

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)

(підпис)

« 06 » червня 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

(підпис)

« 06 » червня 2025 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

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

на тему: Культивування *Gluconobacter oxydans* для одержання аскорбінової кислоти

Виконав: здобувачка IV курсу, групи 2

ЛИТВИН Анастасія Вікторівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник УДИМОВИЧ Віктор Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Юліана ЗАБРОДСЬКА

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач

(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична,

промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 28 ” березня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧКИ

ЛИТВИН Анастасії Вікторівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Glucanobacter oxydans* для одержання аскорбінової кислоти

керівник роботи УДИМОВИЧ Віктор Миколайович, ст. викладач, PhD

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 23.05 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Glucanobacter oxydans*, цільовий продукт: аскорбінова кислота, об'єм ферментера 630 л, коефіцієнт заповнення 0,7

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

РОЗДІЛ 1. Характеристика аскорбінової кислоти. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування ви-

бору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне об-

ґрунтування аскорбінової кислоти. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва. РОЗДІЛ 6.

Специфікація обладнання виробництва продукту. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної

схеми виробництва продукту. РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення

аскорбінової кислоти. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва аскорбінової кислоти – 1 аркуш формату А1.

Апаратурна схема виробництв аскорбінової кислоти – 1 аркуш формату

А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика аскорбінової кислоти	01.03.25 – 06.03.25	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	07.03.25 – 14.03.25	
3	Техніко-економічне обґрунтування аскорбінової кислоти	15.03.25 – 22.03.25	
4	Біосинтез цільового продукту	23.03.25 – 29.03.25	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	01.04.25 – 13.04.25	
6	Специфікація обладнання виробни продукту	14.04.25 – 19.04.25	
7	Опис технологічної схеми біосинтезу продукту	20.04.25 – 28.04.25	
8	Основні етапи виділення та очищення аскорбінової кислоти	29.04.25 – 12.05.25	
9	Контроль виробництва продукту	13.05.25 – 17.05.25	
10	Графічна частина (креслення)	18.05.25 – 24.05.25	
11	Оформлення кваліфікаційної роботи	25.05.25- 28.05.25	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Анастасія ЛИТВИН
(ім'я та прізвище)

Віктор УДИМОВИЧ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу L-сорбози, як попередника аскорбінової кислоти, за культивування бактерій *Gluconobacter oxydans*, які синтезують речовину у концентрації 144,5 г/л за 16 год культивування, а також описі санітарної підготовки виробництва і технології очищення / виділення L-сорбози та аскорбінової кислоти.

Розрахована потужність виробництва становить 3877,2 кг (34880,3 л культуральної рідини) аскорбінової кислоти за рік. Технологічна схема біосинтезу сорбози включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка розчину підживлення сорбітолу, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 630 л з коефіцієнтом заповнення 0,7). Технологія отримання L-сорбози передбачає використання культивування глибинним періодичним способом.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (64 найменувань), технологічної (формат А1) та апаратурної (формат А1) схем. Загальний обсяг роботи – 87 сторінок, 16 таблиць, 12 рисунків.

Ключові слова: аскорбінова кислота, L-сорбоза, *Gluconobacter oxydans*, біосинтез, технологічна схема, апаратурна схема.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological scheme and manufacturing flow chart for L-sorbose biosynthesis by *Gluconobacter oxydans* at a concentration of 144.5 g/l, a description of the sanitary preparation of production and the technology of purification / isolation of L-sorbose and ascorbic acid, as well as.

The estimated capacity of biotechnological manufacture is 3877,2 kg (34880,3 л solution) of ascorbic acid per year. The technological scheme of L-sorbose biosynthesis includes preparation of sterile aeration air, preparation of sorbitol feeding solution, preparation and sterilization of seed and fermentation media and technological process (three stages of growing seed material (for flask culture, in inoculators) and fermentation in a fermenter 630 l with a filling factor of 0.7.

The qualification work consists of an introduction, nine sections, references (64 items), technological scheme (A1format) and manufacturing flow chart (A1format). The total volume of the work is 87 pages, 16 tables, 12 figures.

Keywords: ascorbic acid, L-sorbose, *Gluconobacter oxydans*, biosynthesis, technological scheme, manufacturing flow chart.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ABSTRACT	5
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ.....	10
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	15
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму <i>G. oxydans</i> WSH-003– продуцента L-сорбози	18
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки	19
2.3.1 Морфолого-культуральні ознаки.....	19
2.3.2 Фізіолого-біохімічні ознаки	20
2.4. Таксономічний статус <i>G. oxydans</i>	20
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	21
АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ	21
3.1. Потреба у виробництві аскорбінової кислоти.....	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	25
3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектованого виробництва аскорбінової кислоти та об'єму виробничого ферментера.....	29
3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 0,63 м ³	29
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	33
4.1 Шлях катаболізму сорбітолу у <i>Gluconobacter oxydans</i>	33
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	36
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	36
5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	36
5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	40
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів	40
5.3. 2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва L-сорбози.....	45
5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	50

5.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	50
5.4.2. Обґрунтування підготовки та стерилізації підживлювального розчину D-сорбіту у ферментері на 630 л.....	52
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	54
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	57
РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ	62
АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ	62
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	66
9.1. Мікробіологічний контроль	66
9.2. Визначення концентрації L-сорбози	68
9.2.1. Концентрація біомаси	69
9.2.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту	69
9.3. Карта постадійного контролю	71
ЛІТЕРАТУРА.....	74
ДОДАТКИ.....	81

ВСТУП

Вітамін С або L-аскорбінова кислота є одним із розчинних вітамінів у водних системах з високою антиоксидантною активністю, що робить його незамінним для фармацевтичних, косметичних та харчових цілей [1, 2]. Крім того, цей вітамін можна використовувати як добавку для подовження терміну придатності харчових продуктів. Ця незамінна поживна речовина має різні фізіологічні властивості, відіграючи ключову роль у більшості біосинтетичних шляхів людини. На відміну від деяких рослин і тварин, людина не може синтезувати вітамін С через відсутність L-глюконолактонооксидази. Тому вітамін необхідно використовувати в раціоні людини через продукти харчування або добавки [1, 4, 5].

Промислове виробництво вітаміну С шляхом ферментації включає два основні етапи. На першому етапі D-сорбіт перетворюється на L-сорбозу (попередник аскорбінової кислоти) під час культивування *Gluconobacter oxydans* [1]. *G. oxydans* — це аеробна грамнегативна бактерія з групи оцтовокислих бактерій, яка може використовувати висококонцентровані розчини під час окислення спиртів і цукрів [1]. На другому етапі L-сорбоза біоперетворюється на 2-кето-L-гулонову кислоту за допомогою інших мікроорганізмів, зокрема *Bacillus megaterium* та *Ktogulonigenium vulgare* [1, 5, 6, 7, 8].

G. oxydans відіграє важливу роль у перетворенні D-сорбітолу на L-сорбозу, яка є важливим проміжним продуктом для промислового виробництва вітаміну С. Проте низька толерантність до високих концентрацій D-сорбітолу дає поштовх до пошуку інших штамів або модифікацій вже відкритих *G. oxydans*, з метою збільшення виходу L-сорбози шляхом підвищення споживання високих концентрацій субстрату і як наслідок інтенсифікації ефективності біосинтезу, що дає можливість збільшити економічність промислового процесу ферментації. Зокрема використання штаму *G. oxydans* WSH-003 дає змогу синтезувати L-сорбозу у концентрації 144,5 г/л [1].

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Литвин А.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Удимович В.М.				8	87
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
ВСТУП							

Використовуючи дослідження [1] у нашій роботі запропоновано проєкт біотехнологічного виробництва L-сорбози, як попередника біосинтезу вітаміну С аскорбінової кислоти, із представленням технологічної та апаратурної схем, описом стадій санітано-гігієнічної підготовки процесу, а також технології очистки і виділення L-сорбози та аскорбінової кислоти.

Отже, **новизною кваліфікаційної роботи** є представлення технології промислового біосинтезу L-сорбози, як попередника вітаміну С штамом *G. oxydans* WSH-003 для забезпечення потреби вітчизняного ринку у L-сорбози для задоволення потреб фармацевтичної промисловості у виробництві аскорбінової кислоти.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ

Аскорбінова кислота – найбільш уживана назва вітаміну С. Назва за IUPAC – 2-оксо-L-тео-гексоно-4-лактон-2,3-енедіол. Емпірична хімічна формула: $C_6H_8O_6$. Молекулярна маса – 176,13 г/л. Температура плавлення – 190-192°C, кипіння - 553°C. рН – 2-3, густина – 1,694 г/мл. Добре розчиняється у воді, гірше у етанолі. Нерозчинна в хлороформі, бензені та етерах [4, 5, 6].

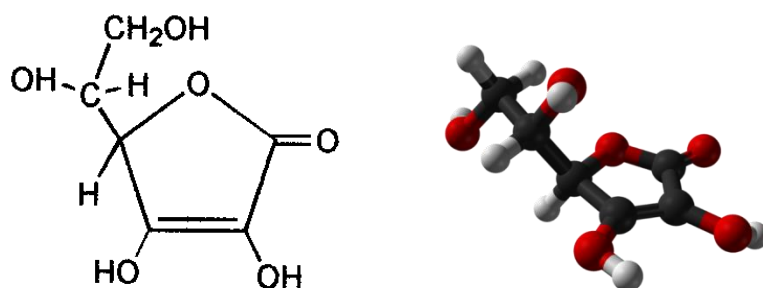


Рис. 1.1. Структурна формула аскорбінової кислоти [3,5]

Аскорбінова кислота має майже плоске п'ятикутне кільце, а два хіральні центри в позиціях 4 і 5 визначають 4 стереоізомери. Як зазначалося раніше, вітамін С за своєю будовою не є кислотою, а γ-лактоном 2-кетогулонової кислоти в дієпольній формі і не має карбоксильної групи. Проте речовині притаманні кислі властивості у результаті дисоціації одного з фенольних гідроксилів, через що її і продовжують називати кислотою. За зовнішнім виглядом представляє собою білий кристалічний порошок або ж безбарвні кристали, чий колір залежить від впливу вологи та повітря [4, 5].

Вперше вітамін С було виділено у 1918 році з лимона, а уже в 1930 – з капусти, солодкого перцю та надниркової залози бика. Розшифрувати будову аскорбінової кислоти та остаточно підтвердити її за допомогою хімічного синтезу вдалося у 1933. До природних джерел вітаміну С відноситься в основному рослинна сировина, наприклад ківі, бузина, малина, грейпфрут, цибуля і, звичайно ж, апельсин та лимон. Також джерелом вітаміну С може слугувати печінка [4, 5, 7].

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Литвин А.В.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКЕРИСТИКА АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Удимович В.М.					10	87
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						



Рис. 1.2. Зовнішній вигляд аскорбінової кислоти [7]

Варто зазначити, що людина потребує великої кількості вітаміну С (70-100 мг на день) для підтримки гомеостазу. Авітаміноз за цією речовиною призводить до такої патології, як цинга – хвороба, яка є причиною неврастенії, злоякісних змін шкіри та слизових оболонок, розхитування та випадіння зубів. Вітамін С не синтезується у організмі людини, що зумовлює необхідність у екзогенному надходженні речовини з навколишнього середовища [7, 8, 9].

Головною властивістю, яка зумовлює використання вітаміну С, є його антиоксидантна дія. Живі організми розвинули в собі здатність до синтезу аскорбінової кислоти для боротьби з активними формами кисню (АФК), котрі відповідальні за ряд видів пошкоджень тканин, захворювань та процес старіння в цілому. Аскорбінова кислота виводить такі АФК, наприклад супероксидні та гідропероксильні радикали, синглетний кисень та озон, що знижує їх негативну дію на організм [9, 10].

Необхідно додати, що патогенні стани може викликати як гіпо-, так і гіпервітаміноз аскорбінової кислоти. Так, тривале вживання великих доз вітаміну С здатне викликати нудоту, розлади шлунку, діарею, підвищення кислотності у ротовій порожнині, у результаті чого руйнується зубна емаль, та навіть утворення каменів у нирках. Тому вживання аскорбінової кислоти повинно мати розумні межі [2, 3, 8].

Окрім своєї антиоксидантної дії, вітамін С також проявляє ряд важливих для організму властивостей. Так, аскорбінова кислота приймає участь у синтезі колагену (головний білок тваринної сполучної тканини) та карнітину (споріднена до вітамінів групи В речовина), а також таких нейромедіаторів, як

норепініфрин та серотонін. Крім того, дана сполука також приймає участь у детоксикації та виведенні токсичних сполук з організму, розкладанні і виведенні холестерину, імуномодуляції. Зважаючи на це, вітамін С є затребуваною для організму людини речовиною для загального покращення функціонування організму [5, 7, 10].

Аскорбінова кислота широко використовується у харчовій промисловості під індексом E300 завдяки своїм антиоксидантним властивостям. Так, аскорбінова кислота при додаванні до харчових продуктів не допускає їх окислення, прискорює утворення кольору та його збереження, нейтралізує нітрати і загалом збільшує період зберігання продуктів. В основному на 1 кг продукції використовують 1 г аскорбінової кислоти, що дозволяє збагатити їжу вітаміном С [7].



Рис. 1.3. Товарні форми аскорбінової кислоти [11, 12, 13]

Наразі на ринку України присутня безліч препаратів, що містять аскорбінову кислоту у своєму складі в якості діючої речовини, що в основному використовуються для профілактики гіповітамінозу вітаміном С. Детальнішу інформацію про наявні на ринку препарати на основі аскорбінової кислоти наведено в табл. 1.1.

**Препарати на основі аскорбінової кислоти,
представлені на ринку України**

Назва препарату	Призначення	Форма випуску	Виробник	Джерело
Аскорбінка-КВ	Профілактика і лікування дефіциту вітаміну С	Таблетки	АО «Київський вітамінний завод»	[11]
Аскорбінова кислота	Профілактика і лікування дефіциту вітаміну С	Драже	АО «Київський вітамінний завод»	[9]
Аскорбінова кислота	Гіповітаміноз С, цинга, інтоксикації та інфекції	Розчин для ін'єкцій	ПАТ «Лекхім-Харків»	[10]
Аскорбінова кислота	Профілактика і лікування дефіциту вітаміну С	Таблетки	ПАТ «Лекхім-Харків»	[12]
Аскорбінова кислота	Гіповітаміноз С, цинга, інтоксикації та інфекції	Розчин для ін'єкцій	ФК «Здоров'я»	[13]
Аскоцин	Лікування захворювань, зумовлених дефіцитом вітаміну С	Таблетки	«Гледфарм» («Кусум»)	[14]
Вітамін С	Лікування недостатності аскорбінової кислоти	Таблетки	«ІнтреХім»	[15]

Не зважаючи на те, що вітамін С міститься у великій кількості природних рослинних джерелах, зокрема у цитрусових, виділення їх з такого матеріалу є неоптимальним зважаючи на високу потребу у сировині, місці для вирощування рослин та багатьох інших факторах. Промислове отримання аскорбінової кислоти передбачає використання змішаного хімічно-ферментативного синтезу. Так, процес включає в себе кілька стадій хімічного синтезу та одну стадію мікробіологічного синтезу. Спочатку глюкоза відновлюється до D-сорбіту за допомогою нікелю як каталізатора, після чого відбувається її окислення до L-сорбози за використання мікроорганізмів. Після серії реакцій для захисту гідроксильних груп від окислення L-сорбоза окислюється до 2-кето-L-гулонової кислоти (2-

КЛГ). Енолізація та лактонізація 2-КЛГ призводить до утворення L-аскорбінової кислоти [5, 18, 19].

Найпоширеніші мікроорганізми, що використовуються для перетворення D-сорбіту в L-сорбозу – це *Gluconobacter suboxydans* та *Acetobacter suboxydans* (стара назва). Однак відомо про можливість спільного культивування із подальшим мікробіологічним синтезом 2-КЛГ, концентрацію якого ми надалі і візьмемо для порівняння. Так, одні бактерії (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Erwinia*) можуть перетворювати глюкозу на 2,5-дикето-D-глюконову кислоту (2,5-ДКГ), а інші – (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*), які синтезують фермент 2,5-ДКГ-редуктазу, — здатні перетворювати 2,5-ДКГ на 2-КЛГ. Такий підхід може спростити процес виробництва попередника аскорбінової кислоти [19].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Аскорбінова кислота є первинним метаболітом певних мікроорганізмів, зокрема бактерій. Серед продуцентів аскорбінової кислоти можуть бути бактерії роду *Acetobacter* та *Gluconobacter*. Ці мікроорганізми поділяються на дві групи: *Peroxydans* - у цих бактерій аскорбінова кислота накопичується як проміжний продукт, представником є *Gluconobacter oxydans*. Процес синтезу вітаміну С включає одну стадію ферментації та п'ять стадій хімічного синтезу. Спочатку глюкоза відновлюється до D-сорбіту за допомогою нікелю як каталізатора, після чого відбувається її окислення до L-сорбози за використання мікроорганізмів. Після серії реакцій для захисту гідроксильних груп від окислення L-сорбоза окислюється до 2-кето-L-гулонової кислоти (2-КЛГ). Енолізація та лактонізація 2-КЛГ призводить до утворення L-аскорбінової кислоти [1, 21, 22].

Найпоширенішим промисловим методом біологічного отримання попередника аскорбінової кислоти – L-сорбози є біотрансформація D-сорбітолу в L-сорбозу з використанням видів *Gluconobacter* або *Acetobacter*. Під час реакції D-сорбіт окислюється до L-сорбози, що включає відновлення $NADP^+$ до $NADPH$. Дослідження біоконверсії D-сорбітолу в L-сорбозу за допомогою диких та генетично модифікованих штамів *G. oxydans* є дуже важливим, оскільки дає змогу підвищити рівень синтезу фінішного продукту – аскорбінової кислоти. Як показують результати досліджень, на конверсію впливає багато факторів, включаючи тип та концентрацію середовища для росту, температуру, рН, концентрацію розчиненого кисню, співвідношення інокулят/субстрат та тип ферментера [1, 21, 22].

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУ- ВАННЯ ВИБОРУ ТА ХА- РАКТЕРИСТИКА БІО- ЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Литвин А. В.					15	87
Перевір.		Удимович В.М.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Загальну характеристику біосинтезу L-сорбози із використанням різних штамів *Gluconobacter oxydans*, наведено в табл. 2.1. Найбільшу кількість L-сорбози (144,5 г/л) протягом 16 год культивування показав штам *Gluconobacter oxydans* WSH-003 [1]. За 24 год культивування штам *G. oxydans* КСТС 1091 продукує 120,9 г/л L-сорбози [22]. На наступному етапі вибору необхідно розрахувати вартості поживних середовищ для культивування обраних продуцентів L-сорбози (попередник аскорбінової кислоти) (табл. 2.2). Вартість поживних середовищ є ідентичною у 33,75 грн для культивування *G. oxydans* WSH-003 та *G. oxydans* КСТС 1091.

Заключний етап вибору найефективнішого біологічного агенту є підрахунок умовної вартості 1 г L-сорбози (табл. 2.3). Виходячи із отриманих результатів у табл. 2.3, найменшу кількість L-сорбози за 1 год продукує *G. oxydans* КСТС 1091 – 5,03 г/год, а найбільшу (9,03 г/год) *G. oxydans* WSH-003. Умовна вартість цільового продукту у *G. oxydans* WSH-003 є найнижчою – 0,23 грн/г, а у *G. oxydans* КСТС 1091 умовна вартість складає 0,28 грн/г.

Отже, враховуючи вище зазначену інформацію, найбільш оптимальним продуцентом є *G. oxydans* WSH-003 і цей штам обираємо для промислового культивування.

Особливості одержання L-сорбози

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація L-сорбози, г/л	Умови культивування біологічного агента	Література
<i>G. oxydans</i> WSH-003	D-сорбітол - 150 дріжджовий екстракт - 10	144,5	16 год, 30 °C, 200 об/хв,	Hu, Y., Wan, H., Li, J., & Zhou, J. Enhanced production of l-sorbose in an industrial <i>Gluconobacter oxydans</i> strain by identification of a strong promoter based on proteomics analysis. <i>Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology</i> , 2015, 42(7), 1039–1047. doi:10.1007/s10295-015-1624-7
<i>G. oxydans</i> KCTC 1091	D-сорбітол – 150 дріжджовий екстракт - 10	120,9	24 год, 30 °C, 200 об/хв,	Kim T.-S., Gao H. , Li J., Kalia V. C., Muthusamy K., Sohng J. K., Kim I.-W., Lee J.-K. Overcoming NADPH product inhibition improves D-sorbitol conversion to L-sorbose. <i>Sci Rep.</i> 2019 28;9(1):815. doi: 10.1038/s41598-018-37401-0.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів

L-сорбози

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>G. oxydans</i> WSH-003	D-сорбітол	150,0	105,0	15,75	<u>1</u>
	дріжджовий екстракт	10,0	1800,0	18,0	<u>1</u>
	Вартість 1 л середовища – 33,75 грн				
<i>G. oxydans</i> KCTC 1091	D-сорбітол	150,0	105,0	15,75	<u>1</u>
	дріжджовий екстракт	10,0	1800,0	18,0	<u>1</u>
	Вартість 1 л середовища – 33,75 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на травень 2025 р.

1 – <https://prom.ua/ua>.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г L-сорбози, синтезованої на різних поживних середовищах

Біологічний агент	Концентрація L-сорбози, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної L-сорбози за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>G. oxydans</i> WSH-003	144,5	16	9,03	33,75	0,23
<i>G. oxydans</i> KCTC 1091	120,9	24	5,03	33,75	0,28

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму *G. oxydans* WSH-003– продуцента L-сорбози

Тривалість культивування 16 год, концентрація L-сорбози в культуральній рідині становить 144,5 г/л [1].

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу L-сорбози. Як джерело вуглецю для одержання L-сорбози використовуються сорбітол. Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 144,5 г L-сорбози. Молекулярна маса L-сорбози становить 180,0. Отже,

у 180,0 г L-сорбози ($C_6H_{12}O_6$) міститься 72 г Карбону, а в 144,5 г L-сорбози ($144,5 \times 72,0 / 180,0 = 57,8$ г Карбону).

Далі розраховуємо, у скількох грамах сорбітолу міститься 57,8 г Карбону. Молекулярна маса сорбітолу ($C_6H_{14}O_6$) – 182. У 182 г сорбітолу міститься 72 г Карбону, а 57,8 г Карбону міститься у $(57,8 \times 182) / 72 = 146,1$ г сорбітолу.

Потреби для синтезу біомаси.

Кількість сорбітолу необхідної для синтезу біомаси = $150,00 - 146,1 = 3,9$ г.

У такій кількості сорбітолу міститься $3,9 \cdot 72 / 182 = 1,54$ г Карбону У біомасі міститься 50 % Вуглецю, тому 1,54 г такого елемента міститься у $1,54 \cdot 2 = 3,08$ г біомаси.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 3,08 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 0,3 г.

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

Для одержання L-сорбози (попередник аскорбінової кислоти) в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело органічного Нітрогену дріжджовий екстракт. Оскільки у 100 г білка міститься 16 г азоту, тоді 0,3 г Нітрогену у $(100 \cdot 0,3) / 16 = 1,875$ г білку. В перерахунку на дріжджовий екстракт отримуємо 4,36 г/л.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

2.3.1 Морфолого-культуральні ознаки

Клітини *G. oxydans* зазвичай мають еліпсоїдну або паличкоподібну форму, розміром 0,5-0,8 мкм завширшки та 0,9-4,2 мкм завдовжки, що розташовані поодиночки або парами, а іноді короткими ланцюжками. Вони нерухомі, не мають джгутиків. Колонії *G. oxydans* круглі, опуклі та гладкі з цілісним краєм діаметром

близько 3 мм, білого або злегка від жовтуватого до коричневого кольору залежно від віку культури. Оптимальний ріст при рН 5,4 – 5,8 [23].

2.3.2 Фізіолого-біохімічні ознаки

G. oxydans є оцтовокислим, хемоорганотрофним та облігатним аеробним організмом, що має суто респіраторний тип метаболізму з киснем як кінцевим акцептором електронів. Вони окислюють гліцерин, ксилозу, глюкозу, галактозу, манозу, фруктозу, сорбозу, сорбіт, маніт та сахарозу. Вони також окислюють етанол до оцтової кислоти. Однак вони не окислюють оцтову кислоту, бурштинову кислоту, d-l-аланін, l-глутамінову кислоту або l-серин. Виробляють пігмент, γ -піронові сполуки, а також 2- та дикетоглюконат з глюкози або глюконату. Використовуються для промислового для виробництва L-сорбози з D-сорбітолу; D-глюконічної кислоти, 5-кето- і 2кетоглуконова кислоти з D-глюкози. Метаболізм глюкози відбувається через окислювальний пентозофосфатний шлях та певною мірою через шлях ЕнтнераДудорова (КДФГ-шлях) [23].

2.4. Таксономічний статус *G. oxydans*

Сучасна (філогенетична) класифікація для *G. oxydans* наведена представлена нижче [23]:

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Gracilicutes*

Клас – *Alphaproteobacteria*

Родина – *Acetobacteraceae*

Рід – *Gluconobacter*

Вид – *oxydans*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ

3.1. Потреба у виробництві аскорбінової кислоти

Аскорбінова кислота (вітамін С) являє собою низькомолекулярний вуглевод, має ендіолову структуру. Ендіол — це алкененол з гідроксильною групою, який приєднаний до обох атомів вуглецю вуглецевого подвійного зв'язку. Ця хімічна властивість обумовлює важливу роль вітаміну С у природі як донора електронів [24].

Слід відмітити, що відомою біологічною функцією вітаміну С є його роль в якості відновника, тобто аскорбінова кислота віддає субстрату електрон, при цьому окиснюючись до вільного аскорбілового радикала, який є відносно стабільним.

Дві молекули вільного радикала аскорбілу можуть перетворюватись на 1 молекулу аскорбату та 1 молекулу дегідроаскорбінової кислоти, що відповідає повністю відновленій та окисненій формам вітаміну С відповідно.

Біологічна функція та особливість аскорбінової кислоти пов'язана з її відновленою формою аскорбатом, при цьому проявляється можливість розділення на ферментативну та неферментативну функцію аскорбінової кислоти. Найвідомішою ферментативною особливістю вітаміну С є його дія як кофактора для двовалентного заліза і 2-оксоглутарат-залежних діоксигеназ в синтезі колагену. Такі ферменти каталізують гідроксилювання залишків лізину та проліну в розгорнутих проколагенових ланцюгах, що беруть участь у формуванні потрійної спіральної структури зрілого функціонального колагену. Аскорбат також служить донором електронів для різноманітних ферментів, що каталізують біосинтез карнітину та норадреналіну, амідкування пептидного гормону та метаболізм тирозину.

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУН- ТУВАННЯ АСКОРБІНО- ВОЇ КИСЛОТИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		<i>Литвин А.В.</i>					21	87
Перевір.		<i>Удимович В.М.</i>						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>				Кафедра БТМ		

Опосередковане аскорбатом гідроксилування фактора 1α , індукованого гіпоксією (HIF- 1α), впливає на транскрипцію певних генів,

що кодують білки, беручи участь у гомеостазі заліза, ангіогенезі та проліферації клітин [24].

Нещодавно наукові дослідження показали, що вітамін С має велике значення у функціонуванні судин. Аскорбат є потужним антиоксидантом, ця сполука сприяє зменшенню або звільненню від багатьох патофізіологічно вільних радикалів та активних форм кисню. Крім того, вітамін С може регенерувати вітамін Е з його окисленої форми (α -токофероксильний радикал), дозволяючи аскорбіновій кислоті опосередковано пригнічувати перекисне окислення ліпідів. Аскорбат також сприяє зменшенню кількості радикалів уратів і глутатіону як частини антиоксидантної мережі в клітинах і позаклітинних рідинах. Хоча клінічну важливість антиоксидантної активності аскорбату важко оцінити, значна маса експериментальної літератури свідчить, що вітамін С ефективно захищає біологічні макромолекули від окисного пошкодження, що в іншому випадку могло б впливати на виникнення та прогресування як хронічних, так і гострих захворювань [24].

Хоча аскорбінова кислота має сильні антиоксидантні властивості, вона також може мати прооксидантну дію в присутності вільних перехідних металів [25].

Аскорбінова кислота накопичується у фагоцитуючих клітинах, таких як нейтрофіли, при цьому може посилювати хемотаксис, фагоцитоз, утворення активних форм кисню та, як наслідок, інгібування патогенних мікроорганізмів. Аскорбінова кислота також необхідна для апоптозу та звільнення відпрацьованих нейтрофілів від місць інфікування макрофагами, що супроводжується зменшенням некрозу та пошкоджень тканин. Роль вітаміну С в лімфоцитах менш досліджена, однак припускають, що вітамін С посилює диференціювання та проліферацію В- і Т-клітин завдяки його ефектам генної регуляції. Дефіцит вітаміну С призводить до ослаблення імунітету та підвищеного ризику сприйнятливості до інфекційних захворювань [26].

У свою чергу, ураження організму патогенною мікрофлорою значно впливає на рівень вітаміну С через виникнення посиленого запалення та метаболічні потреби. Крім того, додаткове споживання вітаміну С сприяє як запобіганню, так і лікуванню респіраторних та системних інфекцій. Профілактика інфекцій вимагає дієтичного споживання вітаміну С, яке забезпечує його достатній рівень у плазмі, що відповідає 100-200 мг/день, при цьому оптимізуючи функціонування клітин і тканин [26].

Аскорбінова кислота сприяє ранній диференціації гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) у НК-клітини і налаштовує диференціацію плазматичних клітин. Це вказує на те, що аскорбінова кислота відіграє важливу роль у регулюванні клітин як вродженого, так і адаптованого імунітету, відкриваючи нові напрямки досліджень [27].

Внаслідок водорозчинних властивостей і безпечності цього вітаміну аскорбінова кислота може використовуватися як допоміжний засіб при багатьох захворюваннях імунної системи [27].

L-сорбоза за своєю характеристикою має необхідну L-конфігурацію, яка потрібна для формування L-аскорбінової кислоти. Найпрактичніше значення має отримання L-сорбози з D-сорбіту за допомогою біотрансформації за допомогою *Gluconobacter oxydans*. При отриманні L-сорбози може відбуватися обробка ацетон і окислення до аскорбінової кислоти (рис 3.1) [11].

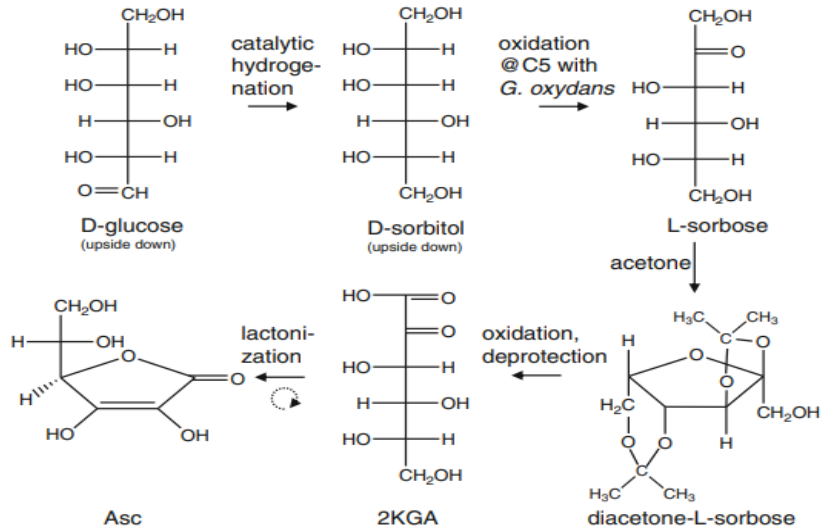


Рис.3.1. Схема трансформації мікробноотриманої L-сорбози до аскорбінової кислоти хімічним шляхом

Gluconobacter oxydans трансформує в L-сорбозу (попередник аскорбінової кислоти) з D-сорбіту субстрату за допомогою сорбітолдегідрогенази (СДГ / Sldh) відповідно до відповідності з правила Бертрана-Гудсона (рис.3.2) [32].

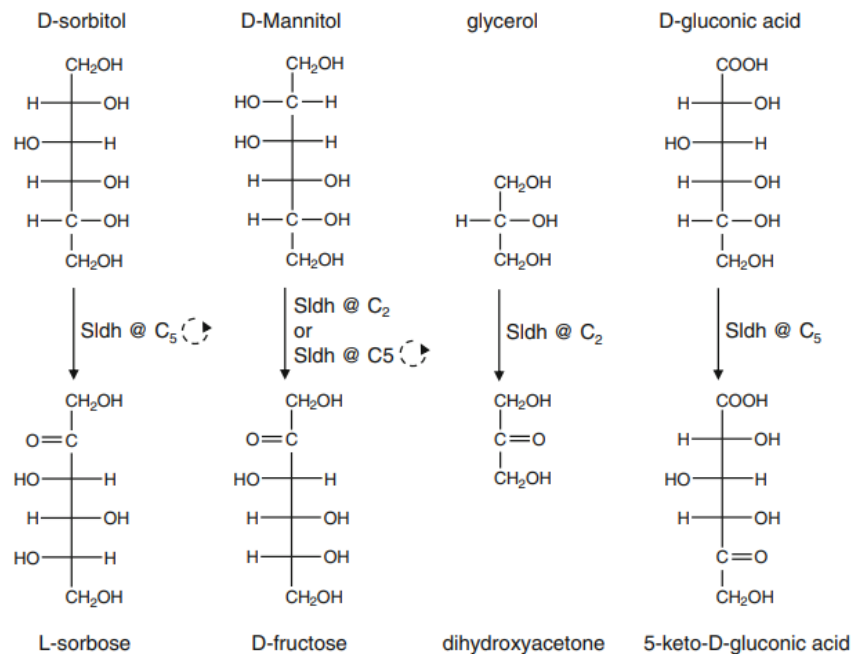


Рис.3.2. Схема трансформації трансформує D-сорбіту в L-сорбозу мікробним способом.

Не зважаючи на ряд досліджень, пов'язаних з дослідженням отримання 2-кето-L-гулонової кислоти або ж саме L-аскорбінової кислоти, було встановлено, що *Gluconobacter oxydans* здатний трансформувати дуже малу кількість з D-сорбіту саме у готову аскорбінову кислоту і, відповідно, є економічно не вигідним. А ось *Ketogulonicigenium vulgare* доволі ефективно (до 98,5%) трансформує L-сорбозу до аскорбінової кислоти. Саме тому в багатьох статтях можна зустріти інформацію про двостадійний процес біосинтезу аскорбінової кислоти де передбачено використання *Gluconobacter oxydans* та *Ketogulonicigenium vulgare* (рис.3.3) [32, 33].

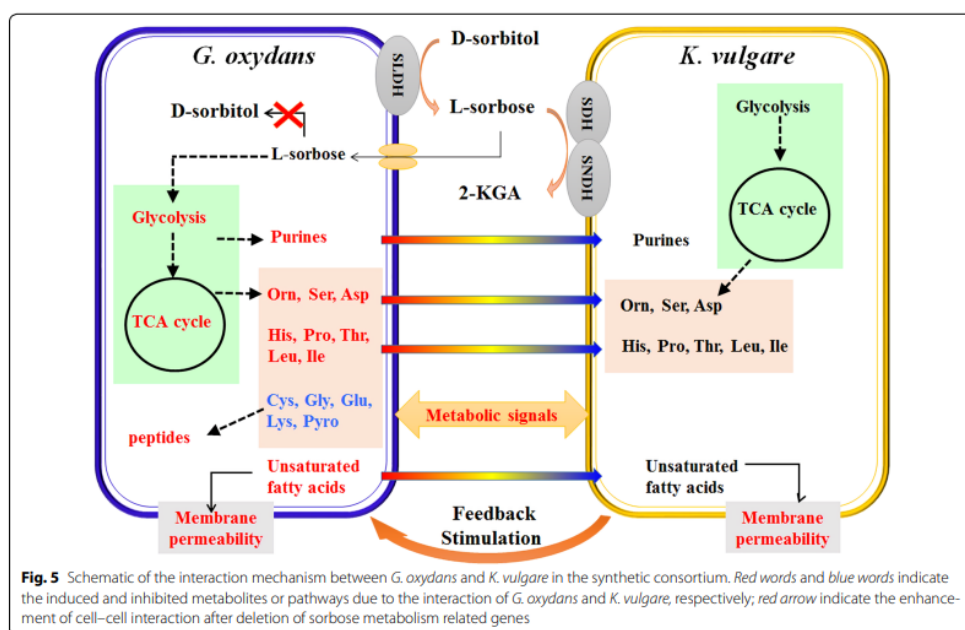


Рис.3.3. Схема біотрансформації L-сорбози за допомогою *Ketogulonicigenium vulgare*

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Раціон харчування має значний вплив на вміст вітаміну в організмі людини. Надмірне споживання вуглеводів з їжею значно збільшує потребу у вітаміні С. Проте водночас, дефіцит білків (рослинних і тваринних) погіршує його засвоєння [28].

Добова норма у вітаміні С залежить від віку:

- для дітей: 0-6 міс становить – 30 мг, 6 міс. – 1 рік – 35 мг, 1-3 роки – 40 мг, 4-6 років – 45 мг, 7-10 років – 45 мг, 11-14 років – 50 мг;

- для жінок та чоловіків віком від 15 до 50 років добова норма становить 50-120 мг. Важливо зазначити, що потреба у вітаміні С зростає при фізичних навантаженнях, інфекційних захворюваннях та під час вагітності [28]

Вітамін С доступний у різноманітних лікарських формах: пігулки, драже, жувальні пігулки, шипучі пігулки, порошок, ампулірований розчин для ін'єкцій, таблетки з глюкозою. Шипучі таблетки аскорбінової кислоти мають перевагу за рахунок мінімізації подразнюючої дії на шлунково-кишковий тракт та прискореної абсорбції. У дорослих для профілактичних заходів допустиме застосування практично будь-яких препаратів вітаміну С. З метою лікування рекомендовано використовувати «Вітамін С плюс», «Кальцій-С 1000 Сандоз», «Упсавіт вітамін С», «Асвітол», «Аддітіва вітамін С з лимонним смаком», «Таксофіт С», «Біовіталь вітамін С 500», «Вітрум плюс вітамін С», «Целаскон» та інші[28].

Гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) – найбільш поширена патологія людини з максимальним рівнем захворюваності в дитячому віці. Гострі респіраторні вірусні інфекції у дітей, особливо раннього віку, окрім більш високої частоти, нерідко мають важкий перебіг і в ряді випадків перебігають із серйозними ускладненнями. Щорічно у світі хворіють на грип близько 20 % дітей і 5 % дорослих.

В Україні щороку хворіють на грип та гострі респіраторні вірусні інфекції до 10–15 млн осіб (відповідно до раніше опублікованої статистичної інформації, від 23 % до 35 % від довоєнного населення приблизно 42 млн. осіб). Більше половини із них складають діти. Описано понад 200 видів вірусів, здатних викликати захворювання дихальних шляхів [29].

Найбільш часті збудники ГРВІ у дітей:

1. Вірус парагрипу.
2. Аденовірус.
3. Риновірус.
4. Респіраторний вірус.

5. Ентеровірус.
6. Коронавірус.
7. Бокавірус.
8. Метапневмовірус.

Джерелом інфекції є хвора людина, особливо в першій стадії захворювання. У цей момент людина, не усвідомлюючи, вже виділяє вірус і інфікує їм оточуючих людей: на робочому місці, у транспорті, в сімейному колі. Основним шляхом передачі є повітряно-крапельний: вірус передається зі слизом і слиною, які виділяються при розмові, чханні, кашлі [29].

Таким чином, як зазначено вище, проблема лікування гострих респіраторних вірусних інфекцій особливо гостро стоїть для дітей, зважаючи на значний рівень захворюваності. Тому прийемо, що будемо виробляти аскорбінову кислоту для лікування та профілактики ГРВІ у дітей.

Станом на 1 січня 2024 року загальна чисельність дітей віком від 0 до 17 років становила 5 385 000 осіб [30].

Забезпечити дитячий організм вітаміном С можна за допомогою таких препаратів, як спеціальні дитячі таблетки аскорбінової кислоти, у тому числі з глюкозою, сироп з плодів шипшини, а також застосуванням жувальних таблеток «Фарма-мед Кід'с формула вітамін С плюс» та «Вітамін С Нікомед»[29].

Зважаючи на різноманіття препаратів аскорбінової кислоти для дітей, прийемо, що будемо забезпечувати частку 30% від загальної чисельності дітей в Україні:

$$\frac{5\,385\,000 \times 30}{100} = 1\,615\,500 \text{ дітей}$$

Як раніше вже було вказано, добова потреба у вітаміні С залежить від віку дітей: 0-6 міс. – 30 мг, 6 міс. – до року – 35 мг, 1-3 роки – 40 мг, 4-6 років – 45 мг, 7-10 років – 45 мг, 11-14 років – 50 мг [29, 31].

Для розрахунків прийемо усереднену дозу аскорбінової кислоти – 40 мг.

Оскільки діти через особливості свого організму схильні хворіти щонайменше три рази на рік, важливо враховувати рекомендовану тривалість прийому

референтних препаратів вітаміну С – від 10 до 20 днів [31]. Це допоможе підтримати їхній імунітет у періоди підвищеної захворюваності. Тому приймемо курс прийому аскорбінової кислоти для дітей $20 \times 3 = 60$ днів.

Одна дитина за добу споживає 40 мг вітаміну С, тоді за 60 днів сумарна кількість аскорбінової кислоти складе:

$$40 \text{ мг} \times 60 \text{ днів} = 2\,400 \text{ мг або } 2,4 \text{ г}$$

Тоді 1 615 500 дітей споживають таку кількість аскорбінової кислоти:

$$1\,615\,500 \text{ дітей} \times 2,4 \text{ г} = 3\,877\,200 \text{ г} = 3\,877,2 \text{ кг}$$

З огляду на проведені розрахунки, річною потребою в аскорбіновій кислоті для частки дітей віком до 14 років в Україні є 3 877,2 кг субстанції вітаміну С.

Але оскільки продуцент синтезує не аскорбінову кислоту безпосередньо, а попередник для її отримання L-сорбозу, у подальшому для розрахунку потреби необхідно враховувати втрати на етапі подальшого процесу біотрансформації з L-сорбози через L-сорбозон до 2-кетогулонової кислоти та подальшої аскорбінової кислоти. Відповідно до наведених публікацій, котрі описують процес отримання аскорбінової кислоти іншими продуцентами та з урахування етапів виділення і очищення, загальні втрати повинні становити в межах 30% [11,14].

Тривалість культивування *Gluconobacter oxydans* становить 16 год, а концентрація L-сорбози в культуральній рідині становить 144,5 г/л [1].

Загальна кількість культуральної рідини для отримання 3 877,2 кг L-сорбози (попередника аскорбінової кислоти) складе:

$$144,5 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$3\,877\,200 \text{ г} - X$$

$$X = 26\,831 \text{ л}$$

Враховуючи 30 % втрат при подальшому етапі виробництва аскорбінової кислоти з L-сорбози (попередник для отримання вітаміну С), необхідний об'єм культуральної рідини буде:

$$V_{\text{кр}} = 26831 \cdot 1,3 = 34880,3 \text{ л} = 34,9 \text{ м}^3.$$

3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектного виробництва аскорбінової кислоти та об'єму виробничого ферментера

Для забезпечення річної потреби у L-сорбози (попередник вітаміну С) за п.3.2 потрібно одержати (з урахуванням втрат під час виділення) 34880,3 л культуральної рідини.

Розраховуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу [10]. Приймаємо кількість трудоднів – 90, інші 240 днів виробництво буде працювати над біосинтезом інших попередників та/або вітамінів мікробного походження.

Об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 34880,3/90 = 387,0 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \times V_d \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 387 \times 24) / 24 = 425,7 \text{ л/цикл,}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (16 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 1 год, підігрів та стерилізація апарату – 2 год, охолодження ферментера – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, вивантаження культуральної рідини – 0,5 год.

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{крц}} / K_{\text{зап}} = 425,7 / 0,7 = 608 \text{ л,}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 425,7 / 630 = 0,67 - \text{не перевищує заданого значення.}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 0,63 м³

За один виробничий цикл отримують 425,7 м³ культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті

краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_f), які становлять від 10 - 15%.

З урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{роб.1} = V_{кр} \times (1 + E_f) = 425,7 \times 1,1 = 468,3 \text{ л,}$$

де E_f – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 468,3 л. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,67 геометричний об'єм ферментера становить: $V_f = 468,3 / 0,67 = 700$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст1} = 630$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з1} = 468,3 / 630 = 0,74$. Пропонується використовувати ферментер геометричним об'ємом 630 л, хоч і не підпадає під оптимальні межі у коефіцієнту заповнення 0,5-0,65.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Для засіву $V_{роб.1} = 468,3$ л середовища необхідно приготувати

$$V_{пм1} = V_{роб.1} \times X_f = 468,3 \times 0,1 = 46,83 \text{ л посівного матеріалу,}$$

де $X_f = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} - V_{пм1} = 468,3 - 46,83 = 421,47 \text{ л} \approx 421,5 \text{ л,}$$

Врахуємо, що під час одержання 46.83 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} \times (1 + E_f) = 46,83 \times 1,1 = 51,5 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 51.5 л за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{па3} = 51,5 \text{ л} / 0,6 = 85,8$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний апарат $V_{ст3} = 100$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,3} = 51.5/100 = 0,52$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом 51.5 л необхідно:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} \times X_{\text{ф}} = 51.5 \times 0,1 = 5.15 \text{ л посівного матеріалу}$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пм3}} = 51.5 - 5.15 = 46.35 \text{ л}$$

Врахуємо, що під час одержання 5.15 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} \times (1 + E_{\text{ф}}) = 5.15 \times 1,1 = 5.67 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 5.67 л за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в інокуляторі об'ємом: $V_{\text{ін4}} = 5.67/0,6 = 9.44 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{ст4}} = 10 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,4} = 10/6 = 0.6$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм інокулятора обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву інокулятора необхідно підготувати

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} \times X_{\text{ф}} = 5.67 \times 0,1 = 0,57 \text{ л}$$

де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Тоді об'єм поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пм4}} = 5.67 - 0,57 = 5.1 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу $V_{\text{пм4}} = 0,57 \text{ л}$ (570 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням *G. oxydans* WSH-003 у колбах на качалці.

Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,15$.

Тоді кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}) = 570 / (750 * 0,15) = 5,1 \approx 5 \text{ колб.}$$

Таблиця 3.1

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу L-сорбози (попередника аскорбінової кислоти)

№ стадії	Тип апарата	Об'єм культуральної рідини $V_{\text{кр}}, \text{м}^3 (\text{л})$	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{з}}, \text{частка}$	Робочий об'єм апарата $V_{\text{роб}}, \text{л}$	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}, \text{л}$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{п}}, \text{л}$	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{ст}}, \text{л}$
1	2	3	4	5	6	7	8
4	Ферментер	468,3	0,74	468,3	421,5	46,83	630
3	Інокулятор	51,5	0,52	51,5	46,35	5,15	100
2	Інокулятор	5,67	0,6	5,67	5,67	0,57	10
1	Колби, шт	570 мл	0,15	570 мл	570мл	-	5 шт

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1 Шлях катаболізму сорбітолу у *Gluconobacter oxydans*

Згідно із роботою [1] *Gluconobacter oxydans* використовує для росту і біосинтезу таке джерело вуглеводного живлення як сорбітол. Згідно до Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) катаболізм сорбітолу у *G. oxydans* [34] відбувається шляхом його метаболізму D-сорбітолу до L-сорбози за допомогою D-сорбітол дегідрогенази (КФ:1.1.1.289). L-сорбоза під дією сорбоз редуктази (КФ:1.1.1.15) трансформується у D-фруктозу, яка потім в наслідок впливу фруктокінази (КФ: 2.7.1.4) трансформується у фруктозо-6-фосфат. Фруктозо-1,6 дифосфатаза II (КФ:3.1.1.11) перетворює фруктозу-6 фосфат на фруктоза 1,6-дифосфат, яка під впливом фруктозо-біфосфат альдозали (КФ:4.1.2.13) перетворюється у гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат. Гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (КФ:1.2.1.12) трансформує у 1,3-дифосфогліцерат, який під дією фосфогліцераткінази (КФ:2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат. Внаслідок дії 2,3-дифосфо-гліцерат-залежної фосфогліцератмутази (КФ:5.4.2.12) 3-фосфогліцерат трансформується у 2- фосфогліцерат. Під впливом енолази 1/2/3 (КФ:4.2.1.11) із 2-фосфогліцерату отримуємо фосфоенолпіруват, який впливом піруват кінази (КФ:2.7.1.40) перетворюється на піруват. Графічне зображення катаболізму ростового субстрату сорбітолу у штаму *G. oxydans* наведено на рис. 4.1. Піруват, що в наслідок впливу комплексу ферментів 2 піруватдегідрогенази (КФ:1.2.4.1), піруват-дегідрогеназа-E2 (КФ:2.3.1.12) трансформується у Ацетил-КоА, який залучається до ЦТК [35, 36].

Анаплеротичні реакції для поповнення оксалоацетату (інтермедіату ЦТК) є карбоксилювання фосфоенолпірувату (фосфоенол-піруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31)) і карбоксилювання пірувату (піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1)).

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Литвин А.В.					33	87
Перевір.		Удимович В.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

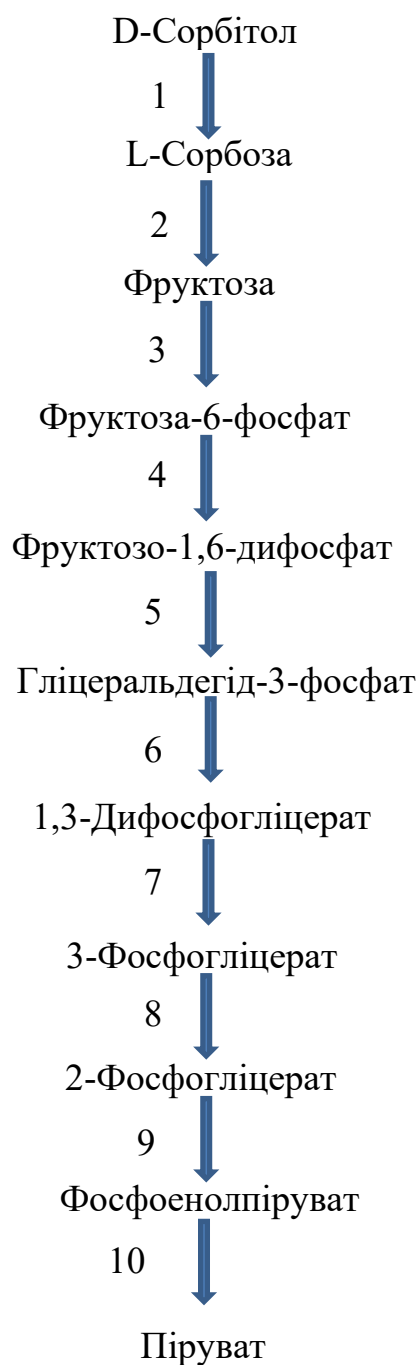


Рис. 4.1. Шлях катаболізму сорбітолу *Gluconobacter oxydans*

Ферменти: 1 - D-сорбітол дегідрогеназа (КФ:1.1.1.289); 2 - сорбозредуктаза (КФ:1.1.1.15); 3 - фруктокіназа (КФ: 2.7.1.4), 4 - фруктозо-1,6-бісфосфатаза II (КФ: 3.1.3.11), 5 - фруктозо-бісфосфатальдолаза, клас I (КФ: 4.1.2.13), 6 - гліцерадьдегід 3-фосфатдегідрогеназа (фосфорилююча) (КФ: 1.2.1.12), 7 – фосфогліцераткіназа (КФ: 2.7.2.3), 8 - 2,3-бісфосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза (КФ: 5.4.2.12), 9 – енолаза (КФ: 4.2.1.11), 10 - піруваткіназа (КФ: 2.7.1.40)

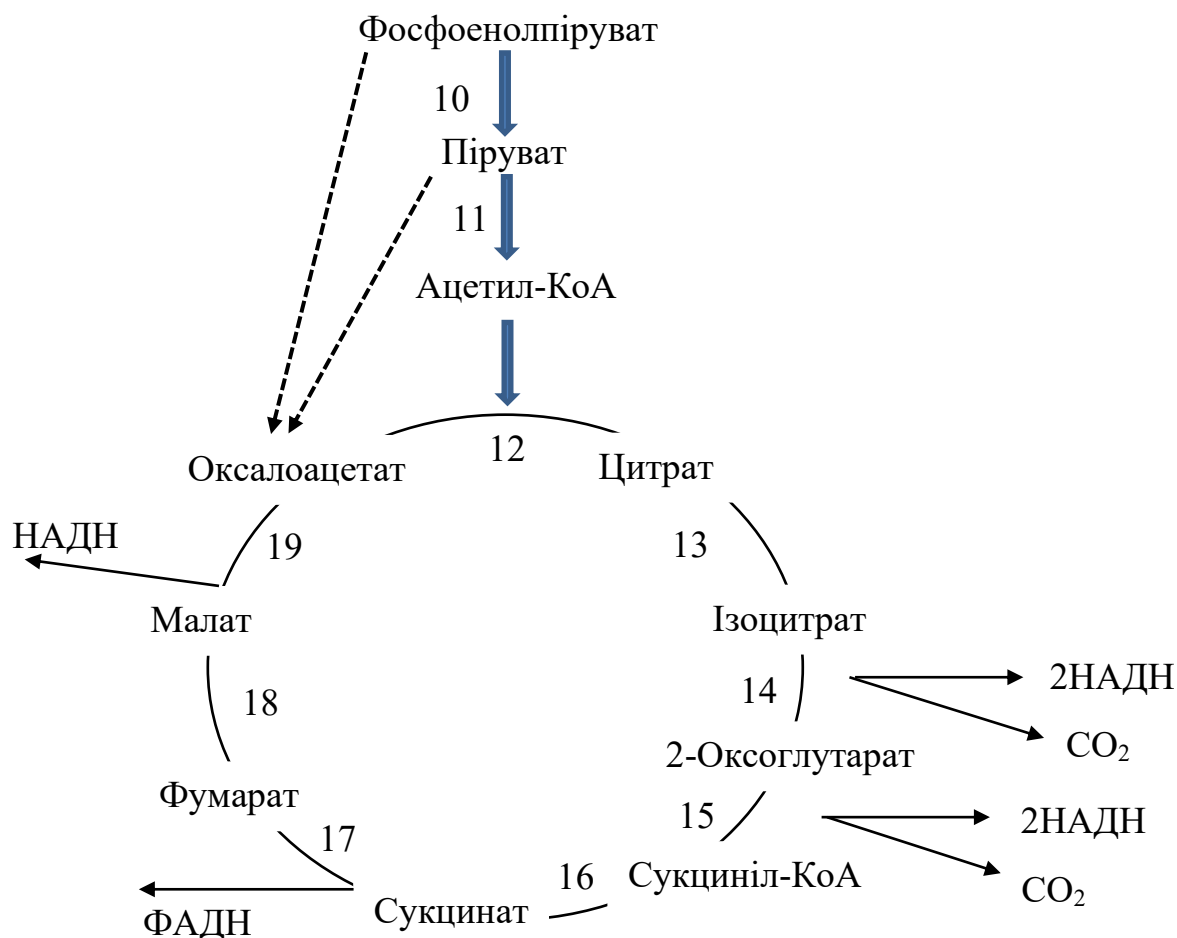


Рис. 4.2. ЦТК і анаплеротичні реакції у *Gluconobacter oxydans*

11 – 2 піруватдегідрогенази (КФ:1.2.4.1), піруват-дегідрогеназа-E2 (КФ:2.3.1.12);
 12 – цитратсинтаза (КФ:2.3.3.1); 13 - аконітатгідраназа (КФ:4.2.1.3); 14-ізоцитратдегідрогеназа(КФ:1.1.1.41); 15-дегідроліпоаміддегідрогеназа (КФ:1.8.1.4); 16-сукциніл-КоА синтетаза, альфа-субодиниця(КФ:6.2.1.5); 17-сукцинат дегідрогеназа, цитохром b субодиниця (КФ:1.8.1.4); 18- фумарат гідратаза клас II (КФ:4.2.1.2); 19-малатдегідрогеназа (КФ:1.1.5.4).

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Для культивування аеробних бактерій *Glucanobacter oxydans* оптимальні умови включають температуру 30°C та рН 7,0 . Ці умови сприятливі для мезофільних та ацидофільних мікроорганізмів.

Утворення сорбози може здійснюватися як глибинним, так і поверхневим методами. При поверхневому методі бактерії культивуються на поверхні середовища, але це не забезпечує високий вихід сорбози. Найчастіше використовується глибинний метод культивування, який має вищу продуктивність.

Бактерії *G. oxydans* є облігатними аеробами і потребують постійної аерації під час культивування. Для біосинтезу використовується періодичне культивування. Отже, для виробничого біосинтезу аскорбінової кислоти з використанням бактерій *G. oxydans* застосовують глибинний метод культивування у стерильних умовах [1].

Для культивування бактерій *G. oxydans* необхідна постійна аерація середовища, оскільки вони є облігатними аеробами. Тому доцільно використовувати ферментер, оснащений барботером. Аерація в межах від 0.4 до 0.15 м³/м³ за хвилину забезпечує культуру необхідною кількістю кисню.

Для забезпечення рівномірного масообміну по всьому середовищу ферментер повинен бути оснащений мішалкою. Швидкість обертання мішалки повинна бути в межах 150-300 об/хв. Тому рекомендується використовувати звичайну лопатеву мішалку з трьома плоскими лопатями або турбінну мішалку для ефективного перемішування.

5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Бактерії *G. oxydans* WSH-003 є облігатними аеробами, вони потребують постійної аерації під час культивування, тому доцільно використовувати ферментер, оснащений барботером. [37, 38].

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Литвин А.В.			РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Удимович В.М.					36	87
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Як правило, використовується стандартна система очищення та стерилізації аераційного повітря, яка складається з наступних блоків [39]:

- попереднє очищення повітря;
- стиснення повітря;
- охолодження та видалення зайвої вологи;
- підігрів повітря;
- стерилізація повітря у головних фільтрах;
- стерилізація повітря в індивідуальних фільтрах.

Забір атмосферного повітря проводять через забірний пристрій, встановлений у найвищій точці відділення повітропідготовки і попередньо очищається від пилу у фільтрі, стискується в компресорі до необхідного тиску, нагріваючись до 120...220°C. Потім повітря охолоджується у теплообміннику і надходить до вологовідокремлювача (ресивера), де відокремлюється від крапель вологи та мастила. З метою позбавлення пульсацій тиску повітря та швидкості руху повітря при роботі компресора використовують ресивер великої ємності. Осушене повітря підігрівається у теплообміннику, проходить через фільтри грубого очищення і далі подається до індивідуального фільтра, встановленого безпосередньо біля ферментера, де звільняється від сторонньої мікрофлори.

Існує багато методів забезпечити стерильність повітря, наприклад, обробка повітря фізичними, хімічними або іншими чинниками. Для біотехнологічних виробництв традиційними методами підготовки повітря є метод фільтрування через перегородки з різних матеріалів. Загалом у стерилізації повітря ключовим моментом є підбір фільтруючого матеріалу та закріплення його в корпусі фільтра.

Виходячи з теорії стерилізації повітря, для видалення контамінантів використовують волокнисті фільтруючі матеріали з різних мінеральних або органічних речовин, пористі перегородки з кераміки або полімерних матеріалів [39].

Керамічні фільтри

Керамічні фільтруючі елементи, такі як диски, пластини, патрони, виробляють шляхом спікання кварцового піску, відібраних зерен шамоту, та інших природних мінералів до утворення склоподібної маси. Пористі керамічні вироби є дуже крихкими, тому для підвищення їх міцності стінки патронів роблять $6 \div 10$ мм і більше, але чим товщі стінки, тим більший опір повітрю вони створюють. Довжина патронів від 0,5 до 1,2 м, діаметр 50-80 мм. Вони мають загальну пористість у діапазоні 35-55%, їхня міцність на стискання становить 15-25 МПа, а на згин – 4-15 МПа. Обпалювання кераміки проводять при температурі від 900 до 1300°C [40].

Фільтри з полімерних матеріалів

Як тонковолокнисті середовища в нашій країні широкого поширення набули полімерні фільтруючі матеріали типу ФП (фільтри Петрянова). Вони являють собою шари синтетичних волокон діаметром 1-2 мкм, нанесені на марлевий субстрат (підкладку) або «основу» з скріплених між собою більш товстих волокон. Матеріали фільтруючої поверхні (ФП) мають дуже високу ефективність. Завдяки їхній малій товщині шарів (0,2-1 мм), площа фільтрації може сягати 100-150 м² на кожен 1 м³ апарату [40].

Основною вимогою, яка висувається до аераційного повітря, є його стерильність.

У промислових умовах використовують в основному метод фільтрування крізь шари насипного, пористого або волокнистого матеріалу. Попередня стерилізація здійснюється за допомогою глибинних (набивних) фільтрів, які виготовлені з волокнистих матеріалів. Для остаточної стерилізації перед входом у ферментер встановлюють індивідуальні фільтри з розгорнутою поверхнею або абсолютні, які діють як сита, патронного типу. Проте, абсолютні сита зумовлюють велику втрату тиску повітря і швидко забиваються, тому застосовують їх нечасто. Попри те, що волокна набивного фільтру розташовані між собою на відстанях на порядок більших за діаметр мікрочастинок, вони діють досить ефективно. За умови великих швидкостей частинки, проходячи шар волоконного

фільтру, скоріше або пізніше зустрічають на своєму шляху волокно і затримуються ним (інерційний механізм осадження) [39].

Фільтрувальний матеріал повинен відповідати наступним основним вимогам: мати високу ефективність при мінімальному опорі, достатню пилоємкість і механічну міцність; повинен бути стійкими до впливу гострої пари як основного агента, що стерилізує, бути зручним і надійним в експлуатації.

Для попереднього очищення повітря часто застосовують фільтри періодичної дії касетного або коміркового типу, заповнені металевими стружками або іншими подібними матеріалами, змоченими оливою. Доцільно використовувати для цих цілей безперервно діючі самоочисні масляні фільтри (циклофільтри). Ступінь очищення в цих фільтрах досягає 50...70%. У літературі є вказівки про можливість використання у якості набивання для фільтрів попереднього очищення грубих мінеральних або синтетичних волокон.

За останні роки з'явилися дані про застосування для попереднього очищення повітря губчатого модифікованого пінополіуретану. Пилоємкість фільтрів із цього матеріалу становить 200 г/м², ефективність очищення 50...85%, опір після обробки концентрованим розчином луку відносно невеликий. Так, при товщині шару 1,8 см і швидкості повітря 5 см/с опір становив 4 Па (0,4 мм. вод. ст.). Тривалість однократного використання фільтрів з пінополіуретану 3...4 місяці. Доцільно використовувати цей матеріал у системах невеликої продуктивності.

У фільтрах першого ступеня очищення повітря, де ефективність уловлювання зазвичай повинна бути не менш 98% при мінімальному опорі, використовуються матеріали, які характеризуються діаметром волокон від 10 до 50 мкм.

Як індивідуальні фільтри широко застосовують рамочні або патронні фільтри з тканиною Петрянова на основі перхлорвінілового волокна. Фільтр являє собою сталевий циліндр із з'ємною кришкою і конічним дном. У середині апарату встановлюють 73 циліндричні перфоровані трубки, обгорнутих тканиною Петрянова. Загальна площа фільтрування – 17,5 м². Після проходження крізь тканину повітря стерилізується. Продуктивність цього фільтра становить 1000 м³/год [39].

Таким чином, будемо проводити підготовку повітря для аерації з врахуванням вищеописаної інформації.

5.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Серед усіх стадій промислового виробництва, на нашу думку санітарно-гігієнічна складова виробничого процесу є найбільш важливіша, оскільки критично впливає на допоміжні та основні стадії біотехнологічного виробництва. Успішне виконання етапів санітарно-гігієнічної підготовки в першу чергу залежить від персоналу, оскільки саме люди є найбільш критичним фактором, який впливає на якість готового продукту. Якщо персонал суворо дотримається усіх встановлених процедур і рутинно їх виконує, ризик забруднення продукту сторонньою мікрофлорою і виникнення перехресної контамінації зведено майже до нуля. Дані процедури реалізуються шляхом виконання рутинних процедур очищення робочих поверхонь та обладнанн за допомогою мийних засобів, а також завершальним етапом дезінфекції. Мийні засоби - це речовини органічної та неорганічної природи чи комбінація речовин, які представляють собою мила та/або поверхнево-активних речовин. Дезінфекція це комплекс операцій, які знищують потенційно патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми, форми їх спокою і токсини. Мийка та дезінфекція є комплексними процедурами, які дають гарантію забезпечення встановленого нормативною документацією рівня чистоти на виробництві, з метою отримати на виході правильно організованого технологічного процесу і високоякісну готову продукцію.

Виробництво L-сорбози (попередник аскорбінової кислоти) реалізується шляхом біосинтезу за допомогою *Gluconobacter oxydans*, то протягом санітарної підготовки і виробничого процесу має суворо вестися контроль мікробіологічної чистоти, оскільки контамінація поживного середовища чужорідною мікрофлорою матиме фатальні наслідків для готової речовини. Обладнання і поверхні протягом виробничого процесу постійно контактують і зрізномітними хімічними речовинами і субстанціями, залишки яких іноді дуже складно видалити, що в

свою чергу створює додаткові ризики створення осередків розвитку мікрофлори або перехресної контамінації. Отже, до мийних і дезінфікуючих засобів висувають ряд вимог, що наведені нижче:

- видаляти забуднення різноманітного хімічного походження;
- не впливати на органолептичні властивості готового продукту;
- відсутність будь-якого впливу на оброблювані поверхні;
- висока активність проти різних видів мікроорганізмів;
- володіти швидкою розчинністю у воді під час пригтовування робочих розчинів;
- не нести загрозу здоров'ю персоналу.

Далі у роботі приведено приклади різних миючих і дезінфікуючих засобів, які можна застосувати під час виробничих процесів:

Асептік-Біодез – засіб для обробки рук у вигляді готової до застосування прозорої рідини від безбарвної до світло-жовтого кольору. Склад: ізопропанол, алкілдиметилбензиламоній хлорид, вода. Призначений для дезінфекції (санітарної обробки) шкірних покривів, обробки шкіри ніг з метою профілактики грибкових та інших інфекцій, гігієнічної антисептики рук персоналу. Має антимікробні властивості щодо грамнегативних та грампозитивних бактерій (включаючи збудників туберкульозу), віруліцидні, (включаючи збудників гепатитів В і С, ВІЛ-інфекції, поліомієліту, вірусу грипу птахів А/Н5Н1, вірусу свинячого грипу А/Н1Н1), фунгіцидні (щодо грибів роду *Candida* і патогенних дерматофітів) властивості. Засіб має : пролонговану (протягом 3 годин) протимікробну дію. Для гігієнічної обробки рук проводять однократну обробку шляхом нанесення на сухі долоні рук не менше 3 мл засобу та втирають його у шкіру до висихання. Після обробки шкіру не миють, не витирають і не висушують.

Миючий засіб LIV актив 114 – лужний концентрований мийний засіб у вигляді однорідної безбарвної або слабо-жовтої рідини без сторонніх домішок. Видаляє органічні забруднення – жири в, залишки овочевої та фруктової продукції, білки, дріжджі, молочний камінь. Цільове призначення це безрозбірна

мийка (СІР-мийка) харчового обладнання, розпилення (резервуари, змішувачі, стерилізатори, трубопроводи, фільтри, пастирезатори, сепаратори, розливні машини, варочні та вакуум-варочні апарати, підігрівачі, випарювачі). Склад: вода деіонізована, натрія карбоксилат алкилгліколевого ефіру, етилендіамінтетра оцтової кислоти динатрієва сіль, гідроксид натрію, силікат натрію, бензалконіум хлорид. Не пошкоджує такі матеріали, як легована сталь, гума, лугостійкі пластмаси, мідні сплави, ебокситні, фібробетонні поверхні. Робочі розчини: 2,0-5,0 % [41].

Миючий засіб LIV Актив 331 – засіб мийний кислотний пінний. Призначений для комбінованих забруднень, іржі, кальцієвого каменю, осаду неорганічних солей. Засіб призначений обробки і миття будь-якого обладнання, стін та підлог із кахельними покриттями. Засіб містить інгібітор, що дозволяє використовувати на оцинкованих поверхнях, нержавіючій сталі, алюмінієвій, хромованій, нікельованій поверхнях, скляних, гумових та пластмасових. Склад: кислота ортофосфорна, неіоногенні ПАВ, вода деіонізована, кислота молочна, комплексотворювач, антикорозійний агент. Робочі розчини: 5,0-8,0 % [42].

Дезінфікуючий засіб ПРАЙМДЕЗИМ – рідкий ферментний дезінфекційний засіб у вигляді прозорого розчину зеленого кольору. Склад: дидецилдиметиламоній хлорид, N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін, фермент протеаза, детергенти, вода.

Призначений для дезінфекції трубопроводів, комунікацій, резервуарів, технологічного обладнання, апаратури, інвентарю, тари та поверхонь приміщень. Проявляє антимікробні властивості проти бактерій (збудників гнійно-септичних та інш. інфекцій (стафілококів, стрептококів, клебсієл, кишкової і сіньогнойної паличок, ацінетобактер, протея), збудників холери, легіонельозу, туберкульозу, вірусів (в т. ч. ВІЛ, вірусів гепатитів А, В, С, рота, поліо-, ентеровірусів, вірусів грипу, вакцини вірусу, аденовірусів, герпесу), патогенних грибів роду *Candida*, збудників дерматомікозів, цвілевих грибів, а також володіє спороцидною дією. IV клас небезпеки. Застосовується у вигляді водних робочих розчинів 0,2% - 4,0%. Рекомендована витрата робочого розчину – 100 мл/м² [43].

Дезінфікуючий засіб БАЦИЛІКВІД СТЕРИЛ – однорідна прозора рідина від жовтого до коричневого кольору. Склад: глутаровий альдегід, хелатний і антикорозійний комплекси, вода, стабілізатори. Використовують для дезінфекції трубопроводів, комунікацій, резервуарів, технологічного обладнання, апаратури, інвентарю, тари та поверхонь приміщень.

Видаляє різні типи забруднення, не фіксують органічні забруднення. Толерантний до поверхонь з лудженого заліза, алюмінію, скла, гуми (в т. ч. силіконової), нержавіючої сталі (в т. ч. хромової, хромонікелевої, аустенітної), кислотостійких пластмас (в т. ч. поліетилен, поліпропілен, полівінілхлорид), фторопласту (тефлон, вірон), кераміки та поверхні з лакофарбовим, гальванічним, полімерним покриттям, з емалі, гуми. Засіб володіє винятково високою бактерицидною (в т. ч. туберкулоцидною), віруліцидною (включаючи поліовірус), фунгіцидною (в тому числі щодо дріжджових і цвілевих грибів) і спороцидною діями. Засіб не має селективної антимікробної дії. Застосовується у вигляді водних робочих розчинів 0,05-0,1% [44].

Враховуючи вище зазначену інформацію, організація санітарної обробки в тому числі шляхом пошуку і вибору оптимальних в кожній конкретній ситуації миючих і дезінфікуючих засобів, критично впливає на правильність ведення біотехнологічного виробництва і на отримання якісного кінцевого продукту.

Узагальнена схема запропонованих миючих і дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
<i>Засоби для обробки внутрішньої поверхні обладнання</i>								
LIV актив 114 (виробник: Квант)	вода деіонізована, натрія карбоксилат алкилгліколевого ефіру, етилендіамінтетра оцтової кислоти динатрієва сіль, гідроксид натрію, силікат натрію, бензалконіум хлорид.	-	лужний концентрований мийний засіб у вигляді однорідної безбарвної або слабо-жовтої рідини без сторонніх домішок.	Толерантний до поверхонь з луженого заліза, алюмінію, скла, гуми (в т. ч. силіконової), нержавіючої сталі (в т. ч. хромової, хромонікелевої, аустенітної), кислотостійких пластмас (в т. ч. поліетилен, поліпропілен, полівінілхлорид), фторопласту (тефлон, вірон), кераміки та поверхні з лакофарбовим, гальванічним, полімерним покриттям, з емалі, гуми	Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 2,0-5,0%.	Не потребує реєстрації	94,14 грн за 1 л	[41]
LIV Актив 331 (виробник: Квант)	кислота ортофосфорна, неіоногенні ПАВ, вода деіонізована, кислота молочна, комплексоутворювач, антикорозійний агент.	-	засіб мийний кислотний пінний		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 5,0-8,0 %.	Не потребує реєстрації	1142 грн за 20 л	[42]
ПРАЙМДЕЗИМ (виробник: ТОВ "ПРАЙМДЕЗ", Україна)	дидецилдиметиламоній хлорид, N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін, фермент протеаза, детергенти, вода	Засіб володіє бактерицидною (в т. ч. туберкулоцидною), віруліцидною (включаючи поліовірус), фунгіцидною (в тому числі щодо дріжджових і цвілевих грибів) і спороцидною діями	рідкий ферментний дезінфекційний засіб у вигляді прозорого розчину зеленого кольору		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 0,2% - 4,0%.	Наказ від 26.04.2021 №819 до 26.04.2026	940 грн за 1 л	[43]
БАЦИЛКВІД СТЕРИЛ (виробник: ТОВ «ДАНА МЕДІКАЛ», Україна)	глутаровий альдегід, хелатний і антикорозійний комплекс, вода, стабілізатори		однорідна прозора рідина від жовтого до коричневого кольору		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 1,0% - 10,0%.	Наказ від 27.07.2023 №1363 до 27.07.2028	660 грн за 1 л	[44]

5.3. 2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва L-сорбози

Виробництво L-сорбози (попередник аскорбінової кислоти) шляхом промислового культивування займає 90 днів і передбачає підготовку та використання інокуляторів на 10 л, 100 л та ферментеру 630 л, реакторів-змішувачів для підготовки / стерилізації поживного середовища, установку для автоматичного перемішування колб, лабораторного боксу та обладнання для виділення готового продукту (збірника культуральної рідини і центрифуги).

Крім того, треба передбачити організацію лабораторних та виробничих приміщень: мікробіологічна лабораторія (зберігання мікроорганізму і робота у боксах із культурою *Gluconobacter oxydans*, проведення аналізу для контролю якості), приміщення із установкою для автоматичного перемішування колб-качалок для інокуляту, приміщення із інокуляторами для вирощування, приміщення для промислового біосинтезу аскорбінової кислоти. Обладнання у приміщеннях розмістимо на відстані 1,5 м від стін та одне від одного, з метою дати персоналу достатньо простору для обслуговування і санітарно-гігієнічних процедур. Розміри і об'єм одиниць обладнання наведено у *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

Розміри обладнання, що використовується для виробництва аскорбінової кислоти

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Інокулятор	10	-	2,2
Інокулятор	100	-	-
Ферментер	630	-	-
Реактор змішувач	10	0,29	0,45
Реактор змішувач	50	0,41	0,85
Реактор змішувач	250	1,05	1,6
Реактор змішувач	500	1,15	2,0
Всього	1550	-	-

Загальний об'єм виробничого обладнання складає 1550 л згідно із даними *табл. 5.2*

Далі необхідно порахувати кількість мийних та дезінфікуючих засобів, виходячи із розмірів робочих приміщень. На *рис. 5.1* схематично зображено приміщення, де відбувається виробництво культуральної рідини *G. oxydans*.

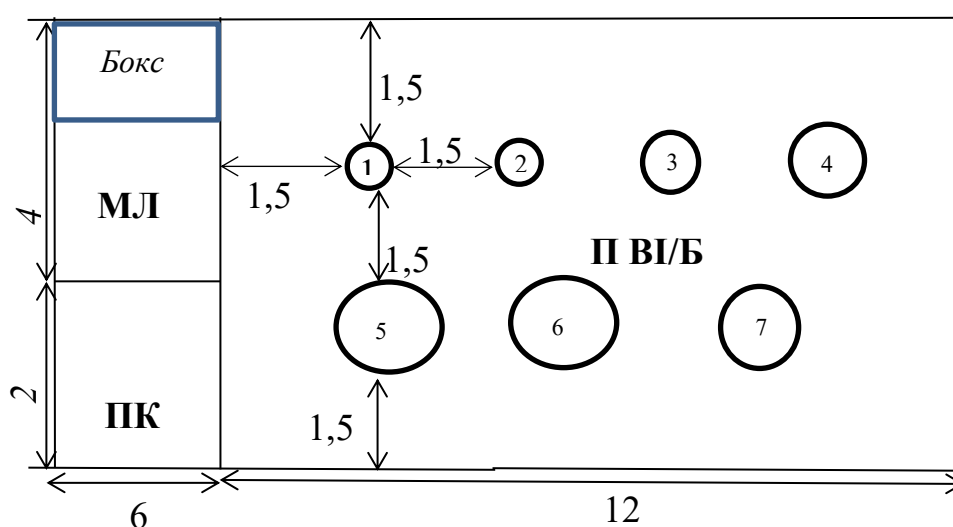


Рис. 5.1 Схематичне зображення виробничих приміщень

МЛ – мікробіологічна лабораторія;

П ВІ/Б – приміщення вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу;

ПК – приміщення із установкою-качалкою.

1 - реактор змішувач 10 л, 2 – інокулятор 10 л, 3 - реактор змішувач 50 л, 4 - інокулятор 100 л, 5 - реактор змішувач 500 л, 6 - ферментер 630 л, 7 - реактор змішувач 250 л,

Виходячи із *рис 5.1*, можна підрахувати площі виробничих приміщень.

З метою підтримання чистоти виробничих приміщень, миття підлоги буде здійснюватися 90 разів. Оскільки генеральне прибирання має місце 2 рази на місяць – в загальному це 6 разів. Необхідно також вираховувати кількість миючих засобів для обробки стін та підлоги. Згідно із *рис. 5.1*, враховуючи висоту приміщень 5 м, площа підлоги приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу складає 72 м^2 ($12 \text{ м} \times 6 \text{ м}$), площа стін – $((12 \text{ м} \times 5 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 5 \text{ м})) \times 2 = 180 \text{ м}^2$, загальна площа – $72 \text{ м}^2 + 180 \text{ м}^2 = 252 \text{ м}^2$. Для мікробіологічної лабораторії площа підлоги складає $6 \text{ м} \times 4 \text{ м} = 24 \text{ м}^2$, площа стін – $((4 \text{ м} \times 5 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 5 \text{ м})) \times 2 = 100 \text{ м}^2$, загальна площа – 124 м^2 . Для приміщення з качалками площа підлоги складає $2 \text{ м} \times 6 \text{ м} = 12 \text{ м}^2$, площа стін – $((2 \text{ м} \times 5 \text{ м}) \times 2 + (3 \text{ м} \times 5 \text{ м})) \times 2 = 40 \text{ м}^2$, загальна площа – 52 м^2 .

Узагальнені дані стосовно площ поверхонь для обробки миючими засобами представлено в *табл. 5.3*.

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу	72	180	252
Мікробіологічна лабораторія	24	100	124
Приміщення з качалками	12	40	52
Разом	108	320	428

Розрахунок періодичності миття обладнання наведено нижче. Оскільки загальний об'єм культуральної рідини становить 34880,3 л, а об'єм культуральної рідини за 1 цикл дорівнює 425,7 л/цикл, то кількість виробничих циклів (циклів миття) становить: 34880,3 л / 425,7 л/цикл = 82 циклів. Приймаючи до уваги додаткове миття після останнього циклу, загальна кількість буде становити 83. Тоді загальний об'єм миття:

$$3,180 \times 82 = 260,76 \text{ м}^3$$

Таблиця 5.4

Розрахунок площ миття / дезінфекції

Об'єкт	Площа / об'єм об'єкту, м ² / м ³	Періодичність миття / дезінфекції під час виробничого процесу	Загальна площа / об'єм, м ² / м ³
Обладнання	1,55 м ³	82	127,1 м ³
Підлога	108 м ²	90	9720 м ²
Стіни, двері, вікна	320 м ²	6	1920 м ²

Враховуючи витрати робочого розчину близько 100 мл на 1 м² на площі поверхні, можна розрахувати об'єми робочих розчинів мийних / дезінфікуючих засобів. Згідно із даними із *табл. 5.3*, загальний об'єм миття для обладнання складе 260,76 м³. Аби скоротити витрати води і мийних засобів, використовують функцію SIP-мийки, подаючи через неї робочі розчини миючих засобів разом із водою, що в свою чергу дозволяє економити близько 50 % миючих засобів і води. Отже, для одного циклу миття знадобиться:

1550 л \times 0,5 = 775 л робочого розчину миючого засобу, а на весь період виробничого процесу: 775 л \times 82 = 63 550 л. Загальна площа всіх поверхонь складає: 9720 м² + 1920 м² = 11 640 м², а загальна витрата миючого / дезінфікуючого розчинів становить: 11 640 м² \times 100 мл = 1164 л. У табл. 5.5. наведено вартості мийних і дезінфікуючих засобів і їх витрати.

Витрати і вартість мийних та дезінфікуючих засобів під час виробництва

Назва	Концентрація робочого розчину, %	Об'єкт миття / дезінфекції	Площа /об'єм миття / дезінфекції об'єкту, м ³ /м ²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/ дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Сумарна вартість миття /дезінфекції під час виробництва, грн
LIV актив 114¹	3,5 %	Обладнання	127,1	63 550	94,14	3,29	209 079
LIV актив 331²	6,5 %	Обладнання	127,1	63 550	57,1	3,7	235 135
ПРАЙМДЕЗИМ₃	4,0 %	Обладнання / Стіни/підлога/ вікна	11 640	1164,0	940,0	37,6	43 766,4
БАЦИЛКВІД СТЕРИЛ⁴	10 %.	Обладнання / Стіни/підлога/ вікна	11 640	1164,0	660,0	66	76 824

Примітка. Вартість засобів наведено станом на квітень 2025 р. 1- https://etna.net.ua/ru/liv-aktyv-114-zasib-myinyi-luzhnyi-iz-ponyzenym-pinoutvorenniam-z-antybakterialnym-efektom-1-l/?srsrtid=AfmBOorlvDID_CzAp1wBiCAFtrDz7-DIz5sP-WKoiXKGhdZ5WjJ4g6ub
2-<https://prof-pack.prom.ua/ua/p1329299867-sredstvo-moyuschee-kislotnoe.html> 3-https://www.nailmag.com.ua/ru/prajmdezim-1000-ml?srsrtid=AfmBOoqx4KExLBNm2OoMMJt4oKpznGzcA0_YI__8Ct-anESCj8XTQuON
4 - <https://prom.ua/ua/p887510839-batsilikvid-long-kontsentrat.html>

* **розрахунок вартості 1 л робочого розчину описано для мийного засобу «LIV актив 114»:** Ціна 1 л становить 94,14 грн, концентрація його робочого розчину – 3,5 %, тому в 1000 мл робочого розчину міститься 3,5 мл (0,035 л) концентрату. Таким чином вартість 3,5 % розчину становить: 94,14 грн × 0,035 л = 3,29 грн/л.

5.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез L-сорбози (144,5 г/л за 16 год) досягається за умов культивування *G. oxydans* на середовищі наступного складу [1]: 150 г/л D-сорбіту, 10 г/л дріжджового екстракту. Дане середовище використовується для виробничого біосинтезу та для вирощування посівного матеріалу на всіх стадіях для накопичення посівного матеріалу, також пропонується використовувати це середовище з додаванням цефокситину у кількості 25 мкг/мл (приготування буде відбуватися окремо оскільки кількість є суттєво малою) [1].

Одержання інокуляту *G. oxydans* відбувається у три етапи - у колбах на качалці, у інокуляторі об'ємом 10 л, 100 л.

5.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Для отримання посівного матеріалу в колбах на качалках, необхідно 0,57 л = 570 мл поживного середовища, отже стерилізацію можна провести в автоклаві. Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *G. oxydans*, передбачається наявність однієї основної композиції (умови стерилізації є аналогічними для кожного з компонентів):

Композиція А: D-сорбіт, дріжджовий екстракт, - режим стерилізації: 112 °С, 30 хв.

Таблиця 5.6

Підготовка поживного середовища для вирощування інокуляту *G. oxydans* в колбах на качалці

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компоненту в 570 мл поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
D-сорбіт	150	85,5	А	350
Дріжджовий екстракт	10	5,7		
Вода		= 350 мл		
РАЗОМ:				350

Для приготування та стерилізації композицій А знадобляться одна колба об'ємом 1000 мл відповідно та мірний циліндр на 500 мл.

Таблиця 5.7

Розрахунок поживного середовища для стадії підготовки інокуляту в інокуляторі на 10 л

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компоненту в 5,67 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
D-сорбіт	150	850,5	А	5670
Дріжджовий екстракт	10	56,7		
Вода		= 5100 мл		
Конденсат		= 570 мл		
РАЗОМ:				5,67 л

Композицію А готуємо та стерилізуємо у реакторі-змішувачі на 10 л.

Розрахунок поживного середовища для стадії підготовки інокуляту в інокуляторі на 100 л

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компонента в 46,35 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
D-сорбіт	150	6952,5	А	46,35
Дріжджовий екстракт	10	463,5		
Вода		= 41,715 л		
Конденсат		= 4,635 л		
РАЗОМ:				28,71 л

Композицію А готуємо та стерилізуємо у реакторі-змішувачі на 50 л.

Розрахунок поживного середовища для стадії підготовки інокуляту в інокуляторі на 630 л

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компонента в 421,5 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
D-сорбіт	40 (150)	16 860 (63 225)	А	305,5
Дріжджовий екстракт	10	4 215		
Вода		= 275 л		
Конденсат		= 30,5 л		
РАЗОМ:				305,5 л

Композицію А готуємо та стерилізуємо у реакторі-змішувачі на 500 л.

5.4.2. Обґрунтування підготовки та стерилізації підживлювального розчину D-сорбіту у ферментері на 630 л

Концентрація D-сорбіту у середовищі культивування продуцентом L-сорбози становить 150 г/л. На початку процесу у середовище вносять 40 г/л субстрату. Отже, у процесі культивування в середовище необхідно внести $150 - 40 = 110$ г/л D-сорбіту у вигляді підживлювального розчину.

Розрахуємо загальну кількість D-сорбіту (X) для приготування підживлювального розчину.

Об'єм поживного середовища для виробничого біосинтезу становить 421,5 л. Отже:

110 г D-сорбіту міститься в 1 л середовища,

X г D-сорбіту міститься в 421,5 л середовища.

$$X = (421,5 \times 110) / 1 = 46\,365 \text{ г} = 46,37 \text{ кг D-сорбіту.}$$

Далі розрахуємо об'єм 40 %-го підживлювального розчину (V), що містить 46,37 кг D-сорбіту:

40 кг D-сорбіту міститься в 100 л розчину,

46,37 кг D-сорбіту міститься в V л розчину.

$$V = (46,37 \times 0,1) / 40 = 116 \text{ л розчину.}$$

Підготовка і стерилізація даного підживлювального розчину (116 л) здійснюється в окремому реакторі об'ємом 250 л. Умови стерилізації: температура 112 °С, 30 хв.

Розрахуємо кількість порцій підживлення і об'єм підживлювального розчину D-сорбіту для однієї порції. Тривалість процесу біосинтезу L-сорбози (попередник аскорбінової кислоти) становить 16 год. Прийmemo, що підживлення вноситься у середовище через 4 год. Отже, кількість порцій підживлення становить $(16-4)/4=3$. Отже, з кожною порцією підживлення у середовище необхідно внести $116 / 3 = 38,7$ л 40%-го підживлювального розчину D-сорбіту.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

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

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки мікробного синтезу аскорбінової кислоти

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозабірні жалюзі LUE-FW. Ця модель жалюзі має штормостійкі лопати, що обумовлює можливість установки на місцевості з високою швидкістю вітру. Забезпечує максимальну пропускну здатність повітря та оптимальну герметичність від дощу. Матеріал: екструдований алюмінієвий профіль (AlMgSi 0,5 F22). Компанія: «GAL Ventilation GmbH» (Німеччина) [45]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	ФЯР фільтр грубого очищення повітря. Очищення припливного повітря від твердих часток та пилу з коефіцієнтом очищення не менше ніж 0,8. мають опір потоку повітря 30 Н/м ² (3,0 кгс/м ²) або 30 Па. Фільтруючий елемент панельного типу виконаний із набору металевих сіток. Компанія: «Люфтгранд» (Україна) [46]
К-3	Компресор	1	Компресор низького тиску моделі ДКАВ 75. Матеріал – чавун. максимальний тиск 3 бар. Продуктивність 7000 л/хв. Компанія: «Dalgakiran» (Україна) [47]

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		<i>Литвин А.В.</i>					54	87
Перевір.						Кафедра БТМ		
Реценз.		<i>Удимович В.М.</i>						
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						

Продовження табл. 6.1

T-4 T-6	Теплообмінник	2	Теплообмінник для теплової обробки газів та повітря. Площа однієї пластини від 0,1 до 2,0 м ² . Товщина пластини від 1,0 до 6,0 мм. Ширина каналу від 160 до 2000 мм. Температура від -200 до +950°C. Компанія: «Анкор-Теплоенерго» (Україна) [48]
P-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний. Об'єм ресивера 2700 л. Максимальний робочий тиск 10 бар. Положення монтажу – вертикальний. Товщина сталі 6 мм. Компанія: «Лідер» (Україна) [49]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтри для очищення газів. Матеріал на основі скловолокна та голкопробивних волокон. Відмінна пористість, досягає 96%. Модель ФСВ-0-840, тип – основний, продуктивність 14 м ³ /год. Компанія: «Компресормаш-Сервіс» (Україна) [50]
P3-8	Реактор-змішувач 10 л	2	Реактор з нержавіючої сталі BSF-10L об'ємом 10 л. Широкий діапазон температурних операцій, від -100 °C до 299 °C. Швидкість обертання 0-600 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь. Компанія: «ACHIEVE CHEM» (Китай) [51]
НВ-15 НВ-17 НВ-20	Відцентровий насос	1	Вертикальний одноступінчастий відцентровий насос моделі WLT65-5/1.1. Високоєфективний двигун YE3, ступінь захисту IP55, клас F. Швидкість потоку 40 м ³ /год. Максимальний робочий тиск: 6 бар. Температура рідини: -15°C~110°C. Компанія: «EVOKE PUMP» (Китай) [52]
P3-11	Реактор-змішувач 50 л	1	Реактор гомогенізатор 40 л. Матеріал нержавіюча сталь марок AISI 304 або AISI 316. Теплоізольована сорочка нагріву. Привід обертання. Вузол ущільнення. Щит управління. Компанія: «ХІММІКС» (Україна) [53]

РЗ-14	Реактор-змішувач 500 л		Реактор змішувач лабораторний 500 л. Матеріал нержавіюча сталь марок AISI 304 або AISI 316. Теплоізольована сорочка нагріву. Привід обертання. Вузол ущільнення. Щит управління. Компанія: «STS Group» (Україна) [54]
РЗ-16	Реактор-змішувач 250 л	1	Реактор змішувач лабораторний 250 л. Матеріал нержавіюча сталь марок AISI 304 або AISI 316. Теплоізольована сорочка нагріву. Привід обертання. Вузол ущільнення. Щит управління. Компанія: «STS Group» (Україна) [55]
Ф-9 Ф-12 Ф-18	Індивідуальний фільтр	6	Фільтр стисненого повітря класу М. Автоматичний злив конденсату Максимальний робочий тиск 16 бар Максимальна робоча температура 65 °С, мінімальна 1,5 °С. Ступінь очищення 0,1 мкм. Продуктивність: 1,2-46,0 м/хв. Компанія: «Comprag» (Німеччина) [56]
ІН-10	Інокулятор 10 л	1	Біореактор Infors Minifor 2 об'ємом 10 л. Максимальна температура від 0 до 145 °С. Швидкість обертання 150-1600 об/хв. Боросилкатне скло, є сорочка. Є датчики контролю температури, піни, рН, розчиненого кисню, густини клітин [57]
ІН-13	Інокулятор 100 л	1	Біореактор BioPilot 100 L об'ємом 100 л. Матеріал нержавіюча сталь. Наявна сорочка. Є датчики контролю температури, тиску, піни, рН, розчиненого кисню, густини клітин Компанія: «Getinge Applikon» (Швейцарія) [58]
ФР-19	Ферментер 630 л	1	Промисловий біореактор об'ємом 5000 л. Біореактор може бути виконаний у наступних співвідношеннях - висота : діаметр = 1,5:1 або 2:1. Матеріали: сталь AISI 316L та AISI 304. Наявна сорочка. Встановлені датчики рН, розчиненого кисню, густини суспензії; порт відбору проб, запасні порти. Швидкість перемішування 10-600 об/хв. Автоматична подача повітря до 2 vvm. Компанія: «SYSBIOTECH GmbH» (Австрія) [57]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрозабірником (ПЗ-1) у найвищій точці $H = 20$ м.

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

Попередню очистку повітря здійснюють на фільтрі грубого очищення, виконаному із набору металевих сіток (ФГО-2). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю $E = 80\%$, затримуються частинки діаметром більше 50 мкм.

ДР 1.3. Компресування повітря

Для забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в інокуляторах та ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря стискають у компресорі (К-3), відбувається нагрівання до 120-200 °С, тиск становить 0,35 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря (від ДР 1.3) необхідно охолодити в теплообміннику (ТО-4) до температури 25-30 °С для видалення надлишкової вологи. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де усуваються пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря з ресивера Р-5 надходить на наступну фільтрацію. Внаслідок ризику утворення конденсаційної пари на наступних етапах, повітря слід його підігріти. Підігрів здійснюють в теплообміннику-нагрівачі ТН-6. Температура повітря становитиме 32-35°С.

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Литвин А.В.</i>			РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		<i>Удимович В.М.</i>					57	87
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						

Незначне перевищення температури нагрівання повітря дозволяє компенсувати його втрати при надходженні його до відповідного обладнання.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Підігріте повітря поступає до головного фільтру Ф-7 на основі скловолкна та голкопробивних волокон. На виході з даного фільтра ступінь очищення складає близько $E = 96 \%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

На цій стадії повітря поступає до фільтрів стисненого повітря Ф-24, Ф-26, Ф-28, Ф-44, Ф-46, Ф-48 класу М. Вказані фільтри встановлюють перед ферментаційним обладнанням з розрахунку один фільтр на кожну одиницю обладнання. Ступінь очищення 99,999 [39].

ДР 2. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

ДР 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 85,5 г D-сорбіту та 5,7 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1000 мл, мірним циліндром на 500 мл додають (доливають) 350 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 850,5 г D-сорбіту та 56,7 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у реактор-змішувач на 10 л (РЗ-8), додають 5100 мл питної води і включають перемішуючий пристрій. Далі композицію стерилізують при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв.

Простерилізована композиція А охолоджується та передається самоплином до інокулятора ІН-10 обсягом 10 л (до ТП 5.1.5).

ДР 2.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

ДР 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 6952,5 г D-сорбіту а також 463,5 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають до реактора на 50 л (РЗ-11), додають 41,715 л питної води і включають перемішуючий пристрій. Далі композицію стерилізують при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв.

ДР 2.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу у ферментері об'ємом 630 л.

ДР 2.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 16860 кг D-сорбіту та 4,215 кг дріжджового екстракту. Наважки поміщають у реактор- змішувач на 500 л (РЗ-14), по трубопроводу додають 379,35 л води питної і включають перемішуючий пристрій. Далі композицію стерилізують при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв.

ДР 3. Приготування і стерилізація розчину D-сорбіту для підживлення

У процесі біосинтезу, починаючи з 4-ої год культивування, вносять 110 г/л D-сорбіту. Розчин D-сорбіту готують та стерилізують в окремому апараті.

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину D-сорбіту

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор-змішувач на 250 л (РЗ-16) додають 46,37 кг D-сорбіту. По трубопроводу додають 116 л питної води і включають перемішуючий пристрій. Далі композицію стерилізують при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа, упродовж 30 хв.

Простерилізований розчин D-сорбіту охолоджується та перекачується за допомогою насосу (НВ-17) у ферментер (ФР-19) обсягом 630 л (до ТП 6.1).

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Культуру мікроорганізму *Glucanobacter oxydans* зберігають у 3 флаконах, що містять середовища МПА підтримують при температурі +2...+4 °С і роблять

пересіви кожні 2-3 місяців. Всі роботи з культурою бактерій проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру від *ТП 5.1.1* методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з МПА для одержання ізольованих колоній. Культивують в термостаті 48 год при $t = 30^{\circ}\text{C}$.

ТП 4.3. Вирощування інокуляту на агаризованих середовищах

Робочу культуру від *ТП 5.1.2*, що з чашок Петрі з середовищем МПА, пересівають в пробірку з середовищем МПА того ж складу та інкубують 48 годин при температурі 30°C .

ТП 4.4. Вирощування культури в колбах на качалках

У флакон з робочою культурою, вирощеною на МПА, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і в асептичних умовах переносять у качалочні колби (5 шт) де вже міститься поживне середовище (від ДР 2.1.1). Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з одного флакона. Бактерії вирощують у колбах на качалці (200 об/хв) упродовж 16 год.

ТП 4.5. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 10 л

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор (ІН-10) об'ємом 10 л в асептичних умовах через засівну колбу вносять композицію А (від ДР 3.2.1) та подають посівний матеріал (через засівну колбу від *ТП 5.1.4*). Температура культивування 30°C , швидкість перемішування становить 200 об/хв, витрати повітря 0,5 л/л·хв. Тривалість культивування становить 16 год.

Періодично (кожні 2-4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення рівня накопичення L-сорбози.

ТП 4.6. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 100 л

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор (ІН-13) об'ємом 100 л вносять самоплином композицію А (від ДР 3.3.1) та

подають посівний матеріал (через трубу перетискування від *ТП 5.1.5*). Температура культивування 30 °С, швидкість перемішування становить 500 об/хв, витрати повітря 0,5 л/л·хв. Тривалість культивування становить 16 год.

Періодично (кожні 2-4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення рівня накопичення L-сорбози.

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез у ферментері 630 л.

Для біосинтезу у попередньо простерилізований ферментер (ФР-19) об'ємом 630 л вносять композицію А (від *ДР 2.4*) та подають посівний матеріал *G. oxudans* (через трубу перетискування від *ТП 4.6*). Через 4 год від початку виробничого культивування додають підживлюючий розчин D-сорбіту (від *ДР 3.1*). Температура культивування 30 °С, швидкість перемішування становить 200 об/хв, витрати повітря 0,5 л/л·хв. Тривалість культивування становить 16 год до концентрації L-сорбози (як попередника аскорбінової кислоти) 144,5 г/л.

Періодично (кожні 2-4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

В кінці процесу біосинтезу одержану культуральну рідину за допомогою насоса подають до збірника для подальших стадій обробки.

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ

Згідно із результатами представленими у роботі [1], L-сорбозу у кількості 144,5 г/л виділяють із культуральної рідини після вирощування штаму *Gluconobacter oxydans* WSH-003. Технологія отримання аскорбінової килоти описана у статті [59].

Першим етапом виділення є відділення супернатанту від біомаси *G. oxydans* за допомогою фільтрації через мікрофільтр. Приблизно 1% супернатанту втрачається на цьому етапі. Далі супернатант знебарвлюють активованим вугіллям, фільтрують (двічі) на фільтр-пресі [60].

На наступному етапі, відфільтрований супернатант перекачується у ферментер, де за допомогою, наприклад *Pseudogluconobacter Saccharoetogenes* культивується протягом 72 годин для отримання натрієвої солі кето-глюконової кислоти. Конверсія L-сорбози (попередник аскорбінової кислоти) в сіль натрію кето-глюконової кислоти становить 76%. Після закінчення культивування, відбувається повторна фільтрація за допомогою мікрофільтра. Приблизно 1% розчину втрачається під час фільтрації.

На наступному етапі відбувається відновлення 2-кето-глюконової кислоти (2-KLG) з кето-глюконової кислоти натрію, за допомогою біполярного мембранного електродіалізу шляхом обміну катіонів та аніонів з молекулами води [59].

Відновлену 2-KLG подають у випарник для видалення води, перед подачею у резервуарний реактор безперервної дії з перемішуванням. У резервуарному реакторі безперервної дії 2-KLG піддається процесу етерифікації метанолом при 64 °C для отримання метилглюконату. Перед реакцією утворення метилглюконату з карбонатом натрію в 2-KLG охолоджують до 30 °C за допомогою охолоджувача [24].

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Литвин А.В.			РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ АСКОРБІ- НОВОЇ КИСЛОТИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Удимович В.М.					62	87
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Отриманий метилглюконат реагує з карбонатом натрію з утворенням аскорбату натрію. Потім аскорбат натрію подають на біполярний мембранний електродіаліз для відновлення аскорбінової кислоти. Вода, що утворюється в реакторі, випаровується у вакуумному випарнику.

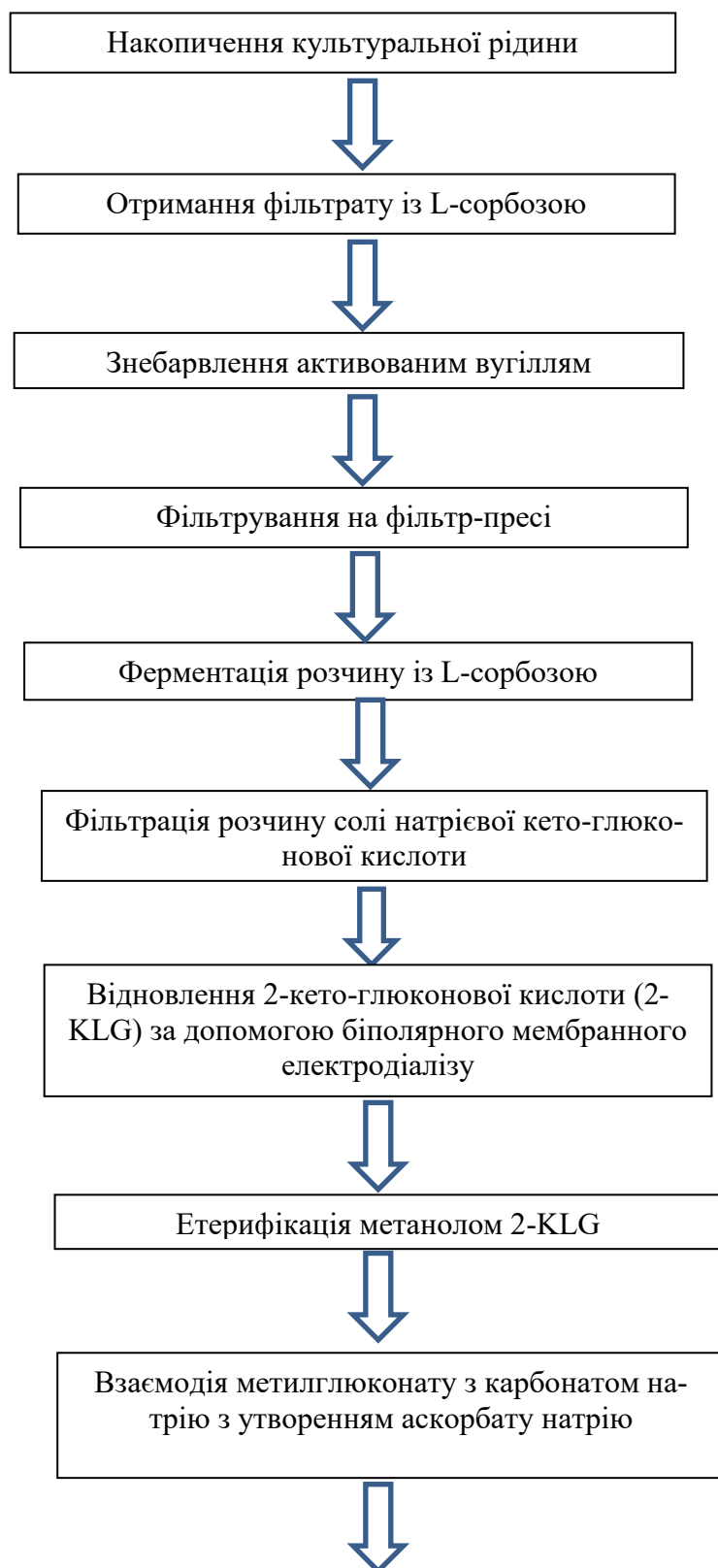
Утворена аскорбінова кислота охолоджується з метою кристалізації протягом 54 год при 4 °С. Отримані кристали аскорбінової кислоти ліофілізують у сублимаційній сушарці до температури -35 °С з метою видалення залишків води.

Оскільки оптимальна температура зберігання твердої аскорбінової кислоти становить 4 °С, кристали повторно підігрівають перед подачею в емність для зберігання [59].

Таким чином процес отримання можна розділити на такі етапи:

- 1) накопичення культуральної рідини;
- 2) отримання фільтрату супернатанту, що містить L-сорбозу;
- 3) супернатант знебарвлюють активованим вугіллям;
- 4) знебарвлений супернатант фільтрують (двічі) на фільтр-пресі;
- 5) ферментація розчину із L-сорбозою за допомогою підходящого штаму мікроорганізмів (наприклад *Pseudoglyconobacter Saccharoketogenes*), для отримання солі натрієвої кето-глюконової кислоти;
- 6) фільтрація розчину солі натрієвої кето-глюконової кислоти через мікрофільтр;
- 7) відновлення 2-кето-глюконової кислоти (2-KLG) з кето-глюконової кислоти натрію, за допомогою біполярного мембранного електродіалізу;
- 8) видалення надлишку рідини осушенням 2-KLG;
- 9) охолодження 2-KLG до 30 °С;
- 10) етерифікація метанолом 2-KLG з метою отримання метилглюконату;
- 11) взаємодія метилглюконату з карбонатом натрію з утворенням аскорбату натрію;
- 12) відновлення аскорбінової кислоти, шляхом біполярного мембранного електродіалізу аскорбату натрію;

- 13) випарювання надлишку вологи із аскорбінової кислоти вакуумному випарнику;
- 14) кристалізація аскорбінової кислоти (54 год при 4 °С);
- 15) ліофільна сушка кристалів аскорбінової кислоти у сублімаційній сушарці (-35 °С) протягом 3-5 годин;
- 16) зберігання порошку аскорбінової кислоти при 4 °С.



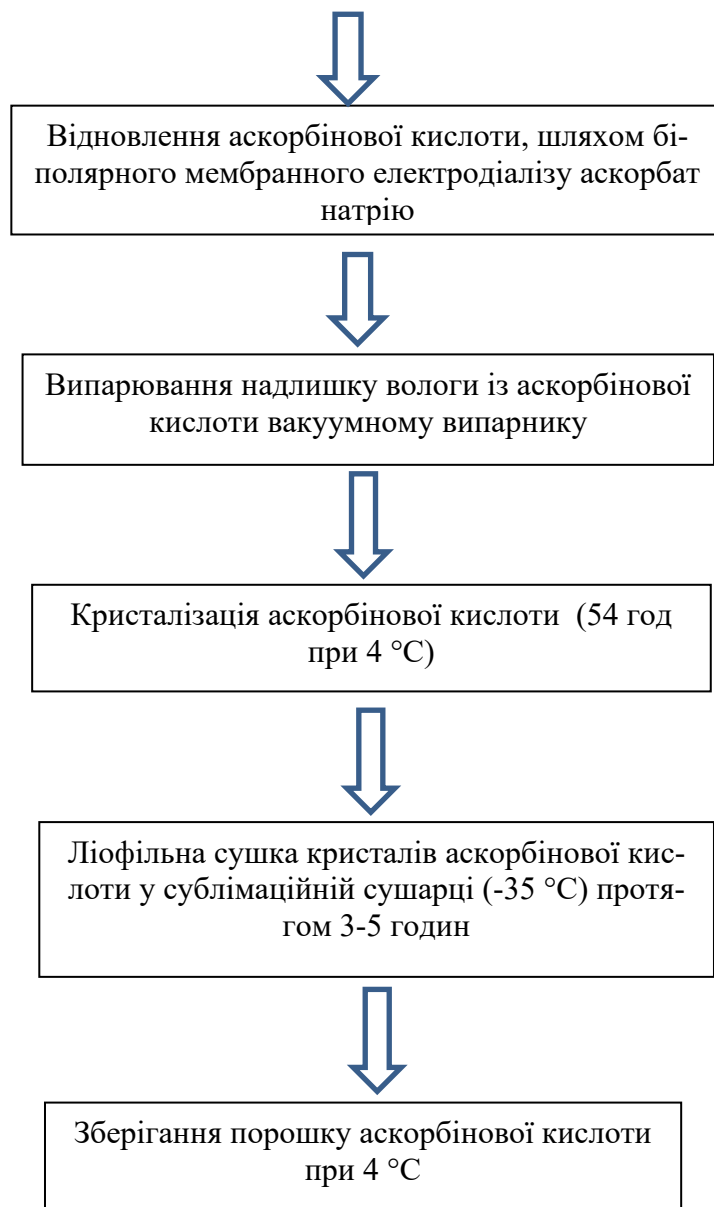


Рис 8.1. Схематичне зображення процесу виділення і очищення аскорбінової кислоти

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль у виробництві L-сорбози (як попередника аскорбінової кислоти) за допомогою *G. oxydans* WSH-003 відіграє вирішальну роль у забезпеченні чистоти, виходу та безпеки процесу біосинтезу.

Мікробіологічний контроль чистоти культури та поживного середовища здійснюється двома методами: прямим висівом на поживні середовища та мікроскопіюванням.

Метод прямого висіву. Стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл зразка поживного середовища та наносять на поверхню чашки Петрі з: м'ясо–пептонним агаром (МПА) - для виявлення бактерій; сусло–агаром (СА) – для виявлення грибів та дріжджів. Пробу рівномірно розподіляють за допомогою шпателя Дригальського на поверхні середовища. Чашки з посівами загортають у папір, поміщають у термостат та інкубують при температурі 32-34 °С (1-2 доби) - для МПА; при температурі 24-26 °С (3-5 діб) - для СА. Після інкубації не повинно спостерігатися розвитку сторонніх мікроорганізмів.

При аналізі посівного матеріалу методика така сама, але як проба буде культуральна рідина. На середовищі сусло–агару колоній не повинно бути. На поживному середовищі з м'ясо–пептонним агаром мають рости бактерії *G. oxydans* - круглі колонії (діаметр 3 мм), опуклі, білого, жовтуватого або коричневого кольору (залежно від віку), з рівними краями (*рис.9.1*) [62].

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		<i>Литвин А.В.</i>			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		<i>Удимович В.М.</i>				66	87
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>					
					РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		



Рис. 9.1. Ріст *G. oxydans* на поживному середовищі.

Мікроскопіювання. Дослідження проводять за допомогою світлового мікроскопа з імерсійною системою. Приготування мазка: на чисте знежирене предметне скло стерильною петлею наносять невелику кількість культуральної рідини. Краплю (з мікроорганізми) розподіляють тонким шаром по склу за допомогою бактеріальної петлі. Мазок підсушують при кімнатній температурі до повного висихання. Фіксація та імерсійна обробка: на повністю сухий препарат скляною паличкою наносять 1–2 краплини імерсійного масла. Завершення роботи: після мікроскопії з імерсійного об’єктиву етиловим спиртом прибирають залишки масла [63].

При аналізі чистого посівного матеріалу (за відсутності контамінації) *G. oxydans* WSH-003 у препараті спостерігають: морфологію клітин – паличкоподібні бактерії, рухомі (завдяки полярним джгутикам) або нерухомі; спороутворення - ендоспори відсутні; реакція на фарбування за Грамом - негативна (знебарвлюються в синій колір після промивки спиртом, а при додатковій обробці кристал-фіолетом забарвлюються у червоний колір); розміри клітин - довжина 0,9–4,2 мкм, ширина 0,5–0,8 мкм (рис. 9.2) [12].

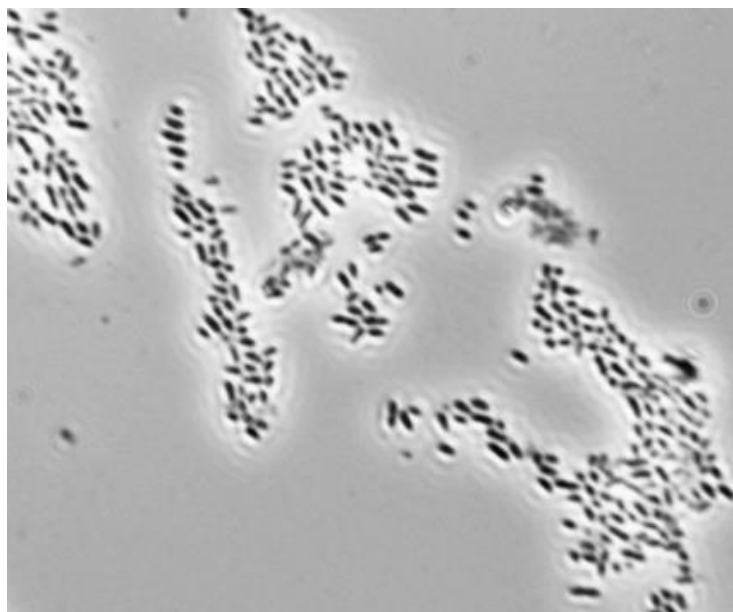


Рис. 9.2. Клітини *G. oxydans* під світловим мікроскопом.

9.2. Визначення концентрації L-сорбози

Для аналізу концентрації L-сорбози у супернатанті використовують метод ВЕРХ. Підготовка пробірки: відбирають 100 мл культуральної рідини, яку попередньо ретельно перемішують; поміщають рідину в центрифужну пробірку. Перше центрифугування: пробірки центрифугують при 10 000 об/хв протягом 3-5 хвилин; після центрифугування надосадову рідину обережно зливають. Промивання осаду: осад промивають підкисленою водою (1 мл концентрованої HCl на 1 л води); проводять повторне центрифугування за тих же умов (10 000 об/хв). Відбір супернатанту: відразу після зупинки центрифуги відбирають супернатант, дотримуючись обережності, щоб уникнути потрапляння осаду.

Підготовка проби: відібраний 1 мл супернатанту розводять у необхідному співвідношенні методом послідовного подвійного розведення та отриманий розчин фільтрують через мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм для видалення можливих твердих частинок. Визначення концентрації L-сорбози (попередника аскорбінової кислоти) проводять методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Аналітичні умови: дослідження проводять на хроматографі Agilent 1100 series (Santa Clara, CA, США); використовують аналітичну колонку Aminex HPLC-87H (300 × 7,8 мм; Bio-Rad, Hercules, CA, USA); температуру колонки підтримують на рівні 35°C; як рухома фаза (елюент) застосовують 5 мМ розчин

сірчаної кислоти (H_2SO_4) з швидкістю потоку 0,6 мл/хв. Калібрування та аналіз: для калібрування використовують стандартний розчин L-сорбози; визначення концентрації проводять шляхом порівняння отриманих піків з калібрувальною кривою [1].

9.2.1. Концентрація біомаси

Біомасу визначають методом вимірювання оптичної густини клітинної суспензії. Приготування проб: до лабораторних пробірок додають 9 мл дистильованої води та 1 мл культуральної рідини; пробірки інтенсивно струшують для отримання однорідної клітинної суспензії. Вимірювання оптичної густини: підготовлену суміш переливають у спектрофотометричні кювети; вимірювання проводять на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 600 нм; перед аналізом прилад калібрують за нульовим розчином (дистильована вода). Розрахунок біомаси: отримані значення оптичної густини перераховують на концентрацію сухої біомаси; для перерахунку використовують попередньо побудований калібрувальний графік [1].

9.2.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту

Концентрацію D-сорбіту визначають у супернатанті методом ВЕРХ. Підготовка проб: Відібрану культуральну рідину (100 мл) ретельно перемішують. Центрифугують при 10000 об/хв протягом 3-5 хвилин. Осад промивають підкисленою водою (1 мл $\text{HCl}/\text{л H}_2\text{O}$) і повторно центрифугують. Чітко відділяють супернатант, уникаючи потрапляння осаду. Підготовка до аналізу: 1 мл супернатанту послідовно розводять. Фільтрують через мембранний фільтр 0,45 мкм. Умови аналізу: Хроматограф Agilent 1100 series (Santa Clara, CA, США). Колонка Aminex HPLC-87H (300 x 7,8 мм; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Температура колонки 35°C. Рухома фаза 5 мМ H_2SO_4 , швидкість 0,6 мл/хв. Розчин порівняння є розчин D-сорбіт [1].

Концентрацію амінного азоту визначають формольним титруванням [64]. Підготовка проб: Відфільтровують супернатант через мембрану 0,22 мкм.

Відбирають 2-10 мл, доводять до 20 мл водою. Додають 5 крапель бромтимолового синього.

Нейтралізація: При лужному середовищі (синій колір) титрують 0,05 н HCl до жовтувато-зеленого кольору (рН 7,0). При кислому середовищі (жовтий колір) титрують 0,05 н NaOH до того ж кольору. Порівнюють з еталоном рН 7,0.

Титрування: Додають 2 мл формаліну. Титрують 0,005 н NaOH до появи стійкого синьо-фіолетового кольору. Враховують точку, коли з'являється перша надлишкова крапля лугу.

Контрольний експеримент: Проводять аналогічне титрування дистильованої води. Умови повністю ідентичні основним дослідом [64].

9.3. Карта постадійного контролю

Таблиця 9.1.

Карта контрольних точок виробництва аскорбінової кислоти

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
1	2	3	4	5
<i>Кт 1.1. Забір атмосферного повітря</i>	Повітрязабірник Висота забору повітря	-	Під час забору повітря	H = 20 м
<i>Кт 1.2. Очищення від грубих домішок</i>	Повітря на виході з фільтра грубого очищення Ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80%
<i>Кт 1.3. Компресування повітря</i>	Стиснене повітря Тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресування повітря	P = 0,35 Мпа, t = 120 - 200°C
<i>Кт.1.4. Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Охолоджене повітря Температура, вологість	Термометр, психрометр	Після охолодження повітря	t = 25 - 30°C, W = 60-70%
<i>Кт.1.5. Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура	Термометр	Після нагрівання повітря	t = 32 - 35°C
<i>Кт.1.6. Очищення повітря в головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головному фільтрі	E = 96%, тиск згідно паспорту

<i>Кт.1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки в індивідуальному фільтрі	E = 99,99%
<i>Кт, Км 2.1.1.1, 2.2.1, 2.3.1, 2.4.1, 3.2.1.1, 3.2.2.1, 3.2.3.1, 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, мікробіологічна чистота	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначаються безперервно під час стерилізації. Мікробіологічний контроль після стерилізації.	P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
<i>Кт, Км 3.1. Приготування та стерилізація розчину D-сорбіту</i>	Розчин D-сорбіту Тиск, температура, час, мікробіологічна чистота	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначаються безперервно під час стерилізації. Мікробіологічний контроль після стерилізації.	P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
<i>Кт, Км 4.1. Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Gluconobacter oxydans</i> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, температура.	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 2-3 місяці.	t = +2...+4 °С, τ = 2-3 міс, відсутність сторонньої мікробіоти
<i>Кт, Км 4.2. Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>Gluconobacter oxydans</i> Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури.	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 12 годин.	t = 30 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти

<i>Kt, Km</i> 4.3. Вирощування інокуляту на агаризованих середовищах	Робоча культура <i>Glucanobacter oxydans</i> Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури.	Термометр, годинник мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 12 годин.	t = 30 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
<i>Kt, Km, Kx</i> 4.4. Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання (автоматично). Мікробіологічний контроль кожні 4-6 години.	t = 30 °С, τ = 16 год, n = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
<i>Kt, Km, Kx</i> 4.5. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, тахометр, рН метр, мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Температура, швидкість обертання, рівень рН (автоматично). Мікробіологічний контроль кожні 2-4 години.	t = 30 °С, τ = 16 год, n = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
<i>Kt, Km, Kx</i> 4.6. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 100 л	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, тахометр, рН метр, мікробіологічний контроль, мікроскопіювання	Температура, швидкість обертання, рівень рН (автоматично). Мікробіологічний контроль кожні 2-4 години.	t = 30 °С, τ = 16 год, n = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
<i>Kt, Kx, Km</i> 5.1. Виробничий біосинтез у ферментері 630 л	Культуральна рідина Температура, час, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота, концентрація 2-КГЛ	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення, мікроскоп, ВЕРХ, мікробіологічний контроль	Температура, швидкість обертання, рівень рН та піни (автоматично). Мікробіологічний контроль кожні 2-4 години	t = 30 °С, τ = 36 год, рН = 7,0, n = 500 об/хв, C _{2-КГЛ} = 76,6 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

ЛІТЕРАТУРА

1. Hu Y., Wan H., Li J., Zhou J.. Enhanced production of l-sorbose in an industrial *Gluconobacter oxydans* strain by identification of a strong promoter based on proteomics analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(7), 1039–1047. doi:10.1007/s10295-015-1624-7
2. Лобанок А.Г. Биотехнологии —признак современности и прогресса. Наука и инновации. 2006, № 11 (45): 27-30
3. Шмид Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. М.: Бином. Лаборатория знаний. 2014, №20(14): 60-61.
4. Johnston C. S., Steinberg F.M., Rucker R.B. Ascorbic Acid. In: Handbook of vitamins (ed. Rucker R.B., Suttie J.W., McCormick D.B., Machlin L.J.). Marcel Dekker AG. 2001: 529–554.
5. Артюшенко Т.А. Аскорбінова кислота в рослин: метаболізм і функції. *Екологічний вісник Запоріжжя*. 2021, 6: 13-32. doi: 0.31812/eco-bulletin-krd.v6i0.
6. Після 5 років досліджень професор Чарлз Глен Кінг виділив вітамін С [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://nubip.edu.ua/en/node/59057>
7. Аскорбінова кислота користь [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://standre.com.ua/askorbinovaya-kislota-polza/>
8. Wang P., Zeng W., Xu S., Du G., Zhou J., Chen J. Current challenges facing one-step production of l -ascorbic acid. *Biotechnology Advances*. 2018, 15, 36 (7): 1882-1899. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.07.006.
9. Olmedo J.M., Yiannias J.A., Windgassen E.B., Gornet M.K. Scurvy: a disease almost forgotten. *International Journal of Dermatology*. 2006, 45(8): 909-913. doi: 10.1111/j.1365-4632.2006.02844.x.
10. Arrigoni O., De Tullio M.C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002: 1569. doi: 10.1016/s0304-4165(01)00235-5.
11. Аскорбінова кислота драже по 0.05 г №160 в конт. (бан.) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tab-letki.ua/%D0%90%D1%81%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B1%D0%B8%D0%BD%D0%>

[BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F-
%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0/12483/](https://tabletki.ua/%D0%B2%D0%B0%D1%8F-%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0/12483/)

12. Аскорбінова кислота розчин д/ін. 50 мг/мл по 2 мл №10 в амп. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

[https://tabletki.ua/%D0%90%D1%81%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B1%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F-
%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0/1680/](https://tabletki.ua/%D0%90%D1%81%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B1%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F-%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0/1680/)

13. Аскорбінка-КВ таблетки зі смаком полуниці. по 25 мг №10 в етикет. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/%D0%90%D1%81%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B1%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B0-%D0%9A%D0%92/2989/>

14. Аскорбінова кислота таблетки по 25 мг №50 в конт. [Електронний ресурс].

Режим доступу:

[https://tabletki.ua/%D0%90%D1%81%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B1%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F-
%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0/8267/](https://tabletki.ua/%D0%90%D1%81%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B1%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F-%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0/8267/)

15. Аскорбінова кислота розчин д/ін. 50 мг/мл по 2 мл №10 в амп. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

[https://tabletki.ua/%D0%90%D1%81%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B1%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F-
%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0/22794/](https://tabletki.ua/%D0%90%D1%81%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B1%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F-%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0/22794/)

16. Аскоцин® таблетки жувальні стрип, №30 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/261755/135119/>

17. Вітамін С таблетки жувальні 500 мг блістер, №56 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/338398/450116/>

18. da Silva G. A. R., Oliveira S. S. D. S., Lima S. F., do Nascimento R. P., Baptista A. R. D. S., Fiaux S. B. The industrial versatility of *Gluconobacter oxydans*: Current applications and future perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022, 38 (8): 134. doi: 10.1007/s11274-022-03310-8.

19. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. Київ, НУХТ. 2009. 336 с.

20. Kim J.N., Choo J.S., Wee Y.J., Yun J.S., Ryu H.W. Culture Medium Optimization for Acetic Acid Production by a Persimmon Vinegar-Derived Bacterium. Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2005, 861–869. doi:10.1007/978-1-59259-991-2_73
21. Azar S. A. D., Alemzadeh I. L-Sorbose Production by *Gluconobacter oxydans* using Submerged Fermentation in a Bench Scale Fermenter. *APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY*, 2020, 7 (1):41-48.
22. Kim T.-S., Gao H. , Li J., Kalia V. C., Muthusamy K., Sohng J. K., Kim I.-W., Lee J.-K. Overcoming NADPH product inhibition improves D-sorbitol conversion to L-sorbose. *Sci Rep.* 2019 28;9(1):815. doi: 10.1038/s41598-018-37401-0.
23. Dwivedi M. Beneficial Microbes in Agro-Ecology. Bacteria and Fungi. Chapter 25 *Gluconobacter* 2020, Pages 521-544.
24. Lykkesfeldt J., Michels A. J., Frei B.. Vitamin C. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 2014, 5(1), 16–18. <https://doi.org/10.3945/an.113.005157>.
25. Gęgotek A., Skrzydlewska E.. Ascorbic acid as antioxidant. *Vitamins and hormones*, 2023, 121, 247–270. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.10.008>.
26. Carr A. C., Maggini S. Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*, 2017, 9(11), 1211. <https://doi.org/10.3390/nu9111211>.
27. Maity, J., Majumder, S., Pal, R., Saha, B., & Mukhopadhyay, P. K. (2023). Ascorbic acid modulates immune responses through Jumonji-C domain containing histone demethylases and Ten eleven translocation (TET) methylcytosine dioxygenase. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 45(11), e2300035. <https://doi.org/10.1002/bies.202300035>.
28. Шульга О. К. Маркер загального стану здоров'я людини – вітамін "С" / О. К. Шульга, Т. А. Петухова, Г. М. Моїсеєва, А. С. Рижих // Молодий вчений. - 2018. - № 2(1). - С. 56-62.
29. Клінічні рекомендації з діагностики, лікування та профілактики ГРВІ у дітей раннього віку : навчальний посібник / С. О. Мокія-Сербіна, Н. В. Василенко, Т. В. Литвинова, В. А. Шелевицька ; ДЗ «Дніпропетровська медична академія

- МОЗ України» ; МОЗ України. – 2-е вид., стереотип. – Кривий Ріг : Вид. Р. А. Козлов, 2015. – 158 с.
30. Ситуаційний аналіз становища дітей в Україні 2024. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
https://www.unicef.org/ukraine/en/media/49196/file/UNICEF_SitAn_2024_UKR.pdf.pdf
31. Вітамін С натуральний для дітей таблетки д/рассас. №10 [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://tabletki.ua/uk/%D0%92%D0%B8%D1%82%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD-%D0%A1-%D0%BD%D0%B0%D1%82%D1%83%D1%80%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%8B%D0%B9-%D0%B4%D0%BB%D1%8F-%D0%B4%D0%B5%D1%82%D0%B5%D0%B9/1024400/>
32. Pappenberger G., Hohmann H.-P. Industrial Production of l-Ascorbic Acid (Vitamin C) and d-Isoascorbic Acid. *Biotechnology of Food and Feed Additives*, 2013, 143–188. doi:10.1007/10_2013_243
33. Wang E.-X., Ding M.-Z., Ma Q., Dong X.-T., Yuan Y.-J. Reorganization of a synthetic microbial consortium for one-step vitamin C fermentation. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1). doi:10.1186/s12934-016-0418-6
34. FRUCTOSE AND MANNOSE METABOLISM. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/gox00051>.
35. GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/gox00010>
36. Citrate cycle (TCA cycle). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/gox00020>
37. Pappenberger G., & Hohmann, H.-P. Industrial Production of l-Ascorbic Acid (Vitamin C) and d-Isoascorbic Acid. *Biotechnology of Food and Feed Additives*, 2013, 143–188. doi:10.1007/10_2013_243
38. Hommel R. K., Ahnert P. Gluconobacter Oxydans. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 1999. <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and->

microbiology/gluconobacter-oxydans

39. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
40. Wang E.-X., Ding M.-Z., Ma Q., Dong X.-T., Yuan Y.-J.. Reorganization of a synthetic microbial consortium for one-step vitamin C fermentation. *Microbial Cell Factories*, 2016 15(1). doi:10.1186/s12934-016-0418-6
41. Засіб мийний LIV актив 119. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kwant.com.ua/profesijna-khimiya-koncentrati/53-zasib-mijnij-luzhnij-iz-ponizhenim-pinoutvorennyam-z-antibakterialnim-efektom-liv-aktiv-114-5-1.html>
42. Засіб мийний LIV актив 331. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kwant.com.ua/profesijna-khimiya-koncentrati/49-zasib-mijnij-kislotnij-pinnij-z-antibakterialnimi-efektom-liv-aktiv-331-201.html>
43. ПРАЙМДЕЗИМ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/instruktsiia-dlia-zastosuvannia-dezinfektsiinoho-zasobu-praimdezym/>
44. Бациліквід Стерил [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.danamedikal.com/bazilikvidsteril>
45. Air Inlet Louvres Series LUE-FW [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.galventilation.com/upload/en/datasheet_lue_fw.pdf?utm_source=Website&utm_medium=Download&utm_campaign=datasheet_lue_fw.pdf
46. ФЯР фільтр грубого очищення повітря [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.luftgrand.com.ua/product-page/%D1%84%D1%8F%D1%80-%D1%84%D1%96%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80-%D0%BF%D0%BE%D0%B2%D1%96%D1%82%D1%80%D1%8F-%D1%81%D1%96%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%B9>
47. Компресори низького тиску (3 бар, 7000 л/хв) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresory-nyzkogo-tysku/>
48. Теплообмінник для теплової обробки газів та повітря [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ankort.com/ua/katalog/teploobmenniki-dlya-teplovoj-obrabort/>

- 49.Ресивер Повітряний Лідер 10 бар 2700 к. с. PB2700.1200.01 для компресора (020936) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-10-bar-2700-l-rv2700120001-dlya-kompressora/>
- 50.Фільтри очищення газів ФСВ-П, ФСВ-О, ФСВ-Т [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kms-market.com.ua/ua/p107377496-filtry-ochistki-gazov.html>
- 51.Реактор лабораторий 250 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://stprom.com.ua/ua/p1719804126-himicheskij-reaktor-250.html>
- 52.Реактор лабораторий 500 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://stprom.com.ua/ua/p1719401925-reaktor-laboratornyj-500.html>
- 53.Фільтри стисненого повітря AF Німеччина, Фільтр магістральний компресора [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://k-m-s.all.biz/uk/filtry-stysnenogo-povitrya-af-nimechchyna-filtr-g15274387?utm_currency=UAH&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=shopping_ua_personal&utm_content=123279&gclid=CjwKCAjw68K4BhAuEiwAylp3kl8GDvtQoWnsDSpSKAHFBeccDS337efpfArbXzfUJJ9rnRVA G2MFthoCtAIQAvD_BwE
- 54.Stainless steel bioreactors to meet your every need. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://reseabiotec.ch/our-products/stainless-steel-bioreactors>
- 55.Big Pilot-Scale 100L Glass Reactor Jacket Bioreactor. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://njningkai.en.made-in-china.com/product/oxsrbiqHCWcU/China-Big-Pilot-Scale-100L-Glass-Reactor-Jacket-Bioreactor.html?header_search_page=lv&pv_id=1ig5alrdh885&faw_id=1ig5ci0cf435
- 56.WLT Horizontal Cooling Tower Pipeline Pump [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.evokerpump.com/en-us/industrialpump_17/27.html
- 57.Industrial-scale bioreactor 500-1000L [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-500-1000l/>
- 58.Реактор гомогенізатор 50л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://khimmix.ua/ua/himicheskije-reaktory/reaktor-gomogenizator-40l>

59. Lim Sh. M., Lau M. S. Li, Tiong E. J., Goon M. M., Lau R. J. Ch., Yeo W. S., Lau S. Y., Mubarak N. M. Process design and economic studies of two-step fermentation for production of ascorbic acid. *Springer Nature Switzerland AG*. 2020, Volume 2, article number 816.
60. Буценко, Л. М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів : навчальний посібник для студ. вузів, які навч. за напрямом підготовки "Біотехнологія" / Л. М. Буценко, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог. - К. : НУХТ, 2010. - 323 с.
61. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. Освіт. Ступ. "бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с
62. Olijve W., Kok J.J. Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Achives of Microbiol.* 1979, 121:283-290. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/bacteria/gluconobacter-oxydans>
63. Корнієнко І.М. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни "Промислова та екологічна біотехнологія" для студентів очної форми навчання та після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 51 с.
64. Майборода О.І., Салюк А.І., Ковальова С.О. Біохімія: лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «Бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної та заочної форм навчання. 2020, К.: НУХТ. с. 21-23

ДОДАТКИ

KEGG Fructose and mannose metabolism - *Gluconobacter oxydans* 621H

[Pathway menu | Organism group | Pathway entry | Download | Help]

Change pathway type

▼ Option

Scale:

▼ Search

Go

▼ ID search

Go

▼ Color

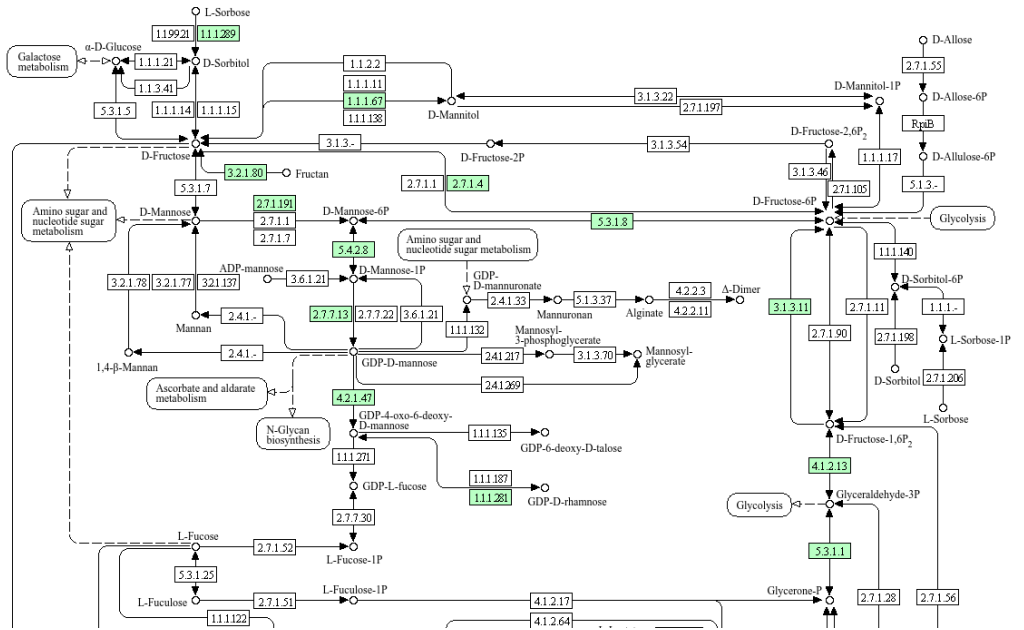
▼ Module

Complete All

Pathway modules

- Carbohydrate metabolism
- Central carbohydrate metab
- M00307 Pyruvate oxidatio
- M00010 Citrate cycle, first

FRUCTOSE AND MANNOSE METABOLISM



KEGG Citrate cycle (TCA cycle) - *Gluconobacter oxydans* 621H

[Pathway menu | Organism group | Pathway entry | Show description | Download | Help]

Change pathway type

▼ Option

Scale:

▼ Search

Go

▼ ID search

Go

▼ Color

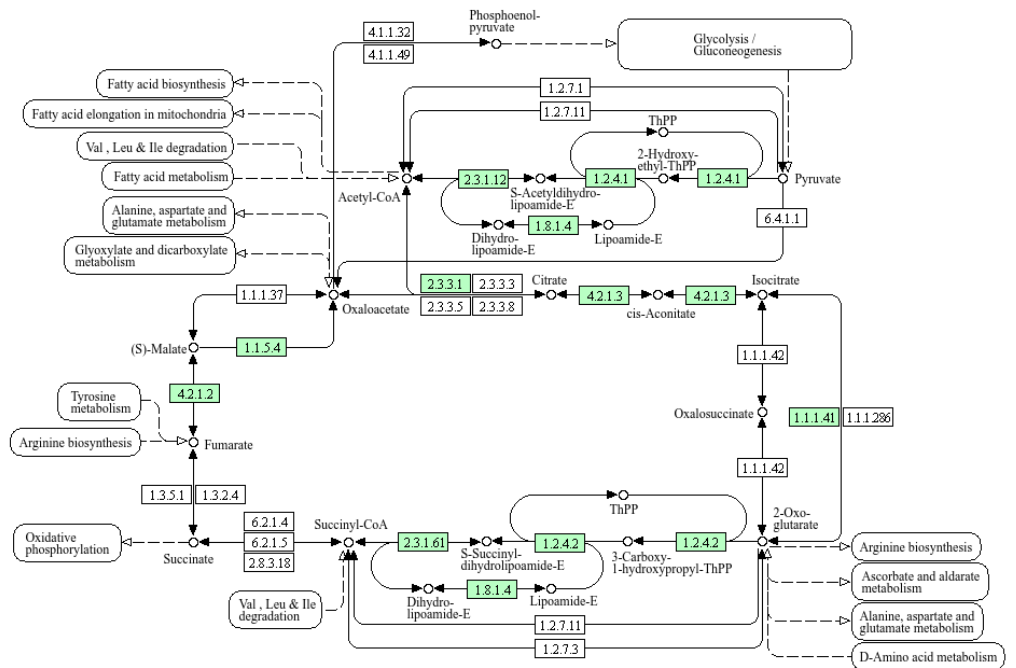
▼ Module

Complete All

Pathway modules

- Carbohydrate metabolism
- Central carbohydrate metab
- M00307 Pyruvate oxidatio
- M00010 Citrate cycle, first

CITRATE CYCLE (TCA CYCLE)



Change pathway type

Option

Scale: 100%

Search

ID search

Color

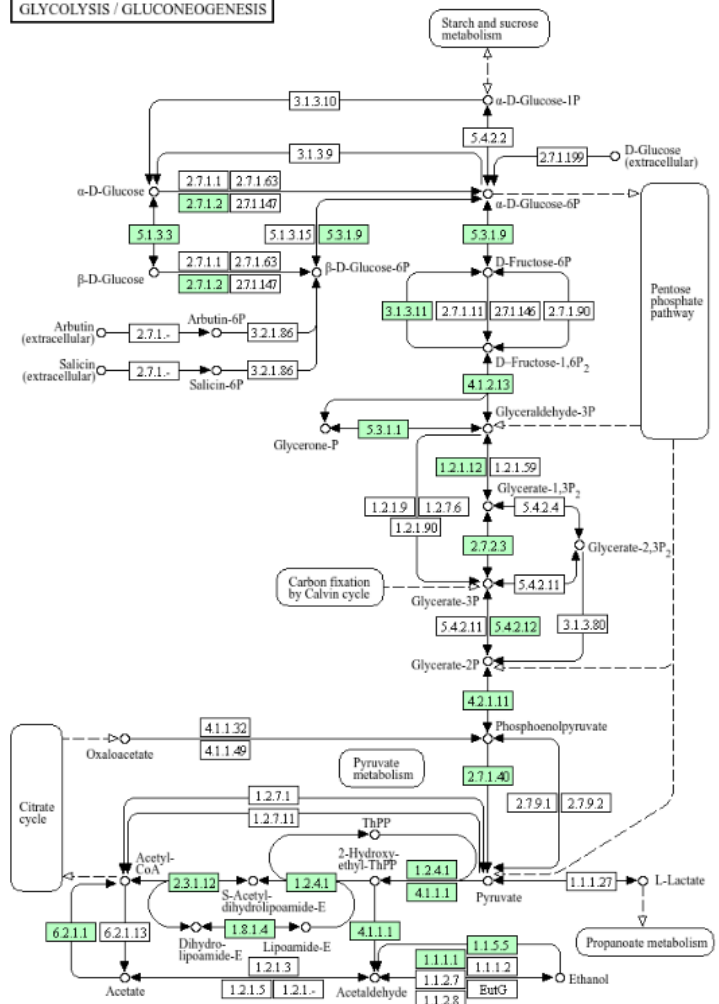
Module

Complete All

Pathway modules

- Carbohydrate metabolism
 - Central carbohydrate metab
 - M00002 Glycolysis, core r
 - M00307 Pyruvate oxidatio

GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS



oxydans_gdh were compared and eventually it was shown that the former was better when they were applied to improve the gene expression level of membrane-bound *ga5dh*, which catalyzes the conversion of glucose to 5-keto-D-gluconic acid [21]. Recently, a new promoter called $P_{ghp0169}$ was isolated from the chromosome of *G. oxydans* DSM 2003 and characterized by Shi et al. [34]. Compared with the strong $P_{G. oxydans_tufB}$ promoter, $P_{ghp0169}$ exhibited even stronger promoter activity when it was evaluated with a GFP protein and a membrane-bound type II NADH dehydrogenase [32].

Most previous studies have mainly focused on promoters of known genes with high transcription levels, such as *tufB* coding for elongation factor Tu and *gdh* for glucose dehydrogenase [18, 21], which largely limited broad screening for new promoters. More comprehensive techniques, such as proteomics analysis, would make it easier to achieve this goal [1]. A protein is translated from a certain gene and the protein profile is highly correlated to the gene transcription level [29]. Furthermore, the proteome is the expressed protein complement of a genome and proteomics is functional genomics at the protein level [3]. Therefore, it should be possible to find a new strong promoter of a highly expressed gene through proteomics analysis.

In this study, a new promoter, designated as promoter P_{B932_2000} , was identified based on proteomics analysis and the promoter was shown to be useful for the expression of homologous and heterologous genes in *G. oxydans* WSH-003. A protein with a high expression level called hypothetical protein B932_2000 was found through two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) experiments. The corresponding promoter region was characterized including the -10 and -35 motif sequences using the bioinformatics tool BPROM with

the help of the genome sequence information. Enhanced green fluorescent protein (*egfp*) was used as the reporter gene to compare the new promoter with the strong $P_{E. coli_tufB}$ and $P_{G. oxydans_tufB}$ promoters. Finally, the strong promoter P_{B932_2000} was successfully used to overexpress *stdh* in *G. oxydans* WSH-003 to enhance L-sorbose production. The results showed that proteomics analysis is an efficient way to identify strong promoters. The strong promoter can further facilitate the metabolic engineering of *G. oxydans*.

Materials and methods

Strains and plasmids

Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *G. oxydans* WSH-003 was obtained from Jiangsu Jiangshan Pharmaceutical Co., Ltd., and had been sequenced in our previous study [10]. *G. oxydans* ATCC 621H (DSM 2343) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) [27]. *Escherichia coli* JM109 used as the host for plasmid construction was purchased from Novagen (Darmstadt, Germany).

Culture conditions

Gluconobacter oxydans strains were cultivated in D-sorbitol medium (D-sorbitol 150 g/L, yeast extract 10 g/L), at 30 °C, 200 rpm. As *G. oxydans* possesses a natural resistance toward cefoxitin, cultivation was performed using 25 µg/mL cefoxitin. All *E. coli* strains were cultivated at 37 °C, 200 rpm, on Luria–Bertani medium (yeast extract 5 g/L, tryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L) with appropriate antibiotics when needed.

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Sources
Strain		
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F'[traD36, proAB+, lacIq, lacZΔM15]</i>	Novagen
<i>G. oxydans</i> WSH-003	Wild type, <i>cef^R</i>	This laboratory
<i>G. oxydans</i> 621H	Wild type, <i>cef^R</i>	Prust et al. [27]

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3') ^a	Notes
<i>slh</i> -R	<u>GGGGTACCTCAGTGCTTGATGGCATCAG</u>	<i>KpnI</i>
<i>egfp</i> -R	<u>GGGGTACCGGCCGCAAATTAAGCCTTC</u>	<i>KpnI</i>
<i>E. coli_tufB</i> -F	<u>CGGGATCCAGGAGCGCATTGTTGAGCA</u>	<i>BamHI</i>
<i>E. coli_tufB(egfp)</i> -R	<u>AGTTCTTCTCCCTTACCCATCGATTGTCCTTAAGACACGGA</u>	
<i>egfp(E. coli_tufB)</i> -F	<u>GTGTCCTAGAGGGACAATCGATGGGTAAGGGAGAAGAACTTTTCAC</u>	
<i>G. oxydans_tufB</i> -F	<u>CGGGATCCGTACGATGGTAAGAAATCCACTG</u>	<i>BamHI</i>
<i>G. oxydans_tufB(egfp)</i> -R	<u>AGTTCTTCTCCCTTACCCATCGTTCTTCCAAAACCCC</u>	
<i>egfp(G. oxydans_tufB)</i> -F	<u>GGGGTTTTGGAGAAAGACCGATGGGTAAGGGAGAAGAACTTTTCAC</u>	
<i>B932_2000</i> -F	<u>CGGGATCCGAGGTATTTGGAATGAGTCGCC</u>	<i>BamHI</i>
<i>B932_2000(egfp)</i> -R	<u>AGTTCTTCTCCCTTACCCATCGTTCTTCCAAAACCCCTGC</u>	
<i>egfp(B932_2000)</i> -F	<u>CAGGGTTTTGGAGATAGACGATGGGTAAGGGAGAAGAAGAACTTTTCAC</u>	
<i>G. oxydans_tufB(sldh)</i> -R	<u>TGGAAATATTTTACAATCACCGTCTTCTTCCAAAACCCC</u>	
<i>slh(G. oxydans_tufB)</i> -F	<u>GGGGTTTTGGAGAAAGACCGGTGATTGTGAAATATTTCCAATAAT</u>	
<i>B932_2000(sldh)</i> -R	<u>TGGAAATATTTTACAATCACCGTCTATCTCCAAAACCCCTGC</u>	
<i>slh(B932_2000)</i> -F	<u>CAGGGTTTTGGAGATAGACCGGTGATTGTGAAATATTTCCAATAAT</u>	
RT <i>egfp</i> -F	ACTTGTCACTACTCTTACTTATGG	
RT <i>egfp</i> -R	TCCTTGAAGAAGATGGTCCTC	
16S rRNA-F	GCGGTGTTACAGTCAGATG	
16S rRNA-R	GCCTCAGCGTCAGTATCG	

^a Restriction sites and reverse complementary sequences for fusion PCR used for cloning are underlined

intensity (RFU/OD₆₀₀, the relative fluorescence unit divided by the corresponding cell density) was measured according to Xu et al. [43], using Gen5 Data Analysis Software (BioTek, USA) with an excitation of 488 nm and emission at 509 nm upon measuring. Cells were harvested by centrifugation and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) buffer (pH 7.4). Finally, the cells with maximum fluorescence intensity were photographed using a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

L-sorbose and D-sorbitol analysis

D-sorbitol and L-sorbose were evaluated by HPLC (Agilent 1100 series, Santa Clara, CA), with an Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm; Bio-Rad, Hercules, CA) at 35 °C with a flow rate of 0.6 mL/min and 5 mM H₂SO₄ as the eluent [48]. The results are reported as the averages of three biological replicates.

Results

Identification of the protein with the highest expression level in *G. oxydans*

As promoter strength is often highly correlated to gene expression level, the 2-DE technique was firstly used to obtain the protein with the highest expression in the whole

proteome. The protein was extracted from the wild strain cells at three different growth phases, 8 h (early logarithmic phase), 20 h (late logarithmic phase), and 36 h (middle stationary phase), to comprehensively study the protein expression levels spanning the strain growth curve. As shown in Fig. 1, the whole protein expression levels were represented at three different time points by 2-DE. Among the gel spots, one distinct big spot was present at all three growth phases, which revealed the existence of a corresponding potential high-expression gene such as a housekeeping gene. Finally, Mascot search results demonstrated that the protein of interest was the hypothetical protein B932_2000 (GenBank ID: 414342978) in *G. oxydans* WSH-003.

Bioinformatics analysis of the P_{B932_2000} promoter region

Referring to the genome information of *G. oxydans* WSH-003, gene *B932_2000* codes for an open reading frame (ORF) of 396 amino acids with 1188 nucleotides. The regions immediately upstream from gene *B932_2000* ORF were analyzed, using the specialized promoter prediction tool BPROM. The sequence between *B932_2000* and the gene ahead of it was chosen to be analyzed in case there was a promoter far away from the initiation codon. The results showed that the core motif sequence at −35 box is CTGAAG and that of −10 box is

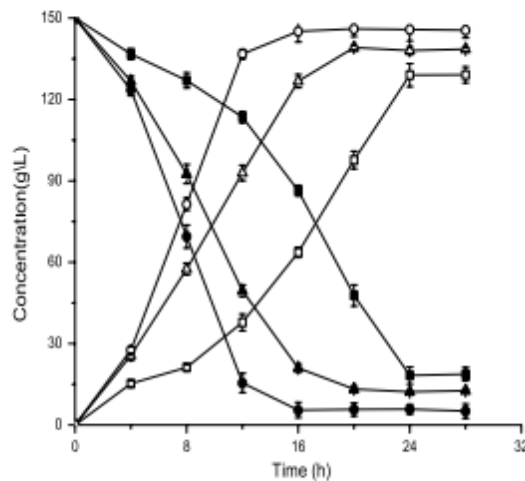


Fig. 4 Overexpression of *sl dh* with different promoters in *G. oxydans* WSH-003. The time courses of the oxidative fermentations of D-sorbitol (solid markers) and L-sorbose (open markers) by control strain *G. oxydans* pBBR1MCS-2 (squares) and the over-producing strains *G. oxydans* pBBR1-P_{*G. oxydans*_*sl dh*} (triangles) and *G. oxydans* pBBR1-P_{B9.32_2000}-*sl dh* (circles) were determined. Error bars represent standard deviation from the mean for the three batches

control strains, with a yield of 144.5 g/L and 16-h fermentation time (Fig. 4). In detail, the yields obtained by *sl dh* overexpression regulated by P_{B9.32_2000} achieved 5.0 and 12.0 % increases compared with *G. oxydans* pBBR1-P_{*G. oxydans*_*sl dh*} and *G. oxydans* pBBR1MCS-2, respectively. More importantly, the fermentation was shortened to 16 h, in comparison to 20 and 24 h with the control stains, respectively.

Discussion

Gluconobacter oxydans has been successfully used for the industrial production of food-related products, pharmaceuticals, and cosmetics. Metabolic engineering of the bacterium is essential to further improve strain performance [11, 21, 26]. Here, a new promoter was identified in *G. oxydans* based on proteomics analysis, which can enable researchers to obtain available genetic tools for metabolic engineering. P_{B9.32_2000} was identified from 2-DE analysis due to the high protein expression driven by this promoter and further characterized by the -10 and -35 sequence motifs using bioinformatics tool. Strong promoter activity was demonstrated using the *egfp* reporter gene and was applied to enhance *sl dh* gene expression in *G. oxydans* WSH-003.

There are several ways to find new promoters. Among them, a traditional way to identify promoters is a promoter

trap system aimed at genome scale, which consists of a plasmid containing a multiple cloning site at the front of a promoter-less marker gene [6, 44]. However, this method often requires a lot of work and seems less efficient. Besides, high-throughput DNA sequencing technology has largely accelerated sequencing of many bacterial genomes and the prediction of promoters [40]. However, it is not yet possible to accurately predict promoters, largely because of the complex expression behavior of genes [28]. Recently, the prevalent high-throughput sequencing technology of transcriptomes (RNA-Seq) has been used in many studies including promoter analysis [33, 35]. RNA-Seq enables the identification of promoters and determination of strong promoters in a genome-wide manner [42]. This transcriptomics-based method, while comprehensive, is a little time-consuming and quite expensive to carry out for most researchers. Compared with the method above, a new strategy based on proteomics analysis is not only easy but also efficient for obtaining the desired strong promoters of high expression genes.

A core promoter is a DNA sequence with two conservative sequences known as -10 and -35 elements, which specify the binding site for an RNA polymerase holoenzyme and the transcriptional starting point [29]. According to the function and type of a gene, a promoter can be classified as a housekeeping or stress-inducible one [38]. In this experiment, the protein isolated by 2-DE was similar to a housekeeping protein, as the gene expression level was extremely high compared to other levels and, also, the protein was constitutively expressed during different strain growth phases. Usually, strong constitutive promoters are used for the construction of expression plasmid vectors as well as for replacing the native promoters of selected genes in engineered strains [8, 14, 21].

To gain comprehensive knowledge of the promoter, the core motif sequence of the promoter was analyzed by BPROM, which is a bioinformatics tool for bacterial promoter prediction that has been used in many promoter-related studies [16, 37, 41]. To analyze promoters, reporter genes are convenient tools for screening promoters and measuring promoter activities. The commonly used reporter genes include green fluorescent protein (*gfp*), chloramphenicol acetyl transferase (*cat*), and β -galactosidase (*lacZ*) [23, 36], among which *gfp* is the most widely used reporter system with many advantages such as lack of host dependency and direct visualization [5, 38]. In our study, a modified *gfp* named *egfp* was used, which is a derivative of the original that displays advantages such as enhanced stability and stronger fluorescence intensity [25]. Then with the help of the *egfp* reporter gene, the promoter assessment was determined at both transcription and translation levels and compared with the commonly used strong promoters P_{*E. coli*_*sl dh*} and P_{*G. oxydans*_*sl dh*} [21, 30, 31].

in Appendix, the two-step fermentation process involves lesser steps than the Reichstein process; thus, it reduces energy and water consumptions. Also, the two-step fermentation process operates at lower temperature and pressure conditions, which is cheaper and safer than the Reichstein process. Furthermore, from the Eq. (2), the two-step fermentation process replaces the chemical reaction of sorbose to 2-keto-gulonic acid with fermentation that reduces the use of harmful solvents and reagents such as acetone. The cost of waste disposal for the Reichstein process is also much higher compared to the two-step fermentation process since the amount of waste produced is significant [9]. In conclusion,

cost with higher efficiency, and it is easier to control and monitor the fermentation process than the mixed culture.

2.3 Process description

As shown in the simulated flow sheet attached in Fig. 1, 70% of sorbitol solution is fed to the first fermenter (FR-101) along with ammonia, water and air to undergo oxidative fermentation under 30 °C and pH 6 with an initial concentration of 200 g/L [11]. In the first fermenter, the sorbitol is converted to sorbose by *Gluconobacter oxydans* [12] in 14 h for 98% conversion [11]. Combination of glassy carbon

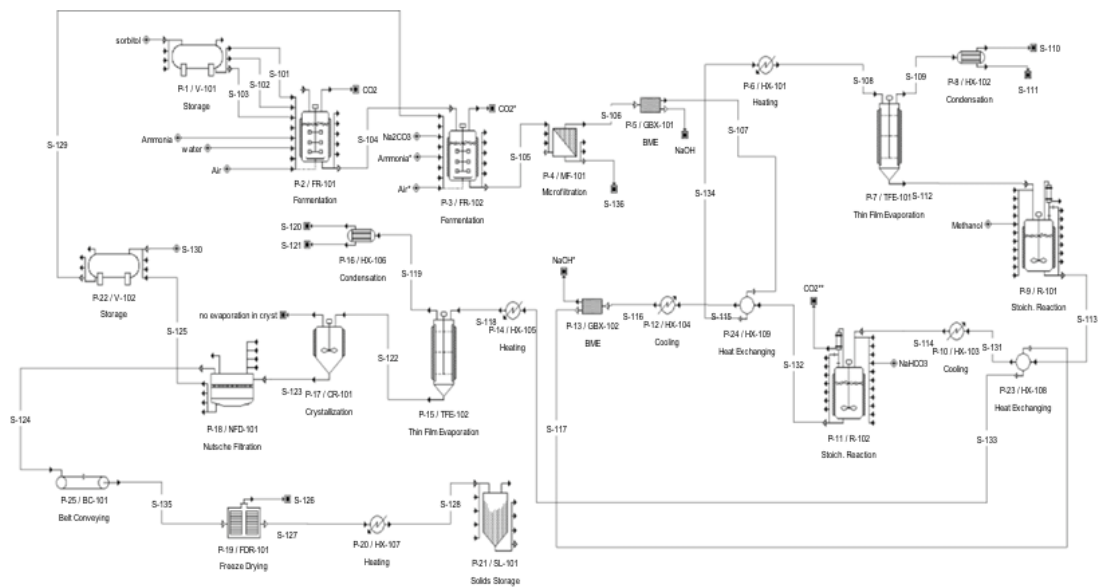


Fig. 1 Simulated flow sheet from SuperPro Design

	<p>V is the working volume of fermenter, μ is the bacteria specific growth rate and C_c is the concentration of the biomass</p> <p>Cell accumulation rate, $\mu C_c = 2.17 \text{ g/dm}^3 \text{ h}$</p> <p>Sensible heat, $Q_{\text{sen}} = Q_{\text{product}} - Q_{\text{reactants}} = -1.233 \text{ kJ/g (sorbitol)}$</p> <p>Conversion of sorbose to sodium keto-gluconic acid by <i>Pseudoglyconobacter Saccharoetogenes</i></p> <p>Main Reaction: Sorbose + Oxygen + Sodium carbonate \rightarrow Sodium keto-gluconic acid + Water + Carbon dioxide</p> $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{O}_2 + 1/2\text{Na}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_9\text{NaO}_7 + 3/2\text{H}_2\text{O} + 1/2\text{CO}_2$ <p>Metabolism Reaction: Sorbose + Oxygen + Ammonia \rightarrow Biomass + Carbon dioxide + Water</p> $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 0.73\text{NH}_3 + 2.157\text{O}_2 \rightarrow 3.66\text{CH}_{1.79}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2} + 2.34\text{CO}_2 + 3.804\text{H}_2\text{O}$ <p>Heat of reaction is mainly governed by heat of metabolism and sensible heat where sensible heat, $Q_{\text{sen}} = -2.691 \text{ kJ/g (sorbitol)}$</p>
Fermenter FR-102	
Bipolar Membrane Electrodialysis GBX-101	<p>Conversion of sodium keto-gluconic acid to keto-gluconic acid through hydrolysis</p> <p>Sodium keto-gluconic acid + Water \rightarrow Keto-gluconic acid + Sodium hydroxide</p> $\text{C}_6\text{H}_9\text{NaO}_7 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7 + \text{NaOH}$ <p>Heat of reaction: $-629 \text{ J/g (Sodium keto-gluconic acid)}$</p>
Reactor R-101	<p>Conversion of keto-gluconic acid to methyl gluconate through esterification process</p> <p>Keto-gluconic acid + Methanol \rightarrow Methyl gluconate + Water</p> $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7 + \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}$ <p>Heat of reaction: $-240 \text{ J/g (Keto-gluconic acid)}$</p>
Reactor R-102	<p>Conversion of methyl gluconate to sodium ascorbate</p> <p>Methyl gluconate + Sodium bicarbonate \rightarrow Sodium ascorbate + Methanol + Water + Carbon dioxide</p> $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_7 + \text{NaHCO}_3 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_7\text{O}_8\text{Na} + \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ <p>Heat of reaction: $-4.298 \text{ kJ/g (Methyl gluconate)}$</p>
Bipolar Membrane Electrodialysis GBX-102	<p>Recovery of ascorbic acid from sodium ascorbate through hydrolysis reaction</p> <p>Sodium ascorbate + Water \rightarrow Sodium hydroxide + Ascorbic Acid</p> $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_8\text{Na} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaOH} + \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$

electrode with molybdenum and manganese oxides makes *Gluconobacter oxydans*. For these bacterial strains, platinum (Pt) acts as an immobilization matrix (GCE/MnOx-MoOx/Pt) where GCE stands for Glassy carbon electrode, and MnOx-MoOx is the manganese and molybdenum mixed oxides.

Before entering the second fermenter, the biomass produced in the first fermenter is being removed by passing the fermentation broth through a microfilter. Later, this fermentation broth is fermented in the second fermenter (FR-102) by *Pseudoglyconobacter Saccharoetogenes* for 72 h to produce sodium keto-gluconic acid [13]. In this fermenter, the conversion of sorbose to sodium keto-gluconic acid is 76% [14]. The slurry from the fermenter is then transferred to a microfilter (MF-101) to separate biomass produced by the bacteria. Approximately 1% of the liquid solution is a

loss through the removal of biomass using a microfilter. *Pseudoglyconobacter Saccharoetogenes* can oxidize primary alcohol, secondary alcohol, aldehydes and polysaccharides.

Then, the recovery of 2-keto-gulonic acid from sodium keto-gluconic acid is made by a bipolar membrane electrodialysis (GBX-101) through the exchanges of cation and anion with water molecules [15]. Next, the recovered 2-keto-gulonic acid is fed to an evaporator (TFE-101) to remove the water before entering a continuous stirred tank reactor, CSTR (R-101). The purpose of removing water is to increase forward reaction in R-101 since water is a product in the reaction [16]. In the CSTR (R-101), 2-keto-gulonic acid undergoes esterification process with methanol at 64 °C to produce methyl gluconate [17].