт, тому необхідно визначати амінний азот у середовищі.

а вільні карбоксильні групи, що залишилися Метод формольного титрування (або титрування по Серенсену). Суть методу полягає в тому, що аміногрупи амінокислот блокуються формальдегідом,титрують лугом. За кількістю витраченого на титрування лугу визначають кількість СООН -

груп. В середньому число карбоксильних груп в амінокислотах приймають рівним числу аміногруп (що цілком справедливо для моноамінокислот, для диамінокислот вводяться відповідні поправки в методику титрування).

Для визначення амінного азоту до 1 мл супернатанту культуральної рідини додають воду до загального об'єму 10 мл. При необхідності розчин нейтралізують потенціометрично до pH 7,0, шляхом додавання 0,1 М розчину натрію гідроксиду або 0,1 М розчину соляної кислоти. Після закінчення нейтралізації додають 2 мл розчину формальдегіду 35%, нейтралізованого в день аналізу 10% розчином натрію гідроксиду до pH 7,0, перемішують і титрують 0,1 М розчином натрію гідроксиду до значення pH 9, 1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо рожевого забарвлення (індикатор - 1% розчин фенолфталеїну). Паралельно проводять контрольний дослід (паралельно титрують дистильовану воду).

1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 1,4 мг амінного азоту[50].

9.6 Показники готового продукту

9.6.1Кількісне визначення рибофлавіну

Кількісне визначення рибофлавіну проводять при слабкому освітленні. 65,0 мг субстанції поміщають в мірну колбу коричневого скла місткістю 500 мл і суспендують у 5 мл води. Коли субстанція цілком змочена, додають 5 мл розчину натрію гідроксиду розведеного і перемішують до повного розчинення. Потім додають 100 мл води і 2,5 мл кислоти оцтової льодяної і доводять об'єм розчину до 500 мл. 20 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу з коричневого скла місткістю 200 мл, додають 3,5 мл розчину 14 г/л натрію ацетату і доводять об'єм розчину водою до 200 мл. Вміст рибофлавіну обчислюють, використовуючи питомий показник поглинання, що становить 328. Оптичну густину одержаного розчину вимірюють за довжини хвилі 444 нм[7].

9.6.2. Визначення кислотності або лужності

Для визначення кислотності або лужності рибофлавіну до 0,5 г субстанції додають 25 мл води, кип’ятять протягом 2 хв, охолоджують і фільтрують. До 10 мл фільтрату додають 0,05 мл розчину фенолфталеїну і 0,4 мл 0,01 М розчину натрію гідроксиду; з’являється оранжеве забарвлення. До одержаного розчину додають 0,5 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої; з’являється жовте забарвлення, що переходить в оранжеве при додаванні 0,15 мл розчину метиленового червоного[7].

9.6.3. Визначення питомого оптичного обертання

Питоме оптичне обертання повинно становити від -115° до -135 °, у перерахунку на суху речовину. Для його визначення 50 мг субстанції розчиняють у 0,05 М розчині натрію гідроксиду, вільного від карбонатів, і доводять об’єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл. Оптичне обертання одержаного розчину вимірюють не більше як через 30 хв з моменту розчинення[7].

9.6.4. Визначення оптичної густини

Для визначення оптичної густини використовують розчин, приготований для кількісного визначення рибофлавіну (див. п.п. 4.2). Оптичну густину одержаного розчину вимірюють за довжини хвилі 444 нм[7].

9.6.5. Втрата в масі при висушуванні

Втрати в масі повинні становити не більше 1,5 %. 1 г субстанції сушать при температурі 100 – 105° С[7].

9.7. Карта постадійного контролю

Карта постадійного контролю біосинтезу рибофлавіну

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	*2*	*3*	*4*	*5*
ДР 1. Санітарна підготовка виробництва				
ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих засобів				
Кх 1.1.1 Приготування робочого розчину каустичної соди	Концентрація робочого розчину каустичної соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	С = 2%
Кх 1.1.2 Приготування робочгго розчину Гембару	Концентрація робочого розчину Гембару	Хімічний метод	Після приготування розчину	С = 0,5%
ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень				
ДР 1.3 Підготовка технологічного обладнання та комунікацій				
Кт 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура розчину, тривалість, чистота	Годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	τ = 1–2 год, чисте обладнання
Кт 1.3.2 Технічний оглід	Оладнання	Візуальний огляд	Під час огляду	Відсутність неспавностей
Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання,	Манометр технічний, термометр, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на	Р = 0,1- 0,2 МПа,

	температура, тиск, час, перепад тиску		герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	τ = 30–60 хв,
Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, термометр, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	P = 0,2 МПа, t = 110 °С, τ = 1,5 год
ДР 2 Підготовка аераційного повітря				
Кт 2.2 Попередня груба фільтрація	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 70 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Подача повітря на компресор	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,35 МПа t = 120 °С
Кт 2.4 Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, повітря після видалення зайвої вологи, температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 25 ^{0}C, W = 60 %
Кт 2.5 Підігрів повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 30-35 °С
Кт 2.6 Тонка фільтрація повітря	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	E = 97 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.7 Очищення повітря на	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,995 %

індивідуальних фільтрах		паспорту фільтра		
ДР 3. Підготовка титрувальних агентів				
ДР 3.1 Приготування 6%-го розчину соляної кислоти				
Кх 3.1.1 Приготування розчину соляної кислоти для запобігання випаданню солей в осад у збірнику об'ємом 30 л	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
Кх 3.1.2 Приготування розчину соляної кислоти для запобігання випаданню солей в осад у збірнику об'ємом 250 л	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
Кх3.1.3 Приготування розчину соляної кислоти для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 250 л	Температура стерилізації, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину HCl	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	t = 131 ^{0}C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, C = 6 %

Кх 3.1.4 Приготування розчину соляної кислоти для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 2 $м^3$	Температура стерилізації, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину HCl	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	t = 131 ^{0}C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, С = 6 %
ДР 3.2 Приготування та стерилізація 6%-го розчину гідроксиду натрію				
Кх, Км, Кт 3.2.1 Приготування і стерилізація розчину NaOH для підлужнення середовища, для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 250 л	Температура стерилізації, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину NaOH	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	t = 131 ^{0}C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, С = 6 %
Кх, Км, Кт 3.2.2 Приготування і стерилізація розчину NaOH для підлужнення середовища, для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом	Температура стерилізації, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину NaOH	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль після стерилізації	t = 131 ^{0}C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, С = 6 %

2 м^3				
ДР 4 Приготування та стерилізація поживних середовищ				
ДР 4.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці				
Кт,Км 4.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р=0,15 МПа, t=112 ^{o}С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р=0,05 МПа, t=131 ^{o}С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р=0,15 МПа, t=131 ^{o}С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р=0,15 МПа, t=112 ^{o}С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ДР 4.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л				
Кт,Км 4.2.1 Приготування та	Композиція А температура, час,	Манометр технічний, годинник,	Тиск визначається безперервно під час стерилізації,	Р=0,15 МПа, t=112 ^{o}С,

стерилізація композиції А	стерильність	мікробіологічний контроль	мікробіологічний контроль після стерилізації	τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р=0,05 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Км 4.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	Р=0,15 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
ДР 4.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 250 л				
Кт, Кх, Км 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=7±0,2 Р=0,15 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.3.2 Приготування та	Композиція Б, температура, час,	pH–метр, манометр технічний, годинник,	Тиск визначається безперервно під час стерилізації,	pH=7±0,2 Р=0,05 МПа,

стерилізація композиції Б	стерильність	мікробіологічний контроль	мікробіологічний контроль після стерилізації	t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=7±0,2 Р=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 4.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 2 м^3				
Кт, Кх, Км 4.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=7±0,2 Р=0,15 МПа, t=112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх,Км 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=7±0,2 Р=0,05 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт,Кх,Км 4.4.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	pH–метр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	pH=7±0,2 Р=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв,

				відсутність мікробіоти
ТП 5 Підготовка посівного матеріалу				
Кт, Км 5.1. Підтримання колекційної культури	Колекційна культура *Bacillus subtilis* GM44/pMX45, температура,час, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час та зовнішній вигляд визначається безперервно під час підтримання культури	t = 3-5 °С, τ = 3-4 місяці., відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2 Отримання робочої культури на агаризованому середовищі	Робоча культура *Bacillus subtilis* GM44/pMX45, тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37-40 ^{0}С, τ = 37-40 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі	Робоча культура *Bacillus subtilis* GM44/pMX45, тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37-40 ^{0}С, τ = 37-40 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр,мікробіологічний контроль	Температура і частота обертів перемішуючого пристрою контролюються перед культивуванням, мікробіологічний контроль і визначення концентрації біомаси проводиться після	t = 37-40 ^{0}С, w = 220 об/хв, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти

			вирощування	
Кт,Кх,Км 5.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об’ємом 20 л	Посівний матеріал, pH, температура, швидкість перемішування, концентрація розчиненого кисню, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	pH–метр, термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр,мікробіологічний контроль	pH визначається перед культивуванням, температура визначаються безперервно під час культивування. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 4 години	pH=7±0,2 t = 38-40 ^{0}C, w = 220 об/хв, τ = 40 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт,Кх,Км 5.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об’ємом 250 л	Посівний матеріал, pH, температура, швидкість перемішування, концентрація розчиненого кисню, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	pH–метр, термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр,мікробіологічний контроль	pH визначається перед культивуванням, температура визначаються безперервно під час культивування. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 4 години	pH=7±0,2 t = 38-40 ^{0}C, w = 220 об/хв, τ = 40 год, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 6 Виробничий біосинтез				
Кт,Кх,Км 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об’ємом 2 м^3	Культуральна рідина, pH, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування,	pH–метр, термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр,мікробіологічний контроль	pH визначається перед культивуванням, температура визначаються безперервно під час культивування. Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і	pH=7±0,2 t = 38-40 ^{0}C, w = 220 об/хв, τ = 70 год, РФ=21 г/л відсутність

	мікробіологічна чистота, концентрація біомаси і полісахариду етаполану		визначення концентрації біомаси відбираються кожні 4 години	сторонньої мікробіоти
ТП 7. Виділення рибофлавіну				
Кх 7.1 Осадження гідросульфітом натрію	Показники дозаторів, pH	Дозатор, pH-метр	До початку процесу	pH = 4,5
Кт 7.2 Центрифугування осадженої суміші	Швидкість обертання, час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	n = 2200 об/хв τ = 5 хв
Кт, кх 7.3Автоліз	Температура, час	Годинник Термометр	Під час процесу	T = 20-24 хв t = 110 °C,
Кт 7.4 Розбавлення водою	Вміст сухих речовин	Непрямим методом	До початку процесу	СР=10-12%
Кт 7.5 Центрифугування осадженої суміші	Швидкість обертання, час процесу	Датчик Годинник	Під час процесу	n = 2200 об/хв τ = 5 хв
ТП 8 Отримання сухої субстанції рибофлавіну				
Кт 8.1 Вакуумна сушка	Кристали рибофлавіну, температура, тиск, вологість	Термометр Манометр Вологовимірювач	Під час процесу	T = 80 – 90 ^{0}C W = 8 – 10 %
ПМВ 9. Упаковка субстанції в ламіновані алюмінієві мішки				

Кт 9 Пакування маркування відвантаження	Наявність ламінованої алюмінієвої фольги, концентрація рибофлавіну, фізико-хімічні показники рибофлавіну	Фотометр	До початку процесу	Вміст рибофлавіну: Ср = 75%

РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ КУЛЬТИВУВАННЯ РИБОФЛАВІНУ

Перелік параметрів, що потрібно контролювати під час процесу культивування, наведено у табл. 10.1.

№ з/п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю, реалізація управляючої дії
1	Ферментер	Температура	35 ± 1 ºС	Регулювання	Підтримання на заданому значенні	АРМ оператора
		pH в агрегаті	7 ± 0,1	Контроль	Відображення, сигналізація (світлова)	АРМ оператора
				Регулювання	Підтримання на заданому значенні	
		Інтенсивність перемішування	300 об/хв	Контроль	Відображення Реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на кількість обертів мішалки за хвилину і кнопка «Стоп» по місцю
		Рівень	2000	Управління	Дистанційне	АРМ оператора

2	**Збірник поживного середовища (ПС)**	pH	7 ± 0,1	Контроль	Відображення, сигналізація (світлова)	АРМ оператора
				Регулювання	Підтримання на заданому значенні	
		Температура	35 ± 1 ºС	Регулювання	Підтримання на заданому значенні	АРМ оператора
3	**Об'ємно-ваговий дозатор для всіх апаратів**	Сипучі компоненти	317±0,5 г	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
		Об'єм рідин	250±0,1 л	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
4	**Насос**	Режим роботи насосу	Включено/виключено	Управління	Захист від переповнення збірника	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю

10.1. Опис функціональної схеми автоматизації

У першому контурі відбувається контроль і реєстрація подачі регламентованої кількості і об′ємів речовин для Р-2, Р-3, на об′ємно-ваговому дозаторі (*поз. 1а*).

У другому контурі здійснюється контроль та регулювання температури датчиком температури (*поз. 2а*). Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від температури йде управління подачею пари регулюючим органом (поз. 2в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 2б

У третьому контурі вимірюється температура у зрібнику датчиком температури (поз. 3а**)**. Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від температури йде управління подачею пари регулюючим органом (поз. 3в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 3б.

У четвертому контурі контролюється рівень культуральної рідини в ферментері, за допомогою датчика рівня (поз. 4а, 4б**)**. Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від значення рівня регулюється за допомогою регулюючих органів (поз. 4г, 4е), які приводяться в дію виконавчими механізмами 4в, 4д. При переповненні реактора передбачається звукова сигналізація

У п'ятому контурі pH у ферментері вимірюється датчиком pH (поз. 5а**)**. Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від значення pH іде управління подачею соляної кислоти регулюючим органом (поз. 5в), що приводяться в дію за допомогою виконавчих механізмів 5б.

У шостому контурі у збірнику вимірюється pH за допомогою датчика pH (поз. 6а**)**. Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від значення pH відбувається управління подачею соляної кислоти регулюючим органом (поз. 6в), що приводяться в дію за допомогою виконавчих механізмів 6б.

У сьомому контурі здійснюється контроль та регулювання перемішування компонентів за допомогою мішалки, яка приводиться в дію мотором (М). Частота обертів мотора мішалки регулюється виконавчим механізмом (*поз. 7а*). Спостереження за зміною частоти обертів здійснюється на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у архіві. Сигналізація про відхилення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB1).

У восьмому контурі необхідно управляти роботою двигуна насоса подачі культуральної рідини з ферментера у збірник культуральної рідини.

У контурі передбачається: управління з АРМа оператора включенням/відключенням насосу; аварійне відключення насосу кнопкою, розташованою «по місцю» біля насоса.

Подача напруги на двигун насоса здійснюється за допомогою магнітного пускача КМ1. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB2).

10.2. Специфікація засобів автоматизації

Таблиця 10.2

Позиція	**Параметр**	**Місце установки**	**Найменування, характеристика приладу**	**Тип, модель**	**Виробник**
1	2	3	4	5	6
1а	Дозування	По місцю	Ваговий дозатор, межа дзування 50-1000 г, клас точності по ДСТУ 10223-97, електроживлення 220 В, 50 Гц	ДВА-1	Асвік-Центра (Україна)
2а 3а	Температура	В агрегатах	Датчик термоперетворювач опору ТСП, НСХ-Pt100, діапозон (0 – 100)ºС, з уніф. вих. сигнал 4…20 мА	ТСМ-0193-01	ЧТП «Теплоприбор» м. Челябинск
2б 3б	Температура	На щиті	Електропневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
2в 3в	Температура	По місцю	Регулюючий пневматичний клапан	Dwyer серія Hi-Flow 2001VA32-230-L0	СВ Альтера м. Київ

4а 4б	Рівень	В агрегаті	Контактний датчик рівня, з вихідним сигнал по напрузі	SITRNS L Pointek CLS 200	ДП «Сименс Україна» м.Київ
4в 4г 4д	Рівень	По місцю	Електромагніт-ний регулюючий клапан	JASKA D201	СВ Альтера м. Київ
5а 6а	pH	В агрегатах	Для вимірювання pH водних розчинів у стаціонарних умовах промислового підприємства	pH- 101П	ООО Компания «Химснаб-жение» м. Харків
5б 6б	pH	На щиті	Електропневмоперетв юрювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
5в 6в	pH	По місцю	Регулюючий пневматичний клапан	Dwyer серія Hi-Flow 2001VA32-230-L0	СВ Альтера м. Київ
7а	Перемішування	На щиті	Частотний перетворювач для двигунів середньої потужності. Потужність 0.75кВт 1-ф/220 В, номінальний струм 4,2 В	VFD007EL 21A	Delta Electronics
SB1 SB2 SB3		По місцю	Двоклавішна кнопочка станція «Пуск»-«Стоп»	8LP2T B7113	Lovato

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Поліщук В. Ю.* Рибофлавін – виробництво і застосування // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – К., 2009. – Вип. 134: Серія: Біологія, біотехнологія. хімія, екологія, ч. 3. – С. 274-291
2. *Смирнов В.А.,Ю.Н. Климочкин*.- Витамины и коферменты: учеб. пособ. Ч. 2 // – Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2008. – 91
3. *Вітовська О. П., Савіна О. М.* Структура та частота хвороб ока та придатково апарату у дітей в Україні [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://cyberleninka.ru/article/v/struktura-ta-chastota-hvorob-oka-ta-pridatkovogo-aparatu-u-ditey-v-ukrayini
4. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.vitamin.com.ua
5. Способ получения рибофлавина, штамм bacillus subtilis - продуцент рибофлавина (варианты) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://patents.s3.yandex.net/RU2261273C2_20050927.pdf
6. *Под ред. Егорова Н.С.* Промышленная микробиология – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.
7. Державна фармакопея України /Державне підприємство «Науковоекспертний фармакопейний центр». І-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
8. *Schwechheimer S.K., Park E.Y., Revuelta J.L., Backer J., Wittmann C*. Biotechnology of riboflavin // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2016. - V.100 (5). - P. 2107-2119.
9. Мутация по транскетолазе у рибофлавинсинтезирующих штам мов Bacillus subtilis / В. Н. Гершанович, А. Я. Куканова, З. М. Галушкина, А. И. Степанов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2000. – №3. – С. 3–7.
10. *Марценюк О.С., Мельник Л.М.*, Процеси і апарати харчових виробництв., Київ НУХТ 2011. . –172-385 с

11. *Калунянц К.А.* Микробные ферментные препараты: учеб/.: Пищевая промышленость, 1979. – 302 с.
12. *Ryan KJ, Ray CG* (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (вид. 4th ed.). McGraw Hill.
13. Ферментер Labfors Lux [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.dia-m.ru/catalog/lab/fermentyory-s-osvesheniem/infors-labfors-5-lux-fp-fermenter-labfors-5-lux-flat-panel-dlya-fotosinteziruyushih-mikroorganizmov/
14. *Пирог Т.П., Ігнатова О.А.* Загальна біотехнологія. – К.: НУХТ, 2009. – 335 с.
15. *Новіков В., Сидоров Ю., Швед О.* Тенденції розвитку комерційної біотехнології // Вісник НАН України. – 2008. – №2. – С.25 – 39.
16. *Кляченко О.Л., Мельничук М.Д., Іванова Т.В*. Екологічні біотехнології: теорія і практика.: Навчальний посібник. – Вінниця, ТОВ «Нілан-ЛТД»., 2015. –254 с.
17. Фильтр для сжатого воздуха тонкой очистки [Електронний ресурс]: Режим доступу http://kiev.prom.ua/p124457530-omi-0072-filtr.html
18. Індивідуальні фільтри HEPA https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/hepa_filtr.html
19. Наказ від 14.12.2001 № 502 Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20011214_502.html.
20. Вимол(средство моющее техническое)[Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://logosib.ru/vimol
21. Дезекон ОМ - дезинфицирующие средство на основе композиции ЧАС [Режим доступу]: https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev

22. Дезэфект УНВЦПД – средство для дезинфекции, ПСО и санитарной обработки [Режим доступу]: https://interdez.com.ua/product/dezefekt-unvcpd
23. *Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П.* Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування: Навчальний – Львів: «Інтелект-Захід», 2008, – 736 с.
24. Центрифуга с инвертируемым фильтром HT/GMP [Режим доступу]: http://cphem.com/product/ht-gmp-tsentrifuga-s-invertiruemyim-filtrom
25. Промислова вакуумна сушильна шафа СВП-500 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://chemtest.com.ua/ua/promyshlennye_vakuumnye_sushilnye_shkafy-svp-500-ua
26. *Грачева И.М.* Биотехнология биологически активных веществ. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений./ Под редакцией д. б. н., проф. МГУШ1И.М. Грачевой ид.т.н., проф. МГУШЛ.А. Ивановой. — М., Издательство НПО «Элевар»,2006. — 453 с.. 2006
27. CIP-станція [Електронний ресурс] - Режим доступу: http://www.milk-system.com/produktsiia/cip-stantsiia
28. Дозатор ваговий для сипучих продуктів [Електронний ресурс]: http://www.vostok.dp.ua/ukr/catalog/products/scale/doza/product.html?id=4117
29. Емкости из нержавеющей стали от 30 до 20000 литров[Електронний ресурс] //ЧП "Стройторгсервис". – Режим доступу:http://stprom.com.ua/p15745045-emkosti-nerzhaveyuschej-stali.html
30. Приточно-витяжні установки AF[Електронний ресурс] // Вент Заводи. – Режим доступу:http://v-z.com.ua/ua/category/pritochno-vytzhnye-ustanovki -af/
31. Фильтр карманный грубой очистки воздуха G3-G4[Електронний ресурс] //Айс-климат. – Режим доступу:http://air-klimat.prom.ua/p203201321-filtr-karmannyj-gruboj.html

32. Компрессор винтовой Atlas Copco GX 7 10P / 400В 3ф 50Гц без N / CE[Електронний ресурс] //Группа компаний Воздух. – Режим доступу:http://www.companyair.ru/kompressor-vintovoj-atlas-copco-gx7-10p-400v-3f-50hz-bez-n-ce
33. Системы воздухоподготовки[Електронний ресурс] // Уралкомпрессормаш. – Режим доступу:http://www.ukm.ru/systemy_vozduhopodgotovki/
34. Электрический канальный нагреватель[Електронний ресурс] // AIRONE. – Режим доступу:http://www.airone.ru/s2/catalog_2/ ?ID=59&SECTION_ID=303
35. Фільтри тонкої очистки[Електронний ресурс] // Airpol. – Режим доступу:http://www.airpol.com.ua/catalog/ochystka-povtria/filters/filtry-tonkoi-ochystky/
36. Дозатор ваговий для сипучих продуктів [Електронний ресурс]: http://www.vostok.dp.ua/ukr/catalog/products/scale/doza/product.html?id=4117
37. Відцентровий насос 3 м^3/год [Електронний ресурс] - Режим доступу: https://prom.ua/p1003730257-nasos-dlya-vody.html
38. Відцентровий насос потужністю 500 л/год [Електронний ресурс]: Режим доступу https://prom.ua/p722920212-nasos-promyshlennyj-pogruzhnoj.html
39. Ферментери фірми «Biostat®» [Електронний ресурс]: Режим доступу http://sartorius-sd.com.ua/index.php
40. Ферментери фірми «Bioengineering» [Електронний ресурс]: Режим доступу http://www.bioengineering.su/oborudovanie/fermenteryi-promyishlennyie/p-%E2%80%93-pilotnyij-fermenter.html
41. Засівний пристрій [Електронний ресурс] - Режим доступу: http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Sartorius-BIOSTAT-B-DCU-style-3L-motor-adapter,MM_NF-CR0003L104
42. Відцентровий насос 5 м^3/год [Електронний ресурс] - Режим доступу: https://prom.ua/p943351642-nasos-mnogostupenchatyj-leo.html
43. Фільтри фірми « Bioengineering». [Електронний ресурс]: Режим доступу http://cyberleninka.ru/article/n/filtr_Bioengineering
44. Pilot centrifuges HT/GMP [Режим доступу]: http://www.comicondor.com/pilot-centrifuges-hxgmp-and-htgmp

45. Volpak: 'Doypack' & 'Sachet' Equipment [Режим доступу]: https://www.ecipack.com/food/proizvoditeli/upakovochnye-i-tehnologicheskie-sistemy/volpak
46. *Андріанова Т.В., Бобир В.В., Виноград Н.О.* та ін. Медична мікробіологія, вірусологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / За редакцією В.П. Широбокова / Видання 2-е. – Віннця: Нова Книга, 2011. – 952 с.
47. Зображення колонії *Bacillus subtilis* мікроскопом 40х [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://3.bp.blogspot.com/-hpeDpCUn_P0/VW9thXnTGiI/AAAAAAAADl0/pkVXRBtrIEo/s1600/Bacillus-Subtilis-40x-Plan-.jpg
48. *Александрова Л.Н., Найденова О.А.* Лабораторно-практические занятия по почвоведению. – Москва.: 1976. – 205 с.
49. *Шпичка А. И.* К вопросу определения рибофлавина в культуральной жидкости // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – №1. – С. 30–32.
50. *Соколова О.М., Данилова В.М., Мартиненко Т.А.* Методичні рекомендації з дисципліни “Технологія харчових та біологічно активних добавок”. – К. : НУХТ, 2012. – 66 с.