

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 20__ р.

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

« ___ » _____ 20__ р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

(код та назва спеціальності)

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

на тему: «Біосинтез вітаміну B₂ культивуванням *Ashbyii gossypii*»

Виконав: здобувач 3 курсу, групи 1-ск

Харченко Оксана Григорівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

_____ (підпис)

Керівник Тетеріна Світлана Миколаївна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

_____ (підпис)

Консультанти

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент

Сидор І.В.

(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ - 2021р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) *Біотехнології та екологічного контролю*

Кафедра *Біотехнології і мікробіології*

Освітній ступінь *Бакалавр*

Спеціальність *162 Біотехнології та біоінженерія»*

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології і
мікробіології

Пирог Т.П.
“28” жовтня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Харченко Оксани Григорівни

1. Тема роботи: «Біосинтез вітаміну В₂ культивуванням *Ashbyii gossypii*»
керівник роботи Тетеріна Світлана Миколаївна, доцент, к.т.н.
затверджені наказом закладу вищої освіти від “27” жовтня 2020 року №875
2. Строк подання здобувачем роботи: 31.01.2021 року
3. Вихідні дані до роботи:
геометричний об’єм ферментера – 4м³;
коефіцієнт заповнення ферментера – 0,5;
цільовий продукт – вітамін В₂;
назва біологічного агента - *Ashbyii gossypii*
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
 - 4.1 Характеристика цільового продукту
 - 4.2 Характеристика біологічного агента
 - 4.3 Техніко-економічне обґрунтування
 - 4.4 Обґрунтування вибору технологічної схеми
 - 4.5 Специфікація обладнання
 - 4.6 Опис технологічної схеми
 - 4.7 Контроль виробництва
5. Перелік графічного матеріалу:
 - 5.1 технологічна схема виробництва вітаміну В₂, формату А1 - 1 аркуш;
 - 5.2 апаратурна схема виробництва вітаміну В₂, формату А1 – 2 аркуші

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячено проектуванню ділянки виробничого біосинтезу одержання вітаміну рибофлавіну під час біосинтезу *Ashbya gossypii* W122032. Зокрема, приведено обґрунтування основних технологічних рішень та викладення технологічного процесу ділянки біосинтезу рибофлавіну *A. gossypii* W122032, який включає блок допоміжних робіт (підготовка приміщень та стисненого аераційного повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ, розчинів для підтримання рівня рН під час культивування), стадії підготовки посівного матеріалу та вирощування культури у виробничому ферментері.

Наведено склад поживного середовища для культивування *A. gossypii* W122032. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації (для термолабільних компонентів – 112°C 30 хв, для солей – 131°C 40 хв.). Розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Наведено опис основних стадій технологічного процесу із зазначенням параметрів, точок контролю та матеріальних потоків. Складено карту постадійного контролю процесу.

Робота складається зі вступу, семи розділів, графічної частини та списку використаної літератури з 39 найменувань. Технологічна та апаратурна схеми процесу представлено у графічній частині роботи на 3 аркушах формату А1 та 1 аркуші формату А2. Загальний обсяг пояснювальної записки проекту – 71 сторінок, 3 рисунків, 10 таблиць.

Ключові слова: рибофлавін, *Ashbya gossypii*, поживне середовище, біосинтез.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	9
1.1. Загальна характеристика вітаміну B ₂	9
1.2. Відкриття рибофлавіну	11
1.3. Хімічний та мікробний синтез вітаміну	12
1.4. Застосування рибофлавіну	14
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	16
2.1. Вибір біологічного агенту та поживного середовища для його культивування	16
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	21
2.3. Таксономічний статус біологічного агенту	23
2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	24
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	26
3.1. Потреба у цільовому продукті	26
3.2 Розрахунок потужності виробництва	28
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	29
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	31
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	34
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	34
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	34
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря	35
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	37
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	40
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	43

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	46
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	59
7.1 Карта постадійного контролю біосинтезу рибофлавіну	59
7.2. Мікробіологічний контроль	66
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	66
7.3.1. Концентрація біомаси	66
7.3.2. Концентрація цільового продукту.....	66
7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	67
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	69

ВСТУП

У кінці XIX ст. сформувався уявлення про те, що для повноцінного харчування людині необхідні не тільки білки, жири і вуглеводи, а й якісь додаткові фактори харчування, вміст яких в харчових продуктах досить незначний, але обов'язковий. Було встановлено, що при відсутності цих речовин розвиваються важкі захворювання. Такими сполуками виявились вітаміни [1].

Недостатнє вживання вітамінів завдає істотної шкоди здоров'ю: знижує фізичну та розумову працездатність, опір різноманітним захворюванням, підсилює негативний вплив на організм несприятливих екологічних умов та шкідливих факторів виробництва [2].

Через шалений ритм життя величезний обсяг інформації щодня постійна втома та головний біль тепер є нашими супроводжуючими. Але коли звичайний головний біль можна приглушити різноманітними знеболюючими чи спазмолітиками існує біль з яким не так легко впоратися – мігрень [3]. На сьогодні постає питання як можна знизити ступінь болю. Одним із варіантів вирішення цієї проблеми є підтримуюча терапія тривалого вживання високих (50-400 мг) концентрацій вітаміну B2 [4].

Рибофлавін відіграє важливу роль для безлічі клітинних функцій. Протягом останніх десятиліть все більший інтерес перетворював рибофлавін на один із найважливіших продуктів біотехнології [5].

Відомі біотехнологічні підприємства як продуцентів для виробництва рибофлавіну широко використовують організми різних таксономічних груп – *Candida famata*, *Pichia guilliermondii*, *Eremothecium gossypii* (синонім *Ashbya gossypii*), *Eremothecium ashbyi* та *Bacillus subtilis*. Найчастіше використовують саме мутантів надпродуцентів *Ashbya gossypii* [6].

					НУХТ БТЕК 03.01ск.12 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.Г.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Тетеріна С.М.					5	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Тому актуальною є робота, присвячена мікробному синтезу вітаміну В2 (рибофлавіну) з метою подальшого виробництва на його основі лікарського засобу для зменшення інтенсивності болю при мігрені.

Новизною даної роботи є використання середовища змішаного складу (ріпакова олія та соєвий жмих) під час культивування надпродуцента рибофлавіну мутанта *Ashbya gossypii* W122032 [7]. Що дозволяє знизити вартість цільового продукту (у 1,6 та 2,8 рази у порівнянні з іншими штамми) та отримати високий вихід цільового продукту (13,7 г/л).

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

1.1. Загальна характеристика вітаміну В₂

Рибофлавін (вітамін В₂) є одним із найбільш поширених вітамінів. Він функціонує у двох коензимних формах, що являють собою його фосфорні ефіри: флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД), які є кофакторами для широкого кола ферментів метаболізму. Рибофлавін міститься в усіх тваринних і рослинних клітинах, але лише деякі продукти є багатими його джерелами. Вітамін В₂ синтезують більша частина вищих рослин і багато мікроорганізмів, включаючи бактерії, дріжджі та гриби. Тварини не здатні до самостійного синтезу рибофлавіну, і їх потреба в ньому задовольняється мікрофлорою шлунково-кишкового тракту та їжею. Дефіцит рибофлавіну призводить до цілої низки захворювань. [3, 4]. Будова вітаміну зображена на рисунку 1.

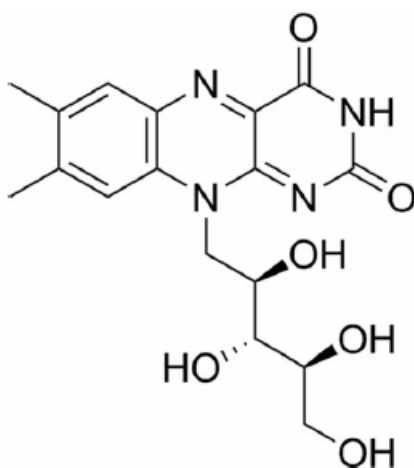


Рис. 1.1. Структура рибофлавіну [8]

					НУХТ БТЕК 03.01ск.12 ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Харченко О.Г.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Тетеріна С.М.				7	7
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					

Відомі біотехнологічні підприємства як продуцентів для виробництва рибофлавіну широко використовують організми різних таксономічних груп, в основному дріжджі та міцеліальні гриби. Серед флавіногенних дріжджів застосовують *Candida famata* і *Pichia guilliermondii*. Серед міцеліальних грибів широко використовують *Eremothecium gossypii* (синонім *Ashbya gossypii*) і *Eremothecium ashbyi*, які проявляють здатність до суперсинтезу рибофлавіну. Також застосовують бактеріальні штами *Bacillus subtilis*, отримані генноінженерним способом [3, 4].

Рибофлавін, відомий також як вітамін B2, є водорозчинною сполукою. Він відіграє важливу роль для безлічі клітинних функцій. Протягом останніх десятиліть все більший інтерес перетворював рибофлавін на один із найважливіших продуктів біотехнології. Дві активні форми рибофлавіну, ФАД та ФМН діють як кофактори оксидоредуктази, а також протетичні групи для ферментів у шляху β -окислення. Більше того, рибофлавін є частиною флавопротеїну, який називається криптохромом, фоторецептором, який відповідає за підтримку циркадного годинника. Природними джерелами рибофлавіну є, наприклад, молоко, яйця та листяні овочі. За даними Ради з питань харчування та харчування (Food and Nutrition Board), рекомендована добова норма рибофлавіну становить від 1,1 до 1,3 мг для здорових жінок та чоловіків. У людей дефіцит рибофлавіну, серед інших симптомів, пов'язаний з ураженням шкіри та васкуляризацією рогівки. Рибофлавін, який синтезується виключно біотехнологічно з використанням мікроорганізмів, в основному використовується в якості кормової добавки (приблизно 70% сучасного ринку), тоді як близько 30% використовується як харчова добавка та для фармацевтичних застосувань [8].

Рибофлавін кристалізується у вигляді помаранчево-жовтих голок з температурою плавлення 282°C з розкладанням. Рибофлавін нерозчинний в жирах, слабо розчинний у воді. У лужному середовищі рибофлавін краще розчинний ніж у нейтральному. Слабко розчинний в бутиловому, аміловому, етиловому та метиловому спиртах. Добре розчинний у соляній кислоті.

У нейтральних водних розчинах має зеленувато-жовте забарвлення з інтенсивною жовто-зеленою флуоресценцією, яка зменшується до зникнення як у кислому, так і в лужному середовищі (максимум при рН 6–7). Рибофлавін у лужному середовищі переходить в люміфлавін, який розчинний в хлороформі і не володіє біологічними властивостями вітаміну В2 [9].

Рибофлавін – світлочутлива жовта речовина. Під дією світла в нейтральному та кислому середовищі рибофлавін перетворюється на біологічно неактивний люміхром, який володіє сильною блакитною флуоресценцією. Пряме сонячне світло швидко руйнує рибофлавін при будь-якому значенні рН [9].

1.2. Відкриття рибофлавіну

Незважаючи на те, що люди страждали вітамінними захворюваннями, такими як цинга, бери-бери, нічна сліпота, ксерофтальмія, пеллагра та інше, з початку їх існування визнання вітамінів як найважливіших харчових факторів не було встановлено до початку двадцятого століття. Описи захворювань, пов'язаних із дієтою, уже повідомлялися в стародавніх документах, таких як Папірус Еберса (приблизно 1150 р. до н. е.) та працях Гіппократа (близько 420 р. до н.е.). Однак до початку ХХ століття харчова цінність їжі розглядалася лише виключно з точки зору її здатності забезпечувати енергією та основними будівельними одиницями життя [10].

Рибофлавін вперше згадується Блітом у 1879 році, який виділив із молочної сироватки жовто-флуоресцентну речовину, яку він назвав лактохромом. Однак минуло майже півстоліття, поки вітамін не був виділений, описана його структура та виявлена його харчова функція. Ранні дослідження мікроелементації на щурах показали порушення росту при арибофлавінозі. Ці результати призвели до більш інтенсивних досліджень у галузі вітамінів взагалі та рибофлавіну зокрема [8].

У 1927 р. було визнано, що так званий комплекс вітаміну групи В містить два різні компоненти: антинеуритичний фактор, що терmostійкий, вітамін В1 (тіамін) та вітамін В2 (рибофлавін), більш терmostійкий фактор, необхідний щурам для підтримки зростання і профілактики уражень шкіри. У 1933 р. команда університету Гейдельберга, включаючи P. Gyrgy, R. Kuhn та Th. Wagner-Jauregg, вперше успішно виділила та очистила вітамін В2. Kuhn запропонував, щоб яскраво-жовтому флуоресцентному з'єднанню, асоційованому зі стимулюючою ростом діяльністю, було названо флавін. Цей вітамін спочатку виділявся з яєчного білка (овофлавіну), із сечі (урофлавін), з печінки (гепатофлавін), а згодом у великій кількості із сироватки (лактофлавін) (1 г кристалізованого лактофлавіну з 5400 л сироватки). Було виявлено, що чисті кристалічні флавінові сполуки містять рибозу і є однаковими, і, таким чином, назва рибофлавін стала стандартною при посиленні на ці сполуки. [10]. Незабаром вітамін В2 офіційно став рибофлавіном (з латинського flavus – жовтий та rībo – рибітиловий бічний ланцюг) Радою з фармацевтики та хімії Американської медичної асоціації [8].

У 1935 р. М.А. Гільермонд уперше виділив і описав гриб-паразит коробочок бавовнику, що утворював жовтий пігмент флавінової природи. Паразит був ідентифікований як *E. ashbyi*, та була показана здатність цього гриба до суперсинтезу рибофлавіну. Також він вирізняється своєю здатністю до синтезу ФАД [3].

1.3. Хімічний та мікробний синтез вітаміну

Відомо три способи промислового виробництва рибофлавіну: хімічним синтезом, мікробіологічним синтезом і змішаним синтезом, який включає мікробний синтез рибози з подальшою хімічною модифікацією її в рибофлавін. Найбільш широко застосовується хімічний синтез, проте останнім часом спостерігається витіснення хімічного синтезу вітаміну В2 мікробіологічним через значну дешевизну [3].

Високий інтерес до молекули вітаміну був головним рушієм для отримання її хімічним синтезом. Спочатку розроблений і досі основний багатоступеневий масштабний хімічний шлях починається або від D-глюкози, або D-рибози (рис. 2.). Спочатку глюкоза окислюється до арабонату, який згодом епімерізується до рибонату і перетворюється на рибонолактон. Цей проміжний продукт укорочується до D-рибози за допомогою амальгами. Після додавання ксилідину утворюється рибітилксилідин, далі разом з похідним аніліну утворюють фенілазо-рибітилксилідин. Завершальним етапом реакції хімічного синтезу є циклоконденсація фенілазо-рибітилксилідину з барбітуровою кислотою, яка дає рибофлавін як продукт. Протягом багатьох років, маючи кілька модифікацій, це був єдиний спосіб синтезу рибофлавіну [8].

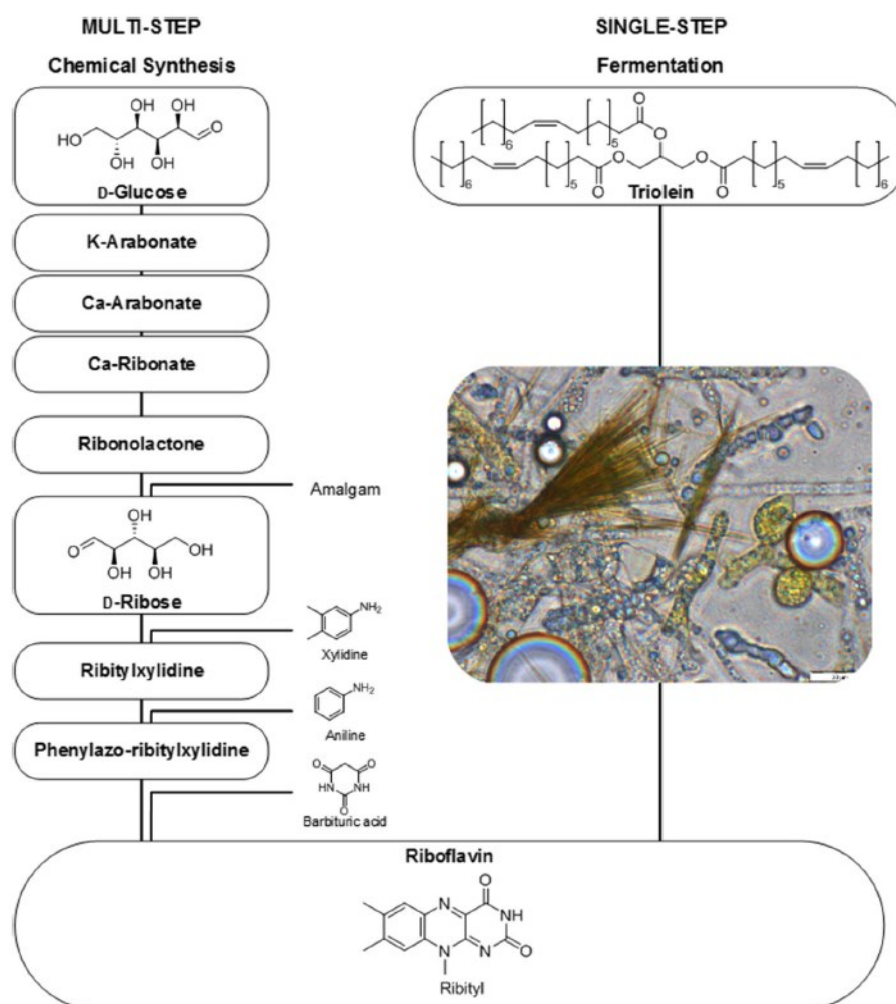


Рис. 1.2. Хімічний та біотехнологічний синтез рибофлавіну шляхом бродіння. На мікроскопічному фото зображено дикий тип *A. gossypii*, що росте в середовищі з рослинною олією. Міцелій, крапельки олії та кристали рибофлавіну показані у 600-кратному збільшенні [8].

У даний час виробництво рибофлавіну здійснюється виключно за допомогою ферментації, оскільки це економічно та екологічно більш можливо. Частіше всього як продуцентів використовують грампозитивні бактерії *Bacillus subtilis* та геміаскоміцет *Ashbya gossypii* [8].

1.4. Застосування рибофлавіну

Рибофлавін застосовують при гіпо- та арибофлавінозі екзо- та ендogenousного походження, гемералопії, кон'юктивіті, іриті, кератиті, помутнінні роговиці, катаракті, ранах та язвах, що довго не загоюються, променевої хвороби, астенії, хейліті, кутовому стоматиті (заїди), глоситі, сверблячому дерматозі, екземі, нейродерміті, фотодерматозі, себорей, червоних вуграх, кандидозі, вірусному гепатиті А, хронічному гепатиті, цирозі печінки, порушеннях функції ШКТ, гіпотрофії, анемії, лейкозі. З профілактичною метою – при зниженні всмоктування з ШКТ, інтенсивній елімінації та збільшенні потреби в рибофлавіні (гостра і хронічна гіпоксія, дихальна та серцева недостатність, опікова хвороба, обмороження, нестача білкового та надлишок вуглеводного харчування, гострі інфекційні захворювання, в тому числі при лікуванні протимікробними засобами, що пригнічують грамнегативну флору кишечника, фототерапія).

Рибофлавін незамінний при виробництві бульйонних кубиків, супів швидкого приготування та інших подібних продуктів. Саме рибофлавін (Е 101) надає цим продуктам характерний «бульйонний» відтінок. Рибофлавін вдало використовується для того, щоб надати привабливого забарвлення таким продуктам, як морозиво, пудинги, молочні напої, цукрова глазур, сухі швидкорозчинні напої. Безсумнівною перевагою рибофлавіну в якості барвника в порівнянні з багатьма штучними барвниками є його безпечність

та органічність для людини. Для забарвлення продуктів використовується як сам рибофлавін, так і натрієва сіль рибофлавін-5'-фосфату, оскільки вона краще розчинна у воді.

Інша сфера застосування рибофлавіну – збагачення продуктів харчування. Він широко використовується для вітамінізації молока, круп, дієтичних продуктів, дитячого харчування. Найчастіше він входить у склад сухих гомогенних вітамінних сумішей (преміксів), які застосовують для збагачення.

Рибофлавін застосовується у сільському господарстві. Використання препарату у тваринництві збільшує приріст тварин та птахів до 15%, на 30% знижує смертність, на 3% збільшує яйценосність курей та на 6% – виводимість курчат.

Також рибофлавін використовується у фармацевтичній галузі. Вітамін виступає як самостійний препарат так і у складі різних комплексних лікарських препаратів – Ревіт, Комплевіт, Рибофлавін мононуклеотид, Гексавіт, Мульти-табс, Піковіт, Біовіталь гель, Супервіт та ін. [1].

РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Рибофлавін синтезує велика кількість продуцентів, але, як зазначалося раніше, у промисловості частіше використовують *Ashbya gossypii* та *Bacillus subtilis*.

Філаментний гриб *Ashbya gossypii* здавна вважається парадигмою біотехнології, що стосується виробництва рибофлавіну [11].

Ashbya gossypii має цікаві характеристики, які надають йому біотехнологічної переваги з точки зору виробничих затрат: здатність рости шляхом ферментації гранул, що знижує в'язкість культури і покращує змішування та масоперенесення, економія енергії на пізніх фазах росту, при низькій температурі його гіфи піддаються автолізу, що забезпечує наступне відновлення внутріклітинних метаболітів. Крім того його масу можна легко відділити від культурального бульйону за допомогою гравітаційного осадження або звичайної фільтрації, що є зручно при розділенні у промислових масштабах [12].

Ashbya gossypii (син. *Eremothecium gossypii*) - це високо флавіногенна цвіль сімейства *Saccharomycetaceae*, яка широко використовувалася для виробництва рибофлавіну (вітаміну B2). Генетично вдосконалені штами *A. gossypii* використовуються з 1990 року для промислового виробництва цього вітаміну німецькою хімічною компанією BASF. Враховуючи біотехнологічну актуальність цього нитчастого гриба, в останні десятиліття було докладено значних зусиль для розробки засобів молекулярної та системної біології для його інженерії, що в цілому дозволило значно підвищити продуктивність початкових промислових штамів, розроблених класичними методами

					НУХТ БТЕК 03.01ск.12 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.Г.			РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Тетеріна С.М.					14	10
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

мутагенезу. Саме успіх цієї програми вдосконалення штаму в кінцевому рахунку призвів до заміни на промисловому рівні процесу виробництва хімічного рибофлавіну біотехнологічним.

Хоча промислове виробництво рибофлавіну пройшло довгий шлях, досягнення в області системної біології для *A. gossypii* показали, що потік Карбону цього гриба в напрямку виробництва рибофлавіну може бути додатково покращений. Крім того методика для моделювання *in silico*, яка стала доступною для *A. gossypii*, також сприяла появі інших комерційно цінних біотехнологічних використань для цього гриба [11].

Отже, обирати власне продуцента будемо серед мутантних штамів *A. gossypii*.

У таблиці 2.1 наведено порівняння саме таких штамів-продуцентів.

Таблиця 2.1

Продуценти рибофлавіну

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація, г/л	Особливості культивування	Джерело
<i>A. gossypii</i> W122032	Ріпакова олія – 90,5 Кукурудзяний лікер – 40,3 Дріжджовий екстракт – 36,1 Соевий жмих – 15 Гліцин – 2 Аланін – 0,2 Глутамінова кислота – 0,47 КН ₂ РО ₄ – 1,5	144	13,7	t = 28±0,5 ° С, n = 600 об/хв, аерація – 1 л/л/хв, рН = 6,8	[7]
<i>A. gossypii</i> ZP4	Ріпакова олія – 100 Желатин – 30 Кукурудзяний лікер – 60 Гліцин – 1,5 КН ₂ РО ₄ – 1,5	120	8,7	t = 28±0,5 ° С, n = 600-700 об/хв, аерація – 1 л/л/хв, рН 6,8	[13]
<i>A. gossypii</i> AgOXA50	Ріпакова олія – 100 Кукурудзяний лікер – 60 Желатин – 30 Гліцин – 4 КН ₂ РО ₄ – 1,5	192	5,2	t = 28±0,5 ° С, n = 600 об/хв, аерація – 1 л/л/хв, рН 6,8	[14]

На наступному етапі порівнювали вартість поживних середовищ (табл. 2.2) з метою визначення їх рентабельності для культивування того чи іншого продуцента цільового продукту.

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>A. gossypii</i> W122032	Ріпакова олія – 90,5	69	6,2	1
	Кукурудзяний екстракт – 40,3	40	1,6	2
	Дріжджовий екстракт – 36,1	146,3	5,3	3
	Соевий жмих – 15	8,5	0,13	4
	Гліцин – 2	70	0,14	5
	Аланін – 0,2	26,6	0,005	6
	Глутамінова кислота – 0,47	140	0,07	7
	КН ₂ РО ₄ – 1,5	48	1,9	8
	Вартість 1 л середовища – 15,35 грн			
<i>A. gossypii</i> ZP4	Ріпакова олія – 100	69	6,9	1
	Желатин – 30	210	6,3	1
	Кукурудзяний екстракт – 60	40	2,4	2
	Гліцин – 1,5	70	0,1	5
	КН ₂ РО ₄ – 1,5	48	0,07	3
	Вартість 1 л середовища – 15,77 грн			
<i>A. gossypii</i> AgOXA50	Ріпакова олія – 100	69	6,9	1
	Кукурудзяний екстракт – 60	40	2,4	2
	Желатин – 30	210	6,3	1
	Гліцин – 4	70	0,28	5
	КН ₂ РО ₄ – 1,5	48	0,07	3
	Вартість 1 л середовища – 15,95 грн			

*Примітки 1. <https://prom.ua/ua/p1052122800-maslo-rapsovoe-rafinirovannoe/wholesale.html>

2. <https://agro-smart.com.ua/product/ekstrakt-kukuruznyy>
3. <https://russian.alibaba.com/product-detail/supply-high-quality-99-1-min-yeast-extract-565250021.html?spm=a2700.8699010.normalList.5.3cba2064IWwuBZ&s=p>
4. <https://agrobiz.net/zhmyh-soeviy-41-425-proteina-264274.html>
5. <https://www.systopt.com.ua/ru/glytsyn-amynouksusnaya-kyslota/>
6. <https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-beta-alanine-107-95-9-62140409375.html?spm=a2700.8699010.normalList.32.1e8f296aHwesYy>
7. <https://prom.ua/ua/p664935058-glutaminovaya-kislota;wholesale.html>
8. <https://prom.ua/ua/p980249750-kalij-monofosfat;wholesale.html>
9. <https://prom.ua/ua/p15713560-zhelatin-pischevoj;wholesale.html>

Ціни вказані станом на червень 2020 року.

З табл. 2.2 бачимо, що найдешевше середовище культивування у штаму W122032 – 15,35 грн/л. Але необхідно також врахувати і продуктивність продуцентів тому ще розраховуємо умовну вартість 1 г цільового продукту та продуктивність штамів (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г продукту при культивуванні різних штамів

A. gossypii

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація рибофлавіну у 1 л середовища, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного вітаміну за годину, г/год
<i>A. gossypii</i> W122032	15,35	13,7	1,1	144	0,095
<i>A. gossypii</i> ZP4	15,77	8,7	1,8	120	0,07
<i>A. gossypii</i> AgOXA50	15,95	5,2	3,06	192	0,03

Економічна складова у виробництві кінцевого продукту відіграє важливу роль. З табл. 2.3 бачимо, що більш ефективнішим продуцентом є штам *A. gossypii* W122032 – цей штам найпродуктивніший серед обраних і має найнижчу умовну вартість 1 г вітаміну.

У високопродуктивного мутанта *A. gossypii*, тобто штама W122032, збільшення продуктивності, в порівнянні з диким штамом ATCC 10895, обумовлено збільшенням потоку пентозу-5-фосфат на 9% за рахунок пентозофосфата і 16-кратне збільшення потоку від пурину до рибофлавіну [7].

Для штаму W122032 (штаму MT), який був виділений за допомогою мутагенезу диспропорційності, було проведено геномний аналіз [7].

При геномному аналізі було виявлено 33 гомозиготних та 1377 гетерозиготних мутацій у кодуючих послідовностях геному штаму W122032. Серед цих гетерозиготних мутацій частка мутованих читань у кожному гені була різною, коливалася від 21 до 75%. Ці результати говорять про те, що штам W122032 може містити кілька ядер, що містять різні мутації. Під час дослідження намагалися відділити гаплоїдні спори від штаму W122032, щоб довести його пloidість, але цей штам не споруювався за випробуваних умов. Гетерозиготні мутації, виявлені в генах, важливих для спороношення, ймовірно, сприяють спороносному дефіциту штаму W122032. Гомозиготні та гетерозиготні мутації були виявлені в генах, що кодують ферменти, що беруть участь у метаболізмі амінокислот, циклі ТСА, метаболізмі пуринового та піримідинового нуклеотидів та системі відновлення невідповідності ДНК. Виявлено одну гомозиготну мутацію в гені *AgILV2*, що кодує ацетогідроксикислоту синтазу, яка також є флавопротеїном у мітохондріях. Аналіз збагачення генної онтології (GO) показав гетерозиготні мутації у всіх 22 генах гелікази ДНК та генах, що беруть участь у окисно-відновному процесі. Дане дослідження дозволяє зробити висновок, що окислювальний стрес та старіння клітин брали участь у надвиробництві рибофлавіну у *A. gossypii* рибофлавіну, який надмірно продукує мутант, і дає нові уявлення про вироблення рибофлавіну в *A. gossypii* та корисність мутагенезу диспропорції для створення нових типів мутантів для метаболічної інженерії [15].

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

Морфолого-культуральні ознаки

A. gossypii формує бліді колонії, що пізніше жовтіють, діаметром 20 мм при культивуванні на агарі з 4% солодового і 0,5% дріжджового екстрактів. Колонії гладкі, дрібнопластівчасті, вологі, зморшкуваті в центрі, з чітким краєм. Гіфи дихотомічно розгалужуються, завтовшки 2–6 мкм. У деяких клітинах містяться голчасті кристали рибофлавіну. Еліпсоїдальні бластоконідії (2,2–3 x 4,5–7 мкм) формуються латерально, поодинокі або в коротких ланцюжках. Аски булавоподібні або веретеноподібні (10–20 x 60–200 мкм), інтеркалярні, в довгих ланцюжках. У асках містяться 12-32 спори, що вивільняються при розриві сумки. Аскоспори мають голчасту або веретеноподібну форму, двоклітинні за рахунок утворення центральної перегородки. Спори (2–3,5 x 25–35 мкм) мають термінальний, ниткоподібний відросток, який може досягати довжини до 100 мкм. Відростки слизові, що зумовлюють групування аскоспор. Спороутворення спостерігається через 7 днів культивування при температурі 25°C. Встановлено, що рибофлавін, який синтезується в надмірній кількості під час спороутворення *A. gossypii*, захищає спори від ультрафіолетового випромінювання [16].

Фізіолого-біохімічні ознаки

Даний продуцент є аеробом. Росте в діапазоні температур 20-35 °С, оптимальний проміжок 26-28 °С (при 37 °С не росте).

Може рости за рівня рН 3,2-7,5, оптимум – лежить в діапазоні 5,5-6,5.

Як джерела вуглецю використовує сахарозу, глюкозу, фруктозу, мальтозу, рафінозу, целюлозу, етанол. Не утилізує галактозу, арабінозу, ксилозу, рамнозу, глюкозамін, дульцит, маніт, сорбіт, інозит, цитрат.

Як джерела азоту може споживати білки, пептиди та продукти їх гідролізу у вигляді пептону, дріжджового екстракту, соєвого борошна, казеїну і т.д. Не здатен відновлювати нітрати, але може асимілювати амонійний азот.

Представники *A. gossypii* здатні до синтезу ефірної олії, до складу якого входить гераніол (36,3-46,8%), цитронелол (0,5-2,9%), нерол (0,0-5,4%), β -фенілетанол (46,84-56,2%), ліналоол (0,1-0,4%), гераніаль (0,1-0,2%) [17].

Одержання мутантного штаму

Як вихідний штам використовували *Ashbya gossypii* ATCC 10895, який піддавали мутаціям.

Створювали вектор YCrG418, що складався з вирізаного з YCrplac111 фрагменту LEU2 (1.2 кб), у цей фрагмент у сайт рестрикції BamH I вставляли касету генів резистентності до генетицину (2,5 кб).

Вирощували дикий штам *Ashbya gossypii* ATCC 10895 на середовищі YD протягом 27 год. Міцелій відфільтровували, промивали дистильованою водою і розчиняли у 50 мМ калійфосфатному буфері (рН 6,8), що містив 25 мМ 2-меркаптоетанола. Суспензію інкубували при 30 °С протягом 30 хв при легкому перемішуванні міцелій відділяли фільтруванням і промивали трансформаційним буфером, що складався з 270 мМ сахарози, 10 мМ Tris-HCl (рН 7,5) і 1 мМ MgCl₂. Далі міцелій розчиняли у охолоджену трансформаційному буфері. 350 мкл суспензії міцелію змішували з 1,5 мкл плазмідами YCrG418/pold^{exo-}. Цю плазмиду поміщали у міцелій за допомогою електропорації за дії установки Gene Pulser Xcell system (Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, USA) (1.5 кВ/см, 100 Ω і 25 мкФ, використовуючи 2 мм попередньо охолоджені електро кювети (Bio-Rad). Після процедури міцелій поміщали на YD середовище і інкубували при 28 °С протягом 6 діб. Згодом міцелій покривали 20 мл середовища YD, що містив 0,6% агару і 200 мкг / мл генетицину, для виділення трансформантів. Після 3-6 днів інкубації стійкі до генетицину спори проростали на дні, а нитки міцелію доходили до поверхні агару. Аналогічно, стійкі до генетицину колонії відбирали і переносили в нову чашку YR, що містить 200 мкг / мл генетицину (G418-YR). Далі проводили скринінг і визначали найпродуктивніший штам [7].
Схема трансформації зображена на рис. 2.1.

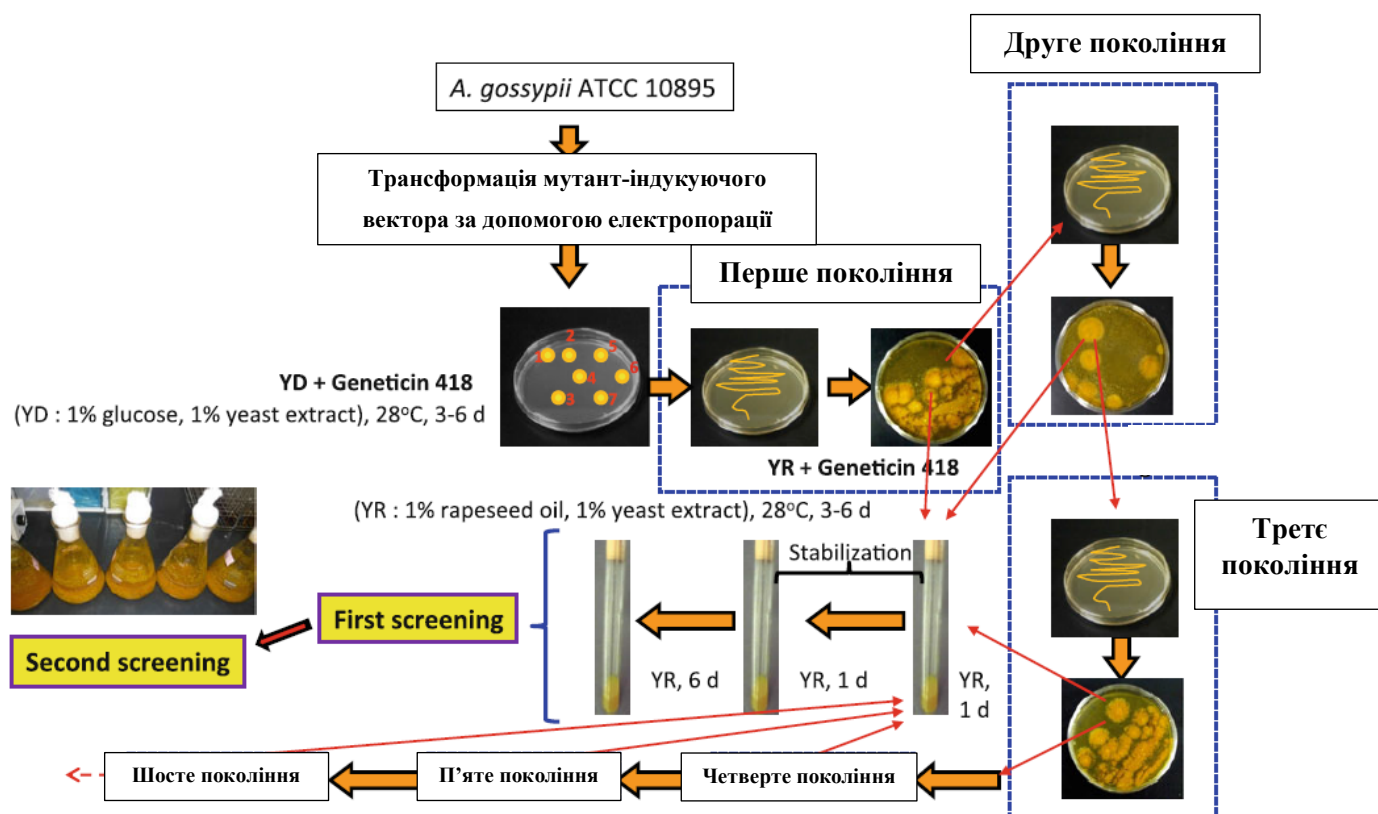


Рис. 2.1. Загальні процедури мутагенезу, що використовувалися при виділенні мутантів *Ashbya gossypii* – надпродуцентів рибофлавіну [7]

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Ashbya gossypii (також відомий як *Eremothecium gossypii*) являє собою ниткоподібний гриб. Уперше був виділений у 1926 році Ashby та Nowell. Після довготривалого аналізу морфології було вирішено віднести даний гриб до класу *Saccharomycetes*, а до роду *Eremothecium* включити види *Ashbya*, *Eremothecium*, *Holleya* та *Nematospora* [18].

Згідно з KEGG [19] дикий штам *Ashbya gossypii* ATCC 10895 (і відповідно мутант *A. gossypii* W122032) належить:

Домен: *Fungi*

Відділ: *Ascomycota*

Підвідділ: *Saccharomycotina*

Клас: *Saccharomycetes*

Порядок: *Saccharomycetales*

Родина: *Saccharomycetaceae*

Рід: *Eremothecium*

Згідно з Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi дикий штам *Ashbya gossypii* ATCC 10895 (і відповідно мутант *A. gossypii* W122032) належить:

Домен: *Fungi*

Підцарство: *Dikarya*

Відділ: *Ascomycota*

Підвідділ: *Saccharomycotina*

Клас: *Saccharomycetes*

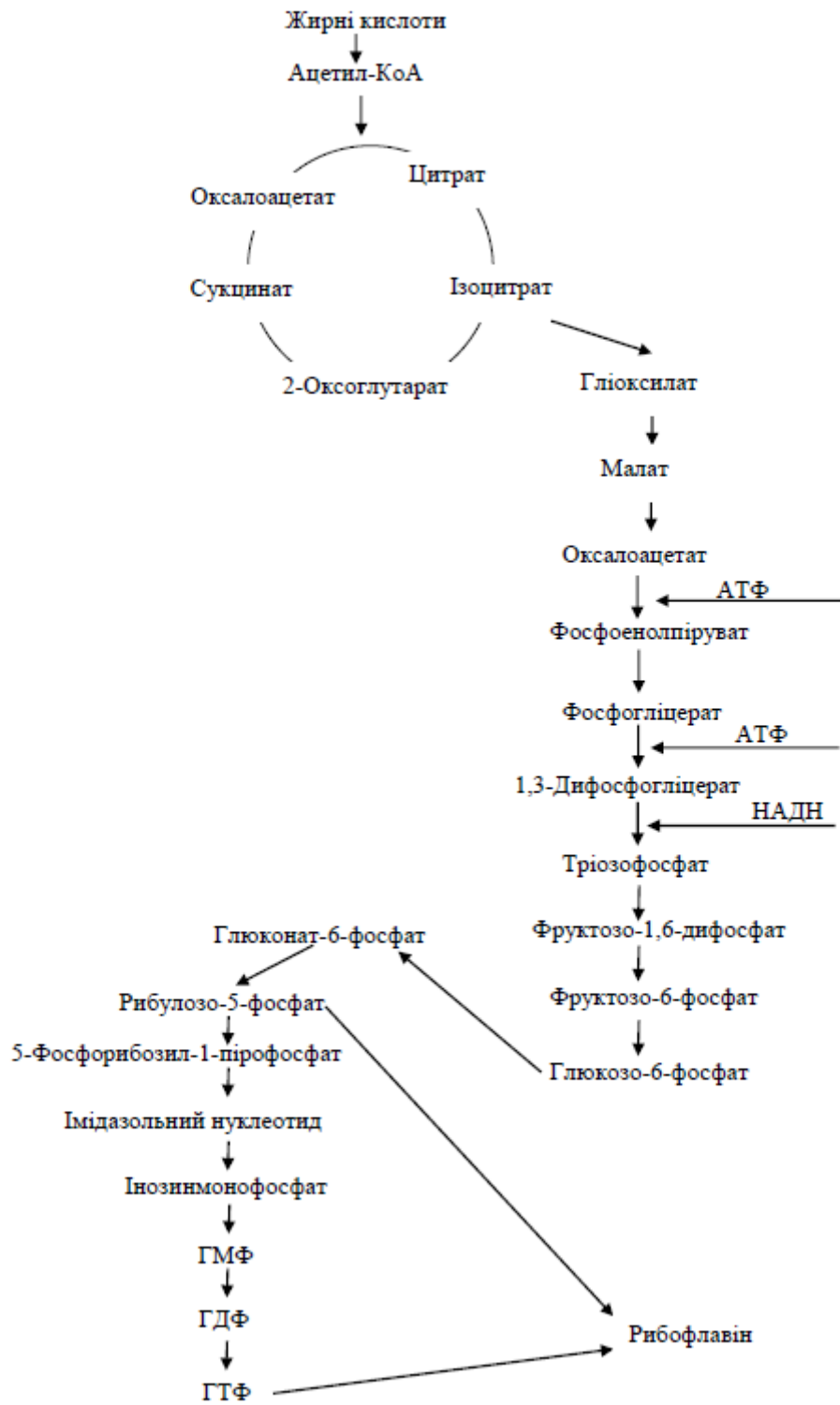
Порядок: *Saccharomycetales*

Родина: *Eremotheciaceae*

Рід: *Eremothecium*

2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Джерелом вуглецю у середовищі культивування *A. gossypii* W122032 є ріпакова олія [7]. Тому схему біотрансформації почнемо з жирних кислот.



РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Рибофлавін застосовують при гіпо- та арибофлавінозі екзо- та ендogenous походження, гемералопії, кон'юктивіті, іриті, кератиті, помутнінні роговиці, катаракті, ранах та язвах, що довго не загоюються, променевої хворобі, астенії, хейліті, кутовому стоматиті (заїди), глоситі, зудячому дерматозі, екземі, нейродерміті, фотодерматозі, себореї, червоних вуграх, кандидозі, вірусному гепатиті А, хронічному гепатиті, цирозі печінки, порушеннях функції ШКТ, спру, гіпотрофії, анемії, лейкозі. З профілактичною метою – при зниженні всмоктування з ШКТ, інтенсивній елімінації та збільшенні потреби в рибофлавіні (гостра і хронічна гіпоксія, дихальна та серцева недостатність, опікова хвороба, обмороження, нестача білкового та надлишок вуглеводного харчування, гострі інфекційні захворювання, в тому числі при лікуванні протимікробними засобами, що пригнічують грамнегативну флору кишечника, фототерапія) [1]. В останні роки дослідники починаються шукати нове застосування до вже відомих сполук. І рибофлавін не став виключенням.

Через шалений ритм життя величезний обсяг інформації щодня постійна втома та головний біль тепер є нашими типовими супроводжуваними. Але коли звичайний типовий головний біль можна приглушити різноманітними знеболюючими чи спазмолітиками існує біль з який так легко не подолати – мігрень. Мігрень – це не просто “болить голова”. Це регулярний сильний біль, що пульсує з одного боку, посилюється в разі діяльності і триває від двох до 48 годин. Це також чутливість до світла і звуків, нудота, тимчасові порушення зору, а також періоди “продрому” (підступів нападу) та постдрому (наслідків нападу). Мігрень – це дуже важке випробування. Але можна навчитися із

					НУХТ БТЕК 03.01ск.12 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Харченко О.Г.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Тетеріна С.М.					24	8
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

нею жити та зменшити частоту і силу нападів. Головна умова – завжди консультиватися та обирати правильне лікування разом з лікарем [3].

Дослідження показують, що мігрень вражає 15-25% жінок і 6-8% чоловіків, а також понад 2,5 мільйона чоловік в Північній Америці, які принаймні, один раз на тиждень страждають від мігрени [20].

За даними ВООЗ, від мігрени страждає кожен десятий мешканець планети. Тобто тисячі людей по всьому світу щодня звертаються до лікарів через пульсуючий головний біль. А за глобальним рейтингом захворювань 2016 року мігрень посідає друге місце серед захворювань, що найбільше обмежують працездатність, оскільки черговий приступ здатний серйозно вибити з колії або повністю зробити людину непрацездатною. З урахуванням діагностичних критеріїв Міжнародного товариства головного болю (IHS), поширеність мігрени в США становить близько 18% серед жінок і 6% – серед чоловіків. Схожа пропорція характерна і для більшості країн Європи.

Найвищі показники поширеності мігрени спостерігаються в найбільш продуктивні роки життя (у віці від 25 до 55 років); 90% осіб, які страждають на мігрень, переносять свій перший напад до 40-річного віку; 49,0% – приймають лікарські засоби під час нападу [21].

Крім того, дослідження останніх років показують зростання поширеності мігрени. За даними Національної служби здоров'я, у світі спостерігається збільшення превалентності мігрени на 60% – від 25,8 до 41 на 1000 населення.

Мігрень – також одна з найчастіших причин звернення за невідкладною медичною допомогою. За даними Національної служби амбулаторної медичної допомоги США, причиною понад 10 млн візитів до лікаря протягом року були саме головні болі [21].

На сьогодні постає питання як можна знизити ступінь болю. Одним із варіантів вирішення є підтримуюча терапія тривалого вживання високих (50-400 мг) концентрацій вітаміну В₂ [22]. У статті [22] узагальнили дані щодо використання різних концентрацій рибофлавіну для зменшення головних

болей. Результати досліджень показали, що щоденне вживання хоча б 50 мг вітаміну В₂ протягом 3-10 місяців дозволяє зменшити інтенсивність та частоту приступів болі – що значно полегшує життя хворим на мігрень людям [22].

3.2 Розрахунок потужності виробництва

На жаль, на сьогодні немає точних даних щодо того скільки українців страждає від цього захворювання. Тож візьмемо середні значення статистики даних ВООЗ – близько 18% серед жінок і 6% – серед чоловіків.

Розрахунок будемо вести для міста Києва. Якщо в подальшому терапія буде дієва – то зможемо розширити ринок реалізації кінцевого продукту. За даними Всеукраїнського перепису населення станом на 1 вересня 2020 року у Києві постійно проживає 2920147 осіб, з яких приблизно 1991000 жінок та 929147 чоловіків [23, 24].

Тоді, за попередніми даними, з них на мігрень страждає:

$$1991000 \times 0,18 + 929147 \times 0,06 = 414129 \text{ осіб}$$

Також варто зазначити, що ринок препаратів рибофлавіну досить широкий [25] (табл 3.1.)

Таблиця 3.1

Препарати Рибофлавіну

Назва	Дозування	Виробник
ВІТАМІН В2 (VITAMIN B2)	3 мг	АТ ТЕВА КУТНО, Польща
Vitamin B2	400 мг	Nutricost, США
Riboflavin	400 мг	Seeking Health, США
B-2 Tablets	250 мг	Nature's Life, США
Vitamin B-2	100 мг	NOW Foods, Канада, США
Vitamin B2	100 мг	Nature's Way, США
Pure Riboflavin	50 г	BulkSupplements, США
Vitamin B2 Riboflavin	100 мг	Solgar, Леона, Нью-Джерсі

Так як дані про ефективність тривалого вживання рибофлавіну ще не до кінця вивчені, зважаючи на менталітет наших людей, на новітню терапію

за використання саме нашого препарату згодиться 10% людей, що страждають на мігрень:

$$414129 \times 0,1 = 41413 \text{ осіб}$$

Враховуючи обрані нами необхідні концентрації та взявши середній курс лікування (6 місяців), маємо

$$41413 \text{ особи} \times 182 \text{ дні (6 місяців)} \times 50 \text{ мг/добу} = 376858300 \text{ мг} = 377 \text{ кг/рік}$$

рибофлавіну.

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення хворих на мігрень рибофлавіном необхідно 377 кг вітаміну в рік.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Зі статті [7] відомо, що культивування штаму *A. gossypii* W122032 концентрація вітаміну складає 13,7 г/л за 144 год культивування. Вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{ГП}$ складає частку 0,95.

Для проведення подальших розрахунків приймемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера

$$T_{ЦФ} = T_{Ф} + T_{ПО} = 144 + 10 = 154 \text{ год,}$$

де $T_{Ф}$ – час культивування; $T_{ПО}$ – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));

K_1 – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) приймемо $K_1 = 1,1$. Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{СВ} = 0,15$.

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції, становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Приймаємо кількість робочих трудоднів 100 ($T_{рд}$). Решта днів піде на синтез рибофлавіну як лікарський засіб для решти українців або як дієтична добавка.

При кількості трудоднів рівному 100, кількість продукту на добу ($G_{нтд}$) становитиме:

$$G_{нтд} = \frac{G_{нт}}{T_{рд}} = \frac{377}{100} = 3,77 \text{ кг/добу}$$

Кількість продукту на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_B = 10\%$):

$$G_{пд} = \frac{G_{нтд}}{1 - E_{св}} = \frac{3,77}{1 - 0,1} = 4,2 \text{ кг/добу}$$

Кількість рибофлавіну за цикл:

$$G_{цк} = \frac{G_{пд} \times T_{цф}}{24} = \frac{4,2 \times 154}{24} = 26,95 \text{ кг/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один виробничий цикл:

$$V_{кр} = \frac{K_1 \times G_{цк} \times CP_{ГП}}{P_{кр}} = \frac{1,1 \times 26,95 \times 0,95}{13,7} = 2,06 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$K_{ц} = \frac{G_{нт}}{G_{цк}} = \frac{377}{26,95} = 13,9 \text{ циклів}$$

Приймаємо 14 циклів.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які будуть становити 1%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{ф} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{ф}} = \frac{2060}{1 - 0,01} = 2081 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{зф} = 0,5$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе

$$V_{гф} = \frac{V_{ф}}{K_{зф}} = \frac{2081}{0,5} = 4162 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{нф} = 4 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{зф} = \frac{V_{ф}}{V_{нф}} = \frac{2081}{4000} = 0,52$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,75), отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{ф} = 2081$ л. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{нф} = 4000$ л.

Кількість посівного матеріалу (доза), згідно статті [7] становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 2081 л культуральної рідини потрібно:

$$V_{пс} = \frac{V_{ф}}{1 + X_{ф}} = \frac{2081}{1 + 0,1} = 1892 \text{ л}$$

де $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу для ферментера (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмф} = V_{ф} - V_{пс} = 2081 - 1892 = 189 \text{ л.}$$

Для одержання 189 л інокуляту в посівному апараті необхідно: враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять від 1%.

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

$$V_{па} = \frac{V_{пмф}}{1 - E_{ф}} = \frac{189}{1 - 0,01} = 191 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{па} = 191$ л можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{гпа} = \frac{V_{па}}{K_{зпа}} = \frac{191}{0,5} = 382 \text{ л}$$

Замовимо посівний апарат об'ємом 350 л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення посівного апарату:

$$K_{зпа} = \frac{V_{па}}{V_{ппа}} = \frac{191}{350} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,75), отже геометричний об'єм апарату вибрано вірно.

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

$$V_{пспа} = \frac{V_{па}}{1 + X_{па}} = \frac{191}{1 + 0,10} = 174 \text{ л}$$

де $X_{па}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмпа} = V_{па} - V_{пспа} = 191 - 174 = 17 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу $V_{па} = 17$ л можна одержати під час культивування у інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{гпа} = \frac{V_{па}}{K_{зпа}} = \frac{17}{0,5} = 34 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом інокулятор $V_{нф} = 30$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення інокулятора:

$$K_{зпа} = \frac{V_{па}}{V_{нпа}} = \frac{17}{30} = 0,57$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,75), отже геометричний об'єм апарату вибрано вірно.

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

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{17}{1 + 0,10} = 15,5 \text{ л}$$

де $X_{\text{па}}$ – доза посівного матеріалу для інокулятора (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 17 - 15,5 = 1,5 \text{ л}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням у колбах. Для цього використовують колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{1500}{750 \times 0,2} = 10$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 10 колб. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу рибофлавіну у ферментері об'ємом 4000 л з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде проходити у 3 етапи.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Оптимальними умовами росту штаму *A. gossypii* W122032 є температура $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$, та рівень рН 6,8 [7].

Передбачається асептичний спосіб культивування – це означає, що в ферментері (інокуляторі чи посівному апараті) знаходиться лише культура *A. gossypii* W12203. Адже за даних оптимальних умов росту (28°C і нейтральне рН) існує ризик контамінації середовища сторонньою мезофільною мікрофлорою. Також варто зазначити високий вміст термолабільних сполук, що є основними джерелами азоту та вуглецю, що також може спричинити контамінацію.

Доцільно буде використовувати глибинний спосіб, що має переваги перед поверхневим: висока ефективність і ступінь використання компонентів поживного середовища, стерильність, можливість контролювати співвідношення компонентів поживного середовища.

Варто зазначити, що синтез цільового продукту – рибофлавіну – відбувається у стаціонарній фазі росту [5], що означає, що в даному випадку доцільним буде використання періодичного способу культивування – щоб забезпечити максимальний вихід вітаміну. При періодичному способі культивування весь об'єм поживного середовища засівають чистою культурою і процес проводять в оптимальних умовах певний проміжок часу до накопичення необхідної кількості цільового продукту. Також періодичний спосіб культивування забезпечує повну асептичність виробництва, в порівнянні з безперервним.

					НУХТ БТЕК 03.01ск.12 ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Харченко О.Г.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Тетеріна С.М.				32	9
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					

Обґрунтування вибору ферментера

Вибір ферментера базується на особливостях способу культивування, вони були зазначені раніше.

Основними вимогами до ферментерів є асептичність умов та достатній для культивування продуцента рівень аерації.

Для забезпечення аерації у нижній частині ферментера встановлюють барботер. Для вищого коефіцієнту масообміну ферментер повинен бути обладнаний також механічним перемішуючим пристроєм. Існує декілька типів перемішуючих пристроїв, проте одним з найефективніших варіантів є мішалки турбінного типу. Турбінна мішалка підвищить диспергацію кисню в культуральній рідині, таким чином інтенсифікуючи аерацію [26].

При використанні турбінної мішалки ймовірно виникнення кругового руху рідини в апараті, в результаті чого утворюється воронка. У такому випадку в апараті на невеликій відстані від стінок встановлюються відбивні перегородки, щоб уникнути утворення застійних зони при перемішуванні.

Щоб задовольнити річну потребу необхідно підібрати ферментер об'ємом 4000 л. Нам необхідно підібрати апарат, що буде виконаний з якісних матеріалів, має бути облаштований необхідними нам датчиками – рН, концентрація кисню та датчиком оптичної густини. Серед величезного асортименту на ринку варто обирати також враховуючи авторитет виробника та наявність сертифікованої продукції. Такими є ферментери фірми GEA [27]. Матеріал обраного нами ферментера – це сталь, а об'єм – 4 м³.

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Досліджуваний штам є аеробом і тому потребує постійної аерації, що пояснює необхідність забезпечення аеробного способу культивування.

Для стерилізації повітря в боксах в лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують ультрафіолетові лампи.

Процес підготовки та стерилізації аераційного повітря проводять у декілька етапів, задля ефективною очистки та запобіганню швидкого псування дороговартісних фільтраційних матеріалів.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри), щоб відокремити з повітря часточки великих розмірів, та індивідуальних фільтрів (фільтрів високої ефективності), для остаточного відділення часточок малих розмірів, які не затрималися на попередніх фільтрах. Основними вимогами до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до і після фільтра.

Забір повітря для фільтрів грубої очистки здійснюємо на висоті 11 м, тому що будівля являє собою одноповерхову споруду висотою 8 м з товщиною даху, укосів 1 м та враховують 3 м на забір повітря. Потім повітря очищають від пилу на пласких тканинних фільтрах грубого очищення та стискають його в компресорах для подолання повітрям опорів під час очищення та надходження в апарати (фільтруючі матеріали, трубопроводи, культуральна рідина у ферментерах), за рахунок чого воно нагрівається до температури 220 – 250 °С. Далі повітря охолоджують до температури «точки роси» у теплообміннику, щоб відділити вологу у вигляді конденсату з повітря для попередження руйнування фільтруючих матеріалів фільтрів тонкого та індивідуального очищення, які є чутливими до неї. Після цього сконденсовану вологу видаляють у ресивері, де одночасно проводиться зменшення пульсації руху повітря, яке може негативно впливати на роботу подальших фільтрів очистки. Перед подачею на головні фільтри очистки повітря стабілізують підігріванням до температури 45 – 50 °С паром у теплообмінниках.

Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментом, посівним апаратом або інокулятором. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється приблизно 98% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються

надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів [28].

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Підготовка мийних засобів проводиться з метою очищення обладнання від залишків попереднього культивування та бруду, які здатні контамінувати культуральну рідину при виробничому культивуванні. Тому, для попередження таких забруднень використовують мийчі засоби.

До мийних та дезінфікуючих засобів існують наступні вимоги:

- широкий спектр антимікробної дії;
- безпечні для людей та тварин – не пошкоджувати шкіру та слизові оболонки;
- не мати їдкого запаху;
- швидко дію і пролонгований ефект;
- не повинні псувати предмети, що підлягають дезінфекції;
- ціна й доступність.

Для вибору мийних та дезінфікувальних засобів враховують їх вартість, витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення та ефективність. На 1 м² затрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502) [29].

Для підготовки обладнання, а саме для миття комунікацій та реакторів різного типу і об'єму необхідно обрати доступний засіб, розглянемо декілька варіантів. Каустична сода – водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі 1–2% розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчину мийні властивості засобу знижуються. Розчини каустичної соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію, тому необхідно обирати обладнання зі сталі [29].

Рекомендується використовувати 0,5% розчини каустичної соди із температурою (45±5) °С для ручного миття технологічного обладнання та

інвентарю, а також 1 та 2 % розчини із температурою (55 ± 5) °C для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій.

Біомой – мийний засіб, що містить синтетичні поверхово активні речовини та протеолітичні ферменти. Водні розчини Біомою безбарвні, прозорі, виявляють мийні, емульгуючі та диспергуючі властивості, легко видаляють білково-жирову плівку з поверхонь технологічного обладнання, легко змиваються, не залишають нальоту. Розчини Біомою не пошкоджують об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми. Засіб належить до мало небезпечних речовин (4 клас безпеки), не виявляє кумулятивні, шкіряно резорбтивні та алергенні властивості [30].

Рекомендується 0,5 % розчин Біомою температурою 40 ± 5 °C для ручного миття технологічного устаткування, скляної і полімерної тари та інвентарю, а також 0.15-0.3% розчини температурою 40 ± 5 °C для циркуляційного миття технологічного обладнання і комунікацій та миття скляної і полімерної тари.

Необхідно оцінити вартість засобів і з цього обрати кінцевий засіб для миття обладнання. Ціна каустичної соди за 1 кг становить в середньому 20 грн [31], тобто ціна за 2%-ий робочий розчин – 0,4 грн, ціна на Біомой – 174,24 грн/кг [32], тобто ціна за 0,5%-ий робочий розчин – 0,87 грн. Отже обираємо для миття обладнання каустичну соду.

Кількість трудоднів становить 100, тому необхідно обрати мінімум 2 дезінфікуючих засоби з різними дієвими сполуками, для попередження виникнення резистентності у можливих контамінантів. Також задля дотримання санітарно-гігієнічного стану виробництва необхідно проводити генеральне та щоденне прибирання. Для щоденного та генерального прибирань необхідно застосовувати універсальний миючий засіб який дозволить обробляти і мити різні поверхні на підприємстві з високою ефективністю. Засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів. На ринку України

представлений широкий вибір миючих засобів для таких цілей. Керуючись співвідношенням ціна – якість необхідно обрати два із оптимальних миючих засобів.

Такими засобами є Гембар, та Деконекс 50 ФФ [33, 34].

Гембар є нетоксичною гуанідиною полімерною сполукою. Має ряд переваг:

- Добре розчинний у воді
- Пролонгована дія;
- Низька токсичність і висока безпечність (дозволяє проводити дезінфекцію в присутності людей, а обслуговуючому персоналу при роботі з робочими розчинами не застосовувати традиційних засобів індивідуального захисту очей і слизових оболонок);
- Стабільність робочих розчинів;

В якості активно діючої речовини Деконекс 50 ФФ містить гліюксаль, глутаровий альдегід, дидецилдиметиламоній хлорид. До складу засобу введені гліколі, суміш ефірних олій і вода. Добре розчиняється у воді. Засіб відноситься до помірно небезпечних речовин при інгаляційному надходженні до організму (3 клас безпеки). У нативному вигляді та концентрованих розчинах подразнює шкіру, слизову оболонку очей і верхніх дихальних шляхів. Для приготування робочих розчинів деконексу 50 ФФ використовують холодну воду (при застосуванні гарячої води можливе випаровування отруйних парів альдегідів). Не кородують об'єкти, виготовлені з металу скла полімерних матеріалів та гуми. Рекомендується використовувати 0.25, 0.5 і 1.0 % розчини деконексу 50 ФФ для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю та санітарно – технічного обладнання, а також технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю і внутрішньо цехової тари [34].

Отже, для миття обладнання застосовують розчин каустичної соди, через низьку вартість та ефективність миття. Треба зауважити, що вона є

токсичною і при потраплянні на шкіру у персоналу можуть з'явитися опіки та подразнення. Тому при роботі використовують захисні засоби: захисні окуляри, гумові рукавички, прорезинений хімічно стійкий одяг.

Для щоденного та генерального прибирань використовують миючі засоби Гембар та Деконекс 50 ФФ. Вони економічні і доцільні для використання їх на підприємстві. Обрані засоби не несуть прямої загрози персоналу на виробництві.

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Варто відмітити склад поживного середовища для вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу штаму W12203 [7].

Середовище для вирощування інокуляту (г/л):

- Кукурудзяний екстракт – 60
- Дріжджовий екстракт – 9
- Ріпакова олія – 15

Середовище для виробничого біосинтезу (г/л):

- Ріпакова олія – 90,5
- Кукурудзяний екстракт – 40,3
- Дріжджовий екстракт – 36,1
- Соєвий жмх – 15
- Гліцин – 2
- Аланін – 0,2
- Глутамінова кислота – 0,47
- K_2HPO_4 – 1,5
- Розчин мікроелементів

Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в колбах на качалках

На етапі підготовки інокуляту склад поживного середовища однаковий. Лише в залежності від об'єму самого поживного середовища буде

відрізнятися місце стерилізації – від автоклава для малих об'ємів (до 3-х літрів), до відповідних інокуляторів чи посівних апаратів (що відповідають певному етапу підготовки поживного середовища).

Розділяємо поживне середовище на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція I: ріпакова олія, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт (умови стерилізації – 112 °С, 30 хв).

Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 30 л

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті, становить 17 л. Поживне середовище ділимо на такі композиції:

Композиція I: ріпакова олія, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт (умови стерилізації – 112 °С, 30 хв).

Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в посівному апараті об'ємом 350 л

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі, становить 191 л. Поживне середовище ділимо на такі композиції:

Композиція I: ріпакова олія, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт (умови стерилізації – 112 °С, 30 хв).

Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 4000 л

Об'єм середовища, необхідний для процесу біосинтезу в ферментері, становить 2081 л. Поживне середовище ділимо на такі композиції:

Композиція I: ріпакова олія, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, соєвий жмих, гліцин, аланін (умови стерилізації – 112 °С, 30 хв).

Композиція II: глютамінова кислота, монофосфат калію, розчин мікроелементів, (умови стерилізації – 131 °С, 40 хв).

Композицію I складають термолабільні сполуки, тому дані компоненти стерилізуються окремо та за інших умов.

Композицію II складають основні та фосфорні солі, які підкислюють 6% розчином HCl у кількості 2 мл на 1 л середовища. Розчин HCl стерилізації не потребує. Після стерилізації рН середовища доводять до 6,8 за допомогою стерильного 6% розчину гідроксиду натрію у кількості 2 мл/л.

Отже, технологічна схема біосинтезу антибіотику передбачає наявність таких допоміжних робіт:

- Приготування 6% розчину HCl
- Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH
- Приготування та стерилізація поживних середовищ.

Додаткове обладнання:

- Збірник для приготування 6% розчину HCl
- Збірник з сорочкою для приготування 6% розчину NaOH
- Збірники з сорочкою для приготування поживного середовища.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу рибофлавіну *Ashbya gossypii* W122032

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування робочого миючого розчину	1	Реактор-змішувач об'ємом 3 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
H-2 H-11 H-15 H-19 H-24 H-26	Насос відцентровий	6	Насос відцентровий Debem MB 120. Продуктивність 25,0 м ³ /год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debem» (Україна). ²
ПЗ-3	Пристрій для забору повітря	1	Повітрязабірник, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-4	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр CFM. Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволка, швидкість фільтрування – 2 м/с, Е = 75 %. Виробник: «General filter» (Італія). ³
К-5	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина). ⁴
Т-6	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Systemair PGK. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 ⁰ С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁴
P-7	Ресивер	1	Ресивер РВ 900.10. Об'єм 900 л, робочий тиск 1,1 МПа. Виробник: «Remeza» (Білорусь). ⁴

НУХТ БТЕК 03.01ск.12 ДП ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Харченко О.Г.		
Перевір.		Тетеріна С.М.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
		Літ.	Арк.	Акрушів
			41	3
Кафедра БТМ				

1	2	3	4
T-8	Теплообмінник-нагрівач	1	Пароконтактний нагрівач Mitsubishi SAF-DX. Індекс потужності 36. Виробник: «Mitsubishi Heavy» (Японія). ⁴
Ф-9	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр (P)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча сталеві сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁵
P-10	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 20 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
Ф-12 Ф-16 Ф-22	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтри (P)–SRF N. Фільтруючий матеріал – фторопласт, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 99,9999 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁵
ФР-13	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 30 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$, нержавіюча сталь 316L. Виробник: («GEA Group» (Німеччина) ⁶
P-14	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 250 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
ФР-17	Посівний апарат	1	Ферментер об'ємом 350 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$, матеріал 316 L. Виробник: («GEA Group» (Німеччина) ⁶
P-18	Реактор-змішувач для композиції I	1	Реактор-змішувач об'ємом 800 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
P-20	Реактор-змішувач для хлоридної кислоти	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-300 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹

1	2	3	4
P-21	Реактор-змішувач для гідроксиду натрію	1	Реактор-змішувач об'ємом 6 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-300 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
ФР-23	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 4000 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$, матеріал 316 L. Виробник: («GEA Group» (Німеччина) ⁶
P-25	Реактор-змішувач для композиції II	1	Реактор-змішувач об'ємом 2 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹

Примітка: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних

- електронних джерел: 1. <http://promvit.com.ua/> («Промвіт», ємнісне обладнання),
 2. www.debem.com.ua («Debem», насоси), 3. <http://www.air-filter.com.ua> («General filter», фільтри для повітря), 4. <http://www.vent-magazin.ru>, <http://www.dalgakiran.com.ua>, <http://www.mitsubishi-heavy.com.ua/saf-dx.html> (обладнання для підготовки повітря),
 5. <http://www.emea.donaldson.com> («Donaldson» фільтри для повітря),
 6. <https://www.gea.com/> («GEA Group», інокулятор 30 л, посівний апарат 350 л, ферментер 4000 л).

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу вітаміну рибофавіну під час культивування *A. gossypii* W122032 включає в себе допоміжні роботи (підготовка приміщень, повітря; приготування 6% розчину HCl, приготування та стерилізація 6% розчину NaOH, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу рибофлавіну наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Обов'язковою частиною підготовчих робіт на біотехнологічних підприємствах є проведення робіт санітарно-гігієнічного спрямування. Основним спрямуванням санітарної підготовки виробництва є забезпечення мінімальної кількості контамінантів у всіх учасників виробничого процесу: в поживному середовищі, на поверхнях обладнання, яке контактує з культуральною рідиною, забезпечення чистоти на виробничих ділянках де чистота та асептика впливають на якісні показники продукції. Санітарна підготовка виробництва реалізується виконанням робіт по щоденному позмінному та генеральному прибиранні виробничих приміщень та централізованою підготовкою обладнання.

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Навчання персоналу

Навчання персоналу забезпечує саме підприємство. На підприємстві існують такі види навчань:

1. Основне навчання: проводиться один раз на рік; персонал ознайомлюється з теорією і практикою;

					НУХТ БТЕК 03.01ск.12 ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Харченко О.Г.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Тетеріна С.М.				44	13
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					

2. Вхідне навчання: проводиться по мірі необхідності, коли на певну посаду наймають нового співробітника;
3. Подальше навчання: здійснюється систематично з подальшим оцінюванням практичної ефективності проведених навчань.

ДР 1.1.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу

Для миття рук персоналу використовують мило туалетне та мило господарське.

ДР 1.2. Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів

ДР 1.2.1. Приготування робочого розчину Гембар

У лабораторному приміщенні у переносній емальованій ємкості об'ємом 10 л готують робочий мийно-дезінфікувальний засіб Гембар концентрацією 0,25 %. Для цього змішують 100 мл 25% концентрату і 9,9 л питної води.

ДР 1.2.2. Приготування робочого розчину каустичної соди

Необхідно приготувати 2300 л робочого розчину каустичної соди концентрацією 2,0 %. У реактор-змішувач (Р-1) об'ємом 3 м³ об'ємно-ваговим дозатором вносять 46 кг каустичної соди і додають 2254 л питної води. Для повного розчинення у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 55-60°C, і вмикають перемішуючий пристрій (100-500 об/хв.).

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень

Один раз на зміну проводять миття підлоги, використовуючи розчин мийно-дезінфікувальний засіб Гембар (від ДР 1.2.1). Цим же розчином протирають зовні апаратуру і комунікації; змочують килимки при вході у всі приміщення. Так як виробництво триває 100 днів, необхідно забезпечити виробництво додатковим миючим засобом з іншою діючою речовиною. Через 2 місяці будемо використовувати Деконекс 50 ФФ.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень

Раз на місяць проводять миття стін, вікон та дверей, використовуючи розчин мийно-дезинфікувального засобу Гембар (від ДР 1.2.1). Протирають ззовні апаратуру і комунікації.

Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль (КУО < 800/см²).

ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій

Для миття обладнання та комунікацій застосовують розчин каустичної соди у концентрації 2 % (від ДР. 1.2.2) підігрітого до температури 50 – 60 °С, а саме подаючи цей розчин від збірника (Р-1) відцентровим насосом (Н-2) по комунікаціям до відповідних апаратів до заповнення 30% об'єму апаратів, вмикають перемішуючий пристрій. Миття здійснюють протягом 1 год при перемішуванні. Відпрацьований розчин після миття йде на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1). Для ополіскування в апарати по комунікаціях подається питна вода до заповнення 50% об'єму апаратів, вмикають перемішуючий пристрій. Далі після зливу вода направляється на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1).

ДР 1.4.2. Технічний огляд

Після миття та ополіскування ємкісного обладнання проводять його технічний огляд з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.4.3. Перевірка на герметичність

На ємкісному обладнанні закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість

леткої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80 °С і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа.

Тривалість операції становить 1,5-2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію.

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають пару і нагрівають апарат до температури 80–90 °С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат (через нижній спуск або барботер), при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130–135 °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 °С і надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 11 м через пристрій для забору повітря (ПЗ-3).

ДР 2.2. Грубе очищення повітря

Повітря очищується від грубого аерозолю на фільтрі грубої очистки (Ф-4). Ступінь очищення – 90 %.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Повітря стискають у компресорі (К-5) до 0,4 МПа. Стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–150 °С і збільшення вмісту вологи.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі (Т-6) повітря до температури 20 °С для відведення надлишкової вологи. Далі повітря подають на ресивер (Р-7) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи (W = 60 %).

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря підігрівають до 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють за теплообмінника (Т-8).

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-9). Ступінь очищення – 98 %.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Усі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром для заключної очистки повітря (Ф-12, Ф-16, Ф-22). Ступінь очищення досягає 99,999%.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування 6% розчину соляної кислоти для підкислення середовища в ферментері об'ємом 4 м³

Для приготування 4 л 6% розчину HCl, необхідно 433 мл концентрованої 36% HCl і 2167 мл дистильованої води.

У збірник (Р-20) об'ємом 5 л вносять 3,333 мл дистильованої води, далі за допомогою мірного циліндру відміряють і додають 667 мл 36% розчину HCl.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для підлучення поживного середовища в ферментері об'ємом 5 м³

Для приготування 4,5 л 6% розчину NaOH, необхідно 270 г кристалічного NaOH і 4,5 л дистильованої води.

На технічних вагах зважують 270 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в збірник (Р-21) об'ємом 6 л, добавляють 4,5 л дистильованої води і вмикають перемішуючий пристрій. Для повного розчинення

компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізують при температурі 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв. У процесі стерилізації контролюють час, тиск та температуру стерилізації.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 1500 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища для цієї стадії наведено в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1500 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 1500 мл середовища, г	Композиція	Об'єм води, мл	Об'єм композиції, мл
Кукурудзяний екстракт	60	90	I	1374	1500
Ріпакова олія	15	22,5			
Дріжджовий екстракт	9	13,5			

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції I

На технічних вагах зважують 90 г кукурудзяного екстракту, 22,5 г ріпакової олії та 13,5 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають 1374 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв. У процесі стерилізації контролюють час та температуру стерилізації.

ДР 4.2. Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 17 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в табл. 6.2.

Для засіву поживного середовища в інокуляторі необхідно внести 1,5 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композицій становить 14,1 л (так як стерилізація проходить безпосередньо в апараті, також враховують 10% конденсату).

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 17 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 17 л середовища, г	Композиція	Об'єм води, л	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний екстракт	60	1020	I	12,67	14,1
Ріпакова олія	15	255			
Дріжджовий екстракт	9	153			

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції I

На технічних вагах зважують 1020 г кукурудзяного екстракту, 255 г ріпакової олії та 153 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у збірник (Р-10) об'ємом 20 л, додають 12,67 л питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій. Приготовлене поживне середовище подають за допомогою насоса (Н-11) в інокулятор (ФР-13).

Стерилізація поживного середовища проходить в інокуляторі (ФР-13) при температурі 112°C упродовж 30 хв. У процесі стерилізації контролюють час та температуру стерилізації. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

ДР 4.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 350 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 191 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в табл. 6.3.

Для засіву поживного середовища в інокуляторі необхідно внести 17 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композицій становить 158,2 л (так як стерилізація проходить безпосередньо в апараті, також враховують 10% конденсату).

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 191 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 191 л середовища, кг	Композиція	Об'єм води, л	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний екстракт	60	11,5	I	142,2	158,2
Ріпакова олія	15	2,8			
Дріжджовий екстракт	9	1,7			

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції I

У збірник (Р-14) об'ємом 250 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 11,5 кг кукурудзяного екстракту, 2,8 кг ріпакової олії, 1,7 кг дріжджового екстракту та 142,2 л питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій. Приготовлене поживне середовище подають за допомогою насоса (Н-15) у посівний апарат (ФР-17).

Стерилізація поживного середовища проходить в посівному апараті (ФР-17) при температурі 112°C упродовж 30 хв. У процесі стерилізації контролюють час та температуру стерилізації. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

ДР 4.4. Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 4 м³

Для проведення стадії виробничого біосинтезу необхідно приготувати 2081 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в табл. 6.4.

Для засіву поживного середовища у ферментері необхідно внести 191 л рідкого інокуляту, тому сумарна кількість води для композиції становить 1718 л (так як стерилізація проходить безпосередньо в ферментері, також враховують 10% конденсату).

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2081 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2081 л середовища, кг	Композиція	Об'єм води, л	Об'єм композиції, л
Ріпакова олія	90,5	188,3	I	197,9	581
Кукурудзяний екстракт	40,3	83,9			
Дріжджовий екстракт	36,1	75,1			
Соевий жмих	15	31,2			
Гліцин	2	4,2			
Аланін	0,2	0,4			
KH ₂ PO ₄	1,5	3,1	II	1495,8	1500
Глутамінова кислота	0,47	0,98			
CoCl ₂	4,406 мг	9,2 г			
MnCl ₂ ·4H ₂ O	18,1 мг	37,7 г			
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	44 мг	91,6 г			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10,14 мг	21,1 г			

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції I

У збірник (P-18) об'ємом 800 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 188,3 кг ріпакової олії, 83,9 кг кукурудзяного екстракту, 75,1 кг дріжджового екстракту, 31,2 кг соєвого жмиху, 4,2 кг гліцину, 0,4 кг аланіну та 197,7 л питної води. Для повного розчинення компонентів у

сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій.

Стерилізація поживного середовища проходить в збірнику (P-18) при температурі 112°C упродовж 30 хв. У процесі стерилізації контролюють час та температуру стерилізації. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції II

На технічних вагах зважують 3,1 кг дигідрофосфату калію, 0,98 кг глютамінової кислоти, 9,2 г кобальт хлориду, 37,7 г манган хлориду, 91,6 г цинк сульфату, 21,1 г магній сульфату. Наважки поміщають у збірник (P-25) об'ємом 2 м³, за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 1495,8 л питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій.

Приготовлене поживне середовище подають за допомогою насосу (Н-26) у попередньо простерилізований ферментер (ФР-23). Перед стерилізацією поживного середовища у посівний апарат, обладнаний рН-метром, зі збірника (P-20) подають 6% розчин HCl (від ДР 3.1.) до рН розчину 4,5-5.

Стерилізація поживного середовища проходить безпосередньо в ферментері (ФР-23) під тиском 0,15 МПа при температурі 131°C упродовж 40 хв. У процесі стерилізації контролюють час, тиск та температуру стерилізації. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

Початкові етапи з культурою (до етапу отримання інокуляту в колбах на качалках і далі) проводять на середовищі YD (10 г/л глюкози, 10 г/л дріжджового екстракту, 20 г/л агару).

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *A. gossypii* W122032 зберігають у пробірках зі скошеним YD середовищем у холодильнику при температурі 4 °C. Пересіви здійснюють

кожні 3 місяці. Усі роботи за колекційною культурою проходять строго в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Робочу культуру штаму-продуцента отримують розсівами колекційної культури на чашки Петрі із YD середовищем в асептичних умовах. Культуру на чашці Петрі вирощують при температурі 28°C протягом 4 діб.

Ізольовані колонії в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим середовищем. Одна ізольована колонія засівається в одну окрему пробірку. Для пересіву використовують колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 4 доби при температурі 28°C. У процесі роботи контролюють температуру інкубації.

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Колбу з простерилізованою композицією I розливають по 150 мл в 10 стерильних качалочних колби об'ємом 750 мл. У пробірку з робочою культурою культурою *A. gossypii* W122032, вирощену на YD середовищі, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування здійснюється у колбах на качалці (220 об/хв) при 28°C упродовж 48 год. Під час культивування контролюють температуру. У кінці культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Після завершення вирощування в асептичних умовах інокулянт з 2-х колб переносять в засівну колбу об'ємом 1 л, перемішують, закривають пробкою.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

В інокулятор (ФР-13), об'ємом 30 л з простерилізованою композицією I (ДР 4.2.1) за допомогою засівної колби вносять посівний матеріал (від ТП 5.3). Включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в рубашку

інокулятора (ФР-13) подають холодну та гарячу воду для підтримки відповідної температури.

Культивування здійснюють при температурі 28 °С, впродовж 48 год, 200об/хв. Кожні 4 години відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Під час роботи контролюють температуру культивування.

ТП 5.5. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 350 л

У посівний апарат (ФР-17), об'ємом 350 л з простерилізованою композицією I (ДР 4.3.1) за допомогою стерильного стисненого повітря по трубі перетискування з інокулятора (ФР-13) перекачують посівний матеріал (від ТП 5.4). Вмикають перемішувач, аерацію, в рубашку посівного апарату (ФР-17) подають холодну та гарячу воду для підтримки відповідної температури.

Культивування здійснюють при температурі 28 °С впродовж 48 год. Кожні 4 години відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Під час роботи контролюють температуру культивування.

ТП 6. Біосинтез

У ферментер (ФР-23), об'ємом 4000 л з простерилізованою композицією II (ДР 4.4.2) зі збірника за допомогою насоса (Н19) додають стерильну композицію I (ДР 4.4.1). Далі за зі збірника (Р-21) з розчином 6 % розчином NaOH (від ДР 3.2) доводять рН поживного середовища до рН 6,8. Потім з посівного апарату (ФР-17) перекачують 250 л посівного матеріалу (від ТП 3.6) у ферментер. Вмикають перемішування (600 об/хв) та аерацію (1 л/л/хв), в рубашку ферментера (ФР-23) подають холодну та гарячу воду для підтримки відповідної температури.

Біосинтез здійснюють при температурі 28 °С впродовж 144 год. У процесі культивування, кожні 4-6 год, відбирають проби для здійснення мікробіологічного контролю та контролю показників росту та синтезу. Під

час роботи контролюють температуру, кількість оборотів, рН та аерацію. На кінець біосинтезу концентрація вітаміну має складати 13,7 г/л.

ЗВ 7. Знешкодження відходів

ЗВ 7.1. Знешкодження рідких відходів

Розчини мийно-дезінфікувальних засобів від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР 1.3.1 йдуть на очисні споруди.

ЗВ 7.2. Знешкодження повітряних відходів

Відпрацьоване повітря, що надходить з посівного апарату та ферментеру (від ТП 5.4, 5.5, ТП 6) відправляють у системи знешкодження повітряних відходів.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Таблиця 7.1

7.1 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
Кх 1.1.1 Підготовка робочого розчину Гембару	Концентрація розчину Гембару	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 0,25 \%$
Кх, Кт 1.1.2 Підготовка робочого розчину каустичної соди	Концентрація робочого розчину каустичної соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 2\%$, $t = 55-60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $w=100-500 \text{ об/хв}$
Км 1.2.1. Щоденне прибирання	Підлога, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Км 1.2.2. Генеральне прибирання	Підлога, стіни, вікна, двері, чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний метод	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, $KУО < 800/\text{см}^2$
Кт 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій	Мийний розчин, обладнання, температура робочого розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	$t = 50-60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 60 \text{ хв}$, чисте обладнання

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4	5
Кт 1.3.2. Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, перепад тиску	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	$P = 0,1-0,2$ МПа, $\tau = 30-60$ хв, $\Delta P < 0,01$ МПа
Кт 1.3.4. Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, надлишковий тиск визначають після проведення стерилізації	$P=0,15$ МПа ($t = 130-135$ °С), $\tau = 1$ год, $P = 0,003-0,005$ МПа
Кт 2.2. Попереднє грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 75$ %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3. Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,35-0,5$ МПа, $t = 220-250$ °С
Кт 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, температура, повітря після видалення зайвої вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря, після видалення зайвої вологи	$t = 25-40$ °С, $W = 60$ %

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4	5
Кт 2.5. Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 2.6. Головне тонке очищення повітря	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	$E = 95 \%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря на виході з індивідуального фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у індивідуальному фільтрі	$E = 99,999 \%$, тиск згідно паспорту
Кх 3.1. Приготування 6% розчину соляної кислоти для підкислення середовища в ферментері об'ємом 4 м^3	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	$C = 6 \%$

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4	5
Кх, Кт 3.2. Приготування і стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для підлужнення поживного середовища в ферментері об'ємом 4 м ³	Тиск, температура, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину гідроксиду натрію	Манометр технічний, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск і температура визначається під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль проводять після стерилізації	P=0,15 МПа (t = 131 °С), τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, С = 6 %
Кт, Км 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції І	Композиція І, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск і температура визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P= 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції І	Композиція І, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск і температура визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P= 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск і температура визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t = 112$ °С, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск і температура визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t = 112$ °С, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції II	Композиція II, рН, тиск, температура, час стерилізації, стерильність	Датчик рН і температури, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	рН, тиск і температура визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131$ °С, $P = 0,15$ МПа, $pH = 4,5-5,0$ $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1. Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, частота пересівів, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура протягом зберігання. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 4$ °С, $\tau = 3$ місяці, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 5.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Колекційна культура, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура під час вирощування. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 4$ доби, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3. Вирощування інокуляти в колбах на качалках	Посівний матеріал, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 220$ об/хв, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 5.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л	Посівний матеріал, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту в посівному апараті і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 200$ об/хв, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 5.1

1	2	3	4	5
<p>Кх, Кт, Км 5.5. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 350 л</p>	<p>Посівний матеріал, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час вирощування інокуляту в посівному апараті і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год</p>	<p>$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 200\text{ об/хв}$, $\tau = 48\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кх, Кт, Км 6. Біосинтез</p>	<p>Культуральна рідина, температура, рН, аерація, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація кінцевого продукту</p>	<p>Датчик температури, рН, аерації, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль, флуориметричний метод</p>	<p>Під час вирощування культури в ферментері і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4-6 год</p>	<p>$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 600\text{ об/хв}$, аерація – 1 л/л/хв, $\text{pH} = 6,8$, $\tau = 144\text{ год}$, відсутність сторонньої мікробіоти, $C = 13,7\text{ г/л}$</p>

7.2. Мікробіологічний контроль

Здійснення мікробіологічного контролю відбувається розсівом культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованими середовищами та мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій. Сусло-агар (СА) або глюкозо-картопляний агар (ГКА) використовують для виявлення дріжджів та грибів [35].

Мікроскопіювання здійснюють з використанням препаратів «роздавлена крапля». Препарат готують на предметному склі, яке попередньо знежирюють. Після нанесення на скло маленької краплі культуральної рідини, його накривають накривним скельцем і мікроскопіюють з об'єктивом 40x без імерсійної системи та 90x з імерсійною системою. Наявність інших клітин, які будуть відрізнятися за формою та розмірами, може свідчити про наявність сторонньої мікробіоти.

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація біомаси

Біомасу *Asbyii gossypii* визначають гравіметричним методом. 10 мл культуральної рідини центрифугують при 10000 g протягом 5 хв, супернатант зливають, клітини та міцелії промивають двічі стерильною питною водою. Далі біомасу висушують при 100 °C до постійної маси [36].

7.3.2. Концентрація цільового продукту

Визначення концентрації цільового продукту – рибофлавіну

Для визначення концентрації рибофлавіну 0,8 мл культуральної рідини змішують з 0,2 мл 1н NaOH. 0,4 мл аліквоти суміші змішують з 1 мл 0,1М калійфосфатного буферу (рН 6,0), далі визначають оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 444 нм. Концентрацію рибофлавіну вираховують за допомогою коефіцієнта екстинції $1,04 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (127 мг рибофлавіну/л/ $\text{OD}_{444 \text{ нм}}$) [37].

7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю у середовищі культивування виступає рапсова олія, тому для визначення вмісту джерела вуглецю необхідно дізнатися концентрацію жирних кислот у культуральній рідині.

Культуральну рідину центрифугують (при 8 тис об/хв) 20 хв при температурі 4 °С. Супернатант переносять у нову колбу. 50 мл супернатану змішували з *n*-гексаном 1:1 (об'ємна частка), далі енергійно струшують протягом 5 хв і здійснюють фазове розділення. Фазове розділення проводять в кілька етапів: суміш *n*-гексану та супернатану центрифугують (15 тис об/хв, 4°С, 30 хв) і потім залишають відстоюватися при 4 ° С протягом 48–72 год для зменшення перевантаженості емульсійного шару та полегшення поділу фаз. Протягом цього періоду часу органічний шар збирають і суміш багаторазово центрифугують (15 тис об/хв, 4°С, 30 хв) і зберігають при 4°С. Останній етап повторювали, поки не було видалено більшу частину органічної фази. Потім органічну фазу переносять в нову пробірку і випарювали (при 80 °С) до постійної маси для визначення залишкової концентрації олії. [38]

Визначення концентрації джерела азоту

В якості джерела азоту в середовищі виступають кукурудзяний екстракт та соєвий жмих.

Для визначення азоту амінокислот (в кукурудзяному екстракті, соєвому жмиху) використовуємо метод формольного титрування (або титрування по Серенсену). Метод базується на взаємодії аміногруп білків з формаліном. Під час реакції з формаліном аміногрупа втрачає свої основні властивості, а утворювана метиламінокислота відтитровується 0,1 нормальним розчином лугу NaOH. За кількістю витраченого на титрування лугу визначають кількість COOH-груп. Зазвичай число карбоксильних груп в амінокислотах приймають рівним числу аміногруп (що цілком справедливо для

моноамінокислот, для діамінокислот вводяться відповідні поправки в методику титрування).

Методика визначення. До 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 9 мл води (рН розчину має становити 7,0). При необхідності розчин нейтралізують шляхом додавання 0,1 М розчину NaOH або 0,1 М розчину HCl. Після закінчення нейтралізації додають 2 мл розчину формальдегіду, перемішують і титрують 0,1 М розчином NaOH до значення рН 9,1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв., або до появи слабо рожевого забарвлення (індикатор – 1% розчин фенолфталеїну). Паралельно проводять контрольний дослід (титрують дистильовану воду). 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 1,4 мг амінного азоту [39].

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Витамины и коферменты: учеб. пособ. Ч. 2 / В.А. Смирнов, Ю.Н. Климочкин. – Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2008. – 91 с.: ил.
2. Поліщук В. Ю. Рибофлавін – виробництво і застосування / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. – 2009. – Вип. 134, ч. 3. – С. 274–290.
3. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://suprun.doctor/zdorovya/chim-shkidлива-migren-ta-yak-yiyi-likuvati.html?=-page866>
4. Thompson DF, Saluja HS. Prophylaxis of migraine headaches with riboflavin: A systematic review. *J Clin Pharm Ther.* 2017;42(4):394-403. doi:10.1111/jcpt.12548
5. Поліщук В. Ю. Динаміка росту та накопичення рибофлавіну аскоміцетом *Eremothecium ashbyi* Guillier. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2014. – №3. – С. 73–77
6. Kato T., Park E.Y. Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *Biotechnol Lett.* 2012 Apr;34(4):611-8. doi: 10.1007/s10529-011-0833-z.
7. Park E.Y., Ito Y., Nariyama M., Sugimoto T., Lies D., Kato T. The improvement of riboflavin production in *Ashbya gossypii* via disparity mutagenesis and DNA microarray analysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Sep;91(5):1315-26. doi: 10.1007/s00253-011-3325-0.
8. Schwechheimer S.K., Park E.Y., Revuelta J.L., Becker J., Wittmann C. Biotechnology of riboflavin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Mar;100(5):2107-19. doi: 10.1007/s00253-015-7256-z
9. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Riboflavin#section=Solubility>
10. Revuelta J.L., Ledesma-Amaro R., Lozano-Martinez P., Díaz-Fernández D., Buey R.M., Jiménez A. Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. *J*

- Ind Microbiol Biotechnol. 2017 May;44(4-5):659-665. doi: 10.1007/s10295-016-1842-7.
11. *Tatiana Q. Aguiar, Rui Silva, and Lucília Domingues.* New biotechnological applications for *Ashbya gossypii*: Challenges and perspectives 2017; 8(4): 309–315.
 12. *Kato T, Azegami J, Yokomori A, Dohra H, El Enshasy HA, Park EY* Genomic Analysis of a Riboflavin-Overproducing *Ashbya Gossypii* Mutant Isolated by Disparity Mutagenesis 2020 Apr 23;21(1):319
 13. *Park E.Y., Zhang J.H., Tajima S., Dwiarti L.* Isolation of *Ashbya gossypii* mutant for an improved riboflavin production targeting for biorefinery technology. J Appl Microbiol. 2007 Aug;103(2):468-76.
 14. *Sugimoto T., Morimoto A., Nariyama M., Kato T., Park E.Y.* Isolation of an oxalate-resistant *Ashbya gossypii* strain and its improved riboflavin production. J Ind Microbiol Biotechnol. 2010 Jan;37(1):57-64. doi: 10.1007/s10295-009-0647-3.
 15. *Shuang L., Wenya H., Zhiwen W., Tao C.* Production of Riboflavin and Related Cofactors by Biotechnological Processes. 2020 Feb 13;19(1):31
 16. Поліщук В. Ю. Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guil : дис. канд. техн. наук : 03.00.20 / Поліщук Валентина Юріївна – Київ, 2018. – 177 с.
 17. Патент. RU 2 651 502 C2. Штамм гриба *Eremothecium gossypii* – продуцент ефірного масла / Семенова Е.Ф., Преснякова Е.В., Пресняков С.В. – Опубл. 19.04.2018
 18. *Aguiar T.Q., Silva R., Domingues L.* *Ashbya gossypii* beyond industrial riboflavin production: A historical perspective and emerging biotechnological applications // Biotechnol. Adv. – 2015. – Vol. 33, N 8. – P. 1774-1786
 19. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=ago
 20. Свистун В.Ю., Чередніченко Т.В., Дригант Л.П., Парнікоза Т.П., Серeda В.Г., Ханенко Н.В. Мігрень: особливості принципів лікування // СХІДНО-

ЄВРОПЕЙСЬКИЙ НЕВРОЛОГІЧНИЙ ЖУРНАЛ. – 2016. – №2 (08). – С. 4-8. – УДК: 616.831-005.1-036.86-06:616.89-008.

21. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.rbc.ua/static/longread/silent_epidemic_ukr/index.html
22. Thompson DF, Saluja HS. Prophylaxis of migraine headaches with riboflavin: A systematic review. J Clin Pharm Ther. 2017;42(4):394-403. doi:10.1111/jcpt.12548
23. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://database.ukrcensus.gov.ua/MULT/Dialog/view.asp?ma=3&ti=%D0%EE%E7%EF%EE%E4%B3%EB+%EF%EE%F1%F2%B3%E9%ED%EE%E3%EE+%ED%E0%F1%E5%EB%E5%ED%ED%FF+%E7%E0+%F1%F2%E0%F2%F2%FE%2C+%EE%F1%ED%EE%E2%ED%E8%EC%E8+%E2%B3%EA%EE%E2%E8%EC%E8+%E3%F0%F3%EF%E0%EC%E8%2C+%F1%EF%B3%E2%E2%B3%E4%ED%EE%F8%E5%ED%ED%FF+%F7%EE%EB%EE%E2%B3%EA%B3%E2+%B3+%E6%B3%ED%EE%EA+%F2%E0+%F1%E5%F0%E5%E4%ED%B3%E9+%E2%B3%EA+%ED%E0%F1%E5%EB%E5%ED%ED%FF+%E2+%D3%EA%F0%E0%BF%ED%B3&path=../Quicktables/KEY_IND/1/&lang=1&multilang=uk
24. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.kiev.ukrstat.gov.ua/p.php3?c=1123&lang=1>
25. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://top10supps.com/best-riboflavin-supplements/>
26. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування. Львів: «Інтелект-Захід», 2008. – 736 с.
27. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.gea.com/ru/products/distillation-fermentation/fermenters/pharma-fermenters.jsp>

28. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001 №502.
29. Міністерство охорони здоров'я [Електронний ресурс] // Методичні вказівки. – Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20011214_502.html
30. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://farmakos.ua/bimoj.html>
31. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://prom.ua/Soda-kausticheskaya.html>
32. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://farmakos.ua/price.html>
33. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.attis.com.ua/site/liquid/gembar.html>
34. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.neosepticaspb.com/catalog/dezinfekcziya-instrumentov/deconex-50-ff>
35. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с
36. Jeong BY, Wittmann C, Kato T, Park EY. Comparative metabolic flux analysis of an *Ashbya gossypii* wild type strain and a high riboflavin-producing mutant strain. *J Biosci Bioeng.* 2015 Jan;119(1):101-6. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.014
37. Park, E.Y., Kato, A. & Ming, H. Utilization of waste activated bleaching earth containing palm oil in riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *J Amer Oil Chem Soc* 81, 57–62 (2004). <https://doi.org/10.1007/s11746-004-0857-z>
38. Partovi M, Lotfabad TB, Roostaazad R, Bahmaei M, Tayyebi S. Management of soybean oil refinery wastes through recycling them for producing biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* MR01. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;29(6):1039-1047. doi:10.1007/s11274-013-1267-7

39. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації «Фармацевтична хімія. Аналіз препаратів біотехнологічного виробництва» / За загальною редакцією професора В.А. Георгіянц. – Харків: 2013. – 215 с