

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан факультету)

_____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2020 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2020 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Біосинтез інозину *Bacillus subtilis* для одержання Рибоксину

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

_____ Терещук Діани Олександрівни _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ Волощина Ірина Миколаївна _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

_____ (прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Рецензент _____ Кронікровський О.І. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю.

Кафедра біотехнології і мікробіології.

Освітній ступінь бакалавр.

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія».

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

**З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

Терещук Діани Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез інозину *Bacillus subtilis* для одержання Рибоксину

керівник роботи Волошина Ірина Миколаївна, к.т.н., доцент,

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року.

3. Вихідні дані до роботи Штам культури продуцента *Bacillus subtilis* рибоксину, об'єм ферментера 6,3 м³

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Характеристика цільового продукту; Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування; Розділ 4. Біосинтез цільового продукту; Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми; Розділ 6. Матеріальний баланс; Розділ 7. Специфікація обладнання; Розділ 8. Опис технологічної схеми; Розділ 9. Контроль виробництва; Розділ 10. Автоматизація ділянки інозину

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема – 1 аркуш А2, Апаратурна схема – 2 аркуш А2, Схема автоматизації – 1 аркуш А2

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, ктн., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	19.05.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	19.03.2020 – 22.03.2020	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	22.03.2020 – 27.03.2020	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	27.04.2020 – 04.04.2020	
4.	Біосинтез цільового продукту	04.04.2020 – 11.04.2020	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	11.04.2020 – 19.04.2020	
6.	Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	19.04.2020 – 27.04.2020	
7.	Специфікація обладнання	27.04.2020 – 04.05.2020	
8.	Опис технологічної схеми виробництва ферменту ЦГТ-ази	04.05.2020 – 10.05.2020	
9.	Контроль виробництва ЦГТ-ази	10.05.2020 – 16.05.2020	
10.	Автоматизація ділянки виробництва ЦГТ-ази	16.05.2020 – 19.05.2020	
11.	Оформлення пояснювальної записки	19.05.2020-31.05.2020	
12.	Виконання графічної частину проекту	20.05.2020 - 31.05.2020	

Здобувач _____ Терещук.Д.О.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Волошина.І.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічного процесу виробництва інозину (продуцент *Bacillus subtilis* ВНИИ 48) у вигляді порошку для виготовлення таблеток.

Технологія виробництва препарату включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва), основний технологічний процес представлений такими послідовностями: біосинтез цільового продукту, який здійснюється у ферментері об'ємом 6,3 м³, та підготовчі етапи для біосинтезу (у ферментерах об'ємами 0,63 м³, 0,06 м³ та в колбах на качалці. Поживне середовище готується в окремими композиціями у реакторах. Друга частина представлена виділення інозину з культуральної рідини після виробничого біосинтезу, зокрема (центрифугування культуральної рідини, очищення та осадження нативного розчину, концентрування, кристалізація, сушіння у розпилювальній сушарці) стадії пакування, маркування, відвантаження та знешкодження відходів, що наведені на технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційна робота викладена на 154 сторінках друкованого тексту, містить 25 таблиці 2 схеми, 23 рисунків і складається з десяти розділів, списку використаної літератури (31 джерел) та графічної частини (креслення формату А1, А2 та А3).

Ключові слова: *Bacillus subtilis* ВНИИ 48, виробничий біосинтез, трансформація, інозин, виділення, центрифугування, освітлення, кристалізація, вакуумна сушка.

ЗМІСТ:

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	8
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	12
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	14
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	17
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	19
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	20
3.1. Потреба у цільовому продукті	23
3.2. Розрахунок потужності виробництва	23
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	24
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	24
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	25
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	25
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	27
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	31
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	31
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	31
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря	33
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	36
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища ...40	
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту ...45	
5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту	50
РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	70

РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання.....	91
РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми.....	98
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва інозину.....	119
9.1. Мікробіологічний контроль інозину.....	119
9.2. Спосіб отримання інозину з культуральної рідини.....	120
9.3.Визначення концентрації біомаси.....	122
9.4.Визначення амінного азоту.....	124
9.5.Спосіб визначення амонійного азоту.....	127
9.6.Визначення концентрації глюкози.....	129
9.7. Гідроліз білків біомаси.....	131
9.8. Гідроліз внутрішньоклітинних полісахаридів.....	131
9.9. Визначення вологості.....	132
РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва.....	133
ЛІТЕРАТУРА.....	139
ДОДАТОК 1.....	142
ДОДАТОК 2.....	143
ДОДАТОК 3.....	144
ДОДАТОК 4.....	147
ДОДАТОК 5.....	149

Вступ

Біотехнологія не стоїть на місці. Виробництво нових ліків відкриває нові межі у світовому ринку, дає змогу легко та швидко реалізувати всі потреби людства. Біотехнологія є молодою галуззю, але вже добре себе зарекомендувала.

В даний час виробництво інозину виросло за рахунок розширення даного препарату та його доступністю. Інозин бере участь у обміні глюкози, покращує травлення, допомагає при захворюваннях печінки. Але найбільш важливий внесок він вносить при лікуванні серцево-судинних захворювань.

Серцево-судинні захворювання на даний момент постають однією із неінфекційних причин смертності населення. За останні роки профілактичні і лікувальні заходи привели до різкого зниження смертності від ішемічної хвороби серця. І безсумнівно, велика заслуга в цьому належить інозину.

Лікарський препарат інозит є похідним пурину. Його можна розглядати як нуклеозид, тобто речовина, яка за природних умов міститься в клітинах організму та є попередником аденозинтрифосфату - АТФ. Надає антиаритмічну, антибіотичну, антигіпоксичну та кардіорегулюючу дію. Активує та покращує обмінні процеси в умовах гіпоксії, водночас стимулює активність ферментів циклу Кребса та синтез нуклеотидів. Активує метаболічні процеси у міокарді, тим самим надаючи позитивну дію на обмінні процеси у серцевому м'язі, забезпечує розслаблення м'язів серця в діастолі та збільшує силу серцевих скорочень.[10]. Інозин швидко абсорбується у травному тракті, метаболізується у печінці, виділяються нирками у незначній кількості.

Також широко використовується для поліпшення зорових функцій при відкрито-кутовій глаукомі із нормалізованим внутрішньоочним тиском [12].

Актуальність роботи. На теперішній час найбільше біотехнологічних розробок присвячено мікробіологічному синтезу інозину (продуцент *Bacillus subtilis*) [9-10], також можливе отримання даного препарату за допомогою інших мікроорганізмів, наприклад : *E. coli* [13].

В наш час даний препарат широко використовується, адже для його синтезу не потрібно затрачати великі кошти і мікроорганізм за короткий час здатний синтезувати велику кількість інозину, який для нас становить значний інтерес. Ще

однією перевагою є те що інозин не синтезується в Україні та ближніх країнах, тому не має конкуренції. Поживне середовище не є дорогим та не вимагає ніяких допоміжних етапів

Новизна роботи. Попит на даний тип фармацевтичної продукції різко зростає, адже інозин має широкий спектр дії та може використовуватися для виробництва різних препаратів.

Новизною є використання штаму *Bacillus subtilis* ВНИИ-48, який використовують для одержання інозину. Даний штам за 85 годин ферментації на середовищі з глюкозою накопичує 32 г/л інозину, що вказує на те, що даний штам мікроорганізму є найкращим продуцентом даного препарату. [5,6].

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.

Інозин — це природний препарат, який по хімічному складу є сполукою, що складається пуринової основи гіпоксантину та вуглеводу рибози. Інозин у нормі є природним метаболітом людського організму [7]. Інозин є лікарським препаратом, а в українській фармакопеї відноситься до групи метаболічних препаратів. У Міжнародній фармакопеї інозин також відноситься до противірусних препаратів, які можуть застосовуються в дерматології. Згідно інструкції, інозин в основному підсилює синтез нуклеотидів, стимулює активність деяких ферментів циклу Кребса.

Інозин є метаболічним попередником АТФ. Окрім того, препарат також має здатність зменшувати симптоми інтоксикації серцевими глікозидами. Також, ще однією перевагою даного препарату є властивість інозину за здійснювати повне розслаблення міокарда в діастолі, завдяки чому підвищується УОК - ударний об'єм крові, тому, зараз дана тема є актуальною та широко використовується синтез продукції препарату за допомогою мікроорганізмів. Даний препарат можливо випускаєти у вигляді 2 % розчину для ін'єкцій у ампулах по 5, 10 та 20 мл та у вигляді таблеток по 0,2 г.

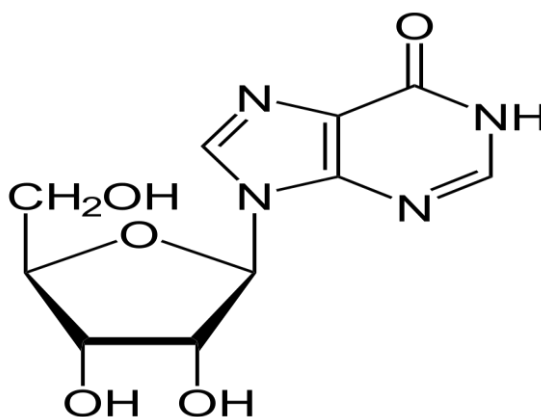


Рис.1.1 Формула інозину

					НУХТ БТЕК 04.02.32 ДП ПЗ		
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Терещук.Д.О				Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник	Волошина.І.М					8	1 8
Консультант					Кафедра БТМ		
Зав.каф.	Пирог Т.П.						
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.							

Інозин має антиаритмічні властивості, антигіпоксичні, виявляє анаболічну дію [12]. Також є попередником синтезу АТФ. Здійснює позитивний вплив на обмін речовин у міокарді, а також, підвищує енергетичний баланс клітини, підвищує синтез нуклеотидів, стимулює активність деякі ферменти циклу Кребса. Підвищує силу скорочень серця та сприяє повнішому послабленню міокарда у діастолі завдяки здатності зв'язувати іони кальцію, що проникають у клітину під час їх збудження. Як результат-зростає ударний об'єм серця, поліпшується кровопостачання тканин, у т.ч. коронарний кровообіг.

Інозин також знижує агрегацію тромбоцитів, посилює регенерацію тканин (міокарда і слизової оболонки травного тракту). Має вплив на метаболічні процеси в печінці. Широко застосовуються у комплексному лікуванні ішемічної хвороби серця (порушення ритму серця, інфаркт міокарда, стенокардія) [12].

Фармакологічні властивості

У нормому стані є природнім метаболітом людського організму, у великій кількості знаходиться також в організмі риб, експериментально можливе застосування як харчовий стимулятор у розведенні деяких промислових риб (жовтохвіст японський, калкан великий тощо).

Інозин посилює синтез нуклеотидів та активність деяких ферментів циклу Кребса. Також є метаболічним попередником АТФ. Суть процесу: проникаючи до клітини міокарду, посилює енергетичний обмін у міокардіоцитах, має також антиаритмічну та антигіпоксичну дію, стимулює коронарний кровообіг. Окрім того, інозин також має функцію зменшувати симптоми інтоксикації серцевими глікозидами. Також, згідно інформації виробників, інозин покращує функціональний стан нирок при їх ішемії при оперативних втручань.

Також ще однією перевагою є те, що покращується функціональний стан печінки при хронічних захворюваннях, особливо через алкогольну інтоксикацію. Згідно джерел, інозин посилює засвоєння кисню тканинами організму, за рахунок підвищення концентрації в еритроцитах біфосфогліцерату, який сприяє посиленню засвоєння кисню, а також покращує пристосованість до фізичних навантажень.

Згідно інформаційних джерел, інозин мав популярність серед важкоатлетів колишнього СРСР у зв'язку із тим, за рахунок того, що він не був включений у список заборонених для спортсменів препаратів. Проте, згідно досліджень, не було виявлено значного покращення спортивних показників при застосуванні цього препарату.

Також проводяться дослідження по застосуванню інозину при розсіяному склерозі, інсульті та паркінсонізмі.

Фармакокінетика вивчена недостатньо за рахунок того, що він відноситься до природного метаболіту людського організму, та кількісну оцінку його метаболічних показників провести занадто важко. Визначено, що інозин добре всмоктується після перорального застосування, метаболізується у печінці і утворюється глюкуронова кислота і в подальшому відбувається окислення. Виводиться з організму інозин зазвичай через нирки, частково із жовчю і фекаліями. Період напіввиведення препарату ще не встановлений. [12]

Показання до застосування .

Згідно інструкції по застосуванню, інозин широко застосовується у лікуванні ішемічної хвороби серця, аритміях (а також внаслідок передозування серцевих глікозидів), вадах серця, цирозах печінки та гепатитах, жировому гепатозі і алкогольних ураженнях печінки, також для профілактики лейкопенії при радіаційному ураженні, для захисту нирок від ішемії при операціях на відкритих нирках, при відкрито-кутовій глаукомі, урокопропорфірії.

Побічна дія

При застосуванні даного препарату побічні ефекти виникають дуже рідко. Згідно інформації виробника, найчастішими побічними ефектами може бути алергічна реакція у вигляді висипань на шкірі, кропив'янки, свербіння шкіри. Можливе підвищення рівня сечової кислоти в крові, при тривалому застосуванні можливе загострення подагри. Згідно даних інструктивних джерел є вірогідність виникнення тахікардії, загальної слабкості, артеріальної гіпотензії, а також місцевих реакцій при внутрішньовенному введенні препарату. [12]

Протипоказання

Протипоказаний при подагрі, підвищеній чутливості до препарату, підвищенні концентрації сечової кислоти в крові. З обережністю призначається інозин при порушенні функції нирок. [12]

Форма випуску

Інозин випускається у вигляді 2 % розчину для ін'єкцій у ампулах по 20, 10 і 5 мл



Рис.1.2 Препарат Рибоксин

Та в таблетках по 0,2 г



Рис.1.3 Препарат Рибоксин

Для застосування у бодибілдінгу, інозин випускається у вигляді желатинових капсул по 0,5 г та у комбінції з глюкозою або фруктозою по 0,5 г інозину та 0,1 г фруктози або глюкози. Інозин також випускається у комбінції з β -ацетилдигоксином, оксифедрином та надидом під торговельною маркою «Аденоцин»; з рибофлавіном та бурштиною кислотою, нікотинамідом під торговельними марками «Церебронорм» та «Цитофлавін» . [12]

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

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

На сьогодні, основним джерелом отримання інозину є культивування за допомогою різних штамів *Bacillus subtilis* [14]. Крім того є ще багато різних мікроорганізмів, за допомогою яких можна одержати інозин, зокрема – штами *E. Coli*. Для підвищення виходу препарату доцільно використовувати середовища, що містять кукурудзяний екстракт і БВК, культивування продуцента вести на середовищі, що містить, г / л: глюкоза-140; азотнокислий амоній-20; БВК -25; кукурудзяний екстракт-5; крейда-20; сірчаноокислий магній-3 і вода. При цьому в процесі культивування аерацію ведуть так, що швидкість розчинення кисню становить 2,4-3,8 г O²/л, а культивування продуцента здійснюють при рН , що дорівнює 6,6-6,8 Час культивування - 85 год, t = 30 °С, концентрація препарату - 32 г / л. [6]

Вміст вуглекислого газу в процесі культивування повинен бути в межах 0,7-0,9% та регулюють шляхом подачі повітря в кількості 250 об/хв. Високопродуктивний мутантний штам *Bacillus subtilis* ВНИИ 48 отриманий з штаму *Bacillus subtilis* ЦМПМ В-1321 в результаті застосування генетико-селекційних методів роботи, зокрема придбання резистентності до 6-тіогуанін. Штам ВНИИ-48 володіє більш високим рівнем накопичення інозину. Вирощування посівного матеріалу штаму ВНИИ-48 здійснюють на середовищі Хоттингера. Як продуцента використовують мутантний штам *Bacillus subtilis* ВНИИ-48. [6]

					НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ					
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ					
Розроб.		Терещук.Д.О						Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Волошина.І.М						12	1	12
Консультант								Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.								

Порівняльна таблиця продуцентів

Таблиця 2.1

Продуцент:	Склад поживного середовища, г/л, %:	Умови культивування:	Концентрація цільового продукту, г/л:	Література:
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИ-48	Культивування продуцента на середовищі, що містить, г/л: <ul style="list-style-type: none"> • глюкоза 140; • NH₄NO₃ - 20, • MgSO₄ - 3, • ББК (білково-вітамінний комплекс)- 25; • кукурудзяний екстракт -5; • CaCO₃ - 20; 	<ul style="list-style-type: none"> • рН 6,6-6,8 • Т=85 год • t =30 °С , 	32	[6]
<i>B. subtilis</i> КМBS16	Склад, (г / л): <ul style="list-style-type: none"> • м'яса – 125; • кукурудзяний екстракт – 25; • NH₄NO₃– 13; • (NH₄)₂НРО₄ – 1. 	<ul style="list-style-type: none"> • рН -7,0 • t =34 °С , • Т= 72 год 	1,8	[7]
<i>B. amyloliquefaciens</i> 36-59Н	Склад: кукурудзяний екстракт - 35 <ul style="list-style-type: none"> • м'яса - 30 • NH₄ Cl - 7,5 • (NH₄)₂НРО₄ - 1,5, Додатково (як джерела ростових речовин) наступного складу: <ul style="list-style-type: none"> • гідролізат ББК - 35 • гідролізат кукурудзяного екстракту - 35, Додатково як джерела карбону наступного складу : <ul style="list-style-type: none"> • м'яса – 12; • NH₄ Cl – 0.4, • 25% -ного водного розчину аміака (як засобу корекції рН культуральної рідини та додаткового джерела азоту). 	<ul style="list-style-type: none"> • рН - 7,2 • t =33 °С • Т=40 год 	11,9	[9]

На даний час найбільш використовуються такі штами: *Bacillus subtilis* ВНИИ-48 [7], *B. subtilis* КМBS16 [7] та *B. amyloliquefaciens* 36-59Н [7]. Саме за допомогою цих мікроорганізмів можна отримати найбільшу продуктивність препарату. В

таблиці 1.1 наведено приклади середовищ для культивування мікроорганізмів. Крім того для *B. amyloliquefaciens* 36-59H потрібно ще вносити додаткові джерела поживних речовин для найкращого його культивування, що впливає на швидкість отримання інозину, а для *B. subtilis* KMBS16 склад поживного середовища набагато простіший. На прикладі таблиці можемо порівняти, за допомогою якого мікроорганізму буде відбуватися найбільше виробництво препарату.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Посівний матеріал вирощують в колбах ємністю 750 мл, що містять 100 мл середовища на качалці, що робить 250 об / хв протягом 20-24 год при 30°C. Інокулят передають в ферментаційне середовище.

Склад середовища, г/л:

- Глюкоза-140;
- ББК-25;
- NH_4NO_3 -20;
- Кукурудзяний екстракт -5;
- MgSO_4 -3;
- CaCO_3 -20.

Умови культивування: рН 6,6-6,8,0 процес ферментації проводять методом глибинного культивування при температурі 30 °С, Т = 85 год. Вихід інозину після ферментації становить 32 г/л.

**Склад та вартість поживного середовища для культивування
мікроорганізмів, які входять до препарату інозин**

Таблиця 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонент а, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИ-48	Глюкоза - 140	50	7	1
	NH ₄ NO ₃ - 20	23,90	0.478	2
	БКВ (білково-вітамінний комплекс)- 25	20,12	0.503	3
	кукурудзяний екстракт -5	75	0.375	3
	CaCO ₃ - 20;	12,90	0.258	2
	MgSO ₄ - 3	20	0.06	
	Вартість 1 л середовища – 8,7			
<i>B. subtilis</i> KMBS16	м'яса – 12.5;	81	1	3
	кукурудзяний екстракт – 25	75	1.88	1
	NH ₄ NO ₃ – 13	23,90	0.31	
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 1	13.4	0.0134	1
	Вартість 1 л середовища – 3,2			
<i>B. amyloliquefa</i> <i>ciens</i> 36-59H	кукурудзяний екстракт - 35	75	2.625	1
	м'яса - 42	81	3.4	2
	NH ₄ Cl - 8	60	0.48	2
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ - 1,5	22.80	0.0342	3
	гідролізат БКВ - 35	20,12	0.7	1
	Вартість 1 л середовища – 7,3			

Примітка. * – Ціни наведено станом на грудень 2019 р.:

1. <http://prom.ua>,

2. <http://flagma.ua>,

3. <http://agronet.ua>

Умовна вартість 1 мг цільового продукту інозину при культивуванні таких штамів *Bacillus subtilis* ВНИИ-48, *B. subtilis* КМБS16 та *B. amyloliquefaciens* 36-59Н

Таблиця 2.3

Біологічний агент	Вартість 1л середовища, грн	Концентрація інозину мг/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту. грн/мг	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного інозину за год
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИ-48	8,67	32	4,0	85	0,38
<i>B. subtilis</i> КМБS16	3,2	1,8	0,6	72	0,025
<i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> 36-59Н	7,3	11,9	1,6	40	0,29

Отже, якщо врахувати отримані дані ми можемо зробити висновок про те, що *Bacillus subtilis* ВНИИ-48 порівняно із *B. subtilis* КМБS16, і *B. amyloliquefaciens* 36-59Н характеризується найбільшим виходом цільового продукту – 32 г/л. Крім того, швидкість росту найбільш оптимальна для отримання даної кількості продукту, хоч і вартість поживного середовища перевищує вартість інших середовищ, але вихід препарату є найбільшим у порівнянні, тому *Bacillus subtilis* ВНИИ-48 є найкращим продуцентом рибоксину (інозину).

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

Сінна паличка, зустрічається також як бацили сіна чи сінної палички, є грампозитивною, каталазо-позитивною бактерією, яку знайшли в ґрунті та шлунково-кишковому тракті в жуйних тварин та людини. Член роду *Bacillus*, *B. subtilis* має стрижневу форму та може утворювати жорсткий захисний ендоспор, який дозволяє йому переносити екстремальні умови навколишнього середовища.

B. subtilis історично класифікували як облигатний аеробний мікроорганізм, хоча вже є докази того, що це факультативний анаероб. *B. subtilis* є однією із найкраще вивченою грампозитивною бактерією та модельним організмом для вивчення реплікації бактеріальної хромосоми і диференціювання клітин. Він є бактеріальних чемпіонів при виробництві секретійного ферменту і широко застосовується у промислових масштабах компаніями біотехнології.



Рис 2.1 *Bacillus subtilis* електронний знімок

Клітини *B. subtilis*, як правило, мають стрижневу форму та мають довжину близько 4–10 мікрометрів (мкм) та діаметром 0,25–1,0 мкм, при стаціонарній фазі - об'єм клітин близько 4,6 фл. Як і всі інші представники роду *Bacillus*, він може утворювати ендоспори, щоб пережити екстремальні природні умови.

B. subtilis виявився дуже підданим генетичним маніпуляціям і отримав широке поширення як модельний організм для лабораторних досліджень, особливо споруляції, що є спрощеним прикладом клітинної диференціації. Щодо популярності як лабораторного модельного організму, *B. subtilis* часто

розглядається як грампозитивний еквівалент *Escherichia coli*, широко вивченої грамнегативної бактерії.

Бактерії *Bacillus subtilis* використовують свої джгутики для рухової моторики. Ця рухливість виникає на поверхнях, наприклад на агарових пластинах, але не в рідинах. *Bacillus subtilis* розташовані поодинокі або ланцюгами. Клітини, розташовані поруч, можуть роїтись разом, а не окремо.

Ці розташування комірок називають «плотами». Бактерії *Bacillus subtilis* вважалися строго аеробними, це означає, що їм потрібно для розвитку кисень. Однак останні дослідження показують, що вони дійсно можуть рости в анаеробних умовах, роблячи їх факультативними аеробами. Бактерії можуть синтезувати АТФ у анаеробних умовах за допомогою бутандіолового бродіння, а також здійснювати амініфікацію нітратів. *Bacillus subtilis* може використовувати нітрит чи нітрат як кінцевий акцептор електронів. *Bacillus subtilis* також містить дві унікальні нітратні редуктази. Один використовується для асиміляції азотного азоту, а другий - для дихання нітратів. Однак є лише одна нітритна редуктаза, яка служить обом цілям. Нітрат-редуктаза знижує нітрат до нітриту при нітратному диханні, який потім редукується до аміаку нітритредуктазою. *Bacillus subtilis* відрізняється від інших факультативних аеробів тим, що піддається бродінню без зовнішніх акцепторів електронів. Під час бродіння регенерація НАД⁺ головним чином опосередковується лактатдегідрогеназою, яка знаходиться в цитоплазмі. Лактатдегідрогеназа перетворює піруват у лактат. *Bacillus subtilis* містить каталазу KatA та MrgA, фермент, який відповідає за каталіз розкладання перекису водню до води та кисню, та супероксиддисмутази - ферменту, що каталізує розпад супероксиду на кисень та перекис водню

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Таблиця 2.4

Положення *Bacillus subtilis* за десятим виданням керівництва Бергі :

Таксономічна група	Класифікація:
Відділ	<i>Bacili</i>
Клас	<i>Firmicutes</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>
Родина	<i>Bacillaceae</i>
Рід	<i>Bacillus</i>
Вид	<i>subtilis</i>

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1 Потреба використання цільового продукту

Сьогодні хвороби серця є однією з головних причин смертності в Україні. Згідно зі статистикою 2019 року, в структурі поширеності серцево-судинних захворювань(ССЗ) відсоток осіб працездатного віку є значним і становить при гіпертонічній хворобі - 36,7%, при ішемічній хворобі серця - 27,8%, порушеннях ритму серця - 31,1%, інфаркті міокарда - 29,7%. В цілому, у 37% працездатного населення України діагностовано ССЗ, отже, кожен четвертий пацієнт із серцево-судинною патологією має вік від 19 до 65 років[17].

Як бачимо, виробництво інозину для лікування захворювань печінки, серцево-судинної системи, нарощування м'язів та інших хвороб, які представлені в таблиці є на сьогоднішній час актуальною темою[20].

Важливим також є те, що конкуренція на випуск готової діючої речовини в Україні відсутня, тому що субстанцію для препарату підприємства закупають в таких країнах як: Японія, Китай, Індія, рідше Італія та Німеччина, а для того щоб отримати субстанцію підприємства витрачають великі кошти. Тому власним виробництвом ми можемо задовольнити їх потреби в діючій речовині та якість інозину буде не гіршою ніж в країнах, в яких вона закуповується, окрім того транспортування є набагато вигіднішим.

Препарати на основі: діючої речовини-інозин, широко застосовуються в біотехнології. Їх випускають такі фірми як ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», ПАТ «Київський вітамінний завод» та багато інших підприємств, проте, як вже було відомо, ці підприємства не виготовляють діючу речовину, тому ми можемо розрахувати річну потребу в діючій речовині, і визначити скільки потрібно в рік випускати інозину [19].

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.32 ДП ПЗ		
Розроб.		Терещук.Д.О			Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Волошина.І.М				20	1 20
Консультант					Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.					
					РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування		

Річна потреба підприємств в інозині

Таблиця 3.1

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
Торгова Назва:	Склад:	Виробник:	Випущено за 2016 р, тонн :	Кількість інозину в 1 таблетці, мг :	Кількість необхідної субстанції (інозин) , тонн :
Рибоксин	діюча речовина:інозин	АТ «КИЇВСЬКИЙ ВІТАМІННИЙ ЗАВОД»	16	200	3,2
Рибоксин-Дарниця	діюча речовина:інозин;	ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»	5	200	1
Рибоксин	діюча речовина:інозин;	РУП "Борисовський завод медичних препаратів"	10	200	3
Рибоксин-БХФЗ	Діюча речовина: інозин	Публічне акціонерне товариство «Науково-виробничий центр» Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод ».	15	200	2
		Загальна кількість за 2016 р, тонн:	46		9,2

Проаналізувавши літературні дані (див. 2.1) кількість інозину, яку закупають підприємства становить 9,2 тонн. Враховуючи те, що субстанція накуповується в таких країнах як: Індія, Китай, Японія, рідше Німеччина, тому, ми можемо забезпечити 35% від 100%: 20% ми будемо забезпечувати підприємства Києва, 15%-експортувати. [18]

3.2 Розрахунок потужності виробництва

Знаючи те, що в Україні субстанція не виготовлюється то ми можемо визначити річну потужність виробництва для інозину. Тоді потужність виробництва складає:

$$G_{гп} = 9,2 \times 0,35 = 1,84(\text{тонн}) = 1840 \text{ кг}$$

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації. Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 100, тоді кількість продукту за цикл становитиме:

$$G_{цк} = G_{гп} \cdot T_{цф} / 24 \cdot T_{рд} = 1840 \cdot 94 / 24 \cdot 100 = 72 \text{ кг}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (85год) та час підготовки ферментера до роботи. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація апарату (1 год), охолодження апарату (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год). Отже,

$$T_{цф} = 85 + 1,5 + 1 + 0,5 + 1 + 1 + 2 + 0,5 + 1 = 94 \text{ год}$$

Беручи до уваги частку сухих речовин в готовому продукті, що складає 0,95, об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні Есв, м³:

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot C_{Ргп} / X_{кр} \cdot (1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 72 \cdot 0,95 / 32 \cdot (1 - 0,2) = 2,9 \text{ м}^3$$

K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій. Приймаємо $K_1 = 1,1$.

$X_{кр} = 32$, оскільки продуцент інозину – *Bacillus subtilis* ВНИИ-48– синтезує 32 г інозину на 1 л культуральної рідини [5].

Кількість циклів становить:

$$N_{цк} = G_{нт}/G_{цк} = 1840/72 = 26 \text{ цикл}$$

Вихід препарату у кг з 1 м³ культуральної рідини становить:

$$P_{кр} = G_{цк}/V_{кр} = 72/2,9 = 24,5 \text{ м}^3$$

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

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

$$V_{роб1} = V_{кр}/(1-Eф) = 2,9/(1-0,1) = 3,2 \text{ м}^3$$

геометричний об'єм ферментера має становити:

$$V_{Г} = V_{цк}/K_{зап} = 3,2/0,6 = 5,3 \text{ м}^3,$$

де $K_{зап} = 0,6$ – коефіцієнт заповнення.

Знаходимо найближчий за геометричний об'ємом ферментер $V_{ф} = 6,3 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$K_{зап} = V_{цк}/V_{ф} = 3,2/6,3 = 0,51$, що не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65).

2.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з геометричним об'ємом $V_{ф} = 6,3 \text{ м}^3$.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб1}/(1+Xф) = 3,2/(1+0,1) = 2,9 \text{ м}^3,$$

де $Xф = 0,1$ – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 3,2 - 2,9 = 0,3 \text{ м}^3$.

Для одержання 0,3 м³ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

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

$$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 0,3 / (1 - 0,10) = 0,33 \text{ м}^3.$$

Кількість інокуляту $V_{роб2}$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом $V_{па2} = V_{роб2} / K_{зап} = 0,33 / 0,6 = 0,55 \text{ м}^3$.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0,63 \text{ м}^3$.

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб2} / V_{сф} = 0,33 / 0,63 = 0,52$$

що не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65).

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб2} / (1 + X_{па}) = 0,33 / (1 + 0,1) = 0,3 \text{ м}^3,$$

де $X_{па} = 0,1$ – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 0,33 - 0,3 = 0,03 \text{ м}^3 = 30 \text{ л}$.

Для одержання 30 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 30 / (1 - 0,10) = 33,3 \text{ л}.$$

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{пс3} = V_{роб3} / (1 + X_{ін}) = 33,3 / (1 + 0,1) = 30,3 \text{ л},$$

де $X_{ін} = 0,1$ – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 33,3 - 30,3 = 3 \text{ л}$. Кількість інокуляту $V_{роб3}$ можна одержати під час культивування у інокуляторі геометричним об'ємом $V_{ін3} = V_{роб3} / K_{зап} = 33,3 / 0,6 = 55,5 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 60 \text{ л}$.

Для одержання 3 л посівного матеріалу для інокулятора становить 10% від об'єму поживного середовища. Кількість інокуляту для засіву малого

інокулятора $V_{\text{пм3}}=3$ л можна одержати культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочці колби об'ємом $V_{\text{колб}}=750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}}=0,2$.

Тоді кількість колб для одержання посівного матеріалу становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм3}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 3000 / 750 \cdot 0,2 = 20$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 20 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу інозину у ферментері об'ємом 6,3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 3 етапи.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу інозину приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 6,3 м³, один інокулятор об'ємом 0,63 м³, один інокулятор об'ємом 60 л і колби на качалці.

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату

Джерелом вуглецю і енергії при вирощуванні *B. subtilis* в даному біосинтезі є глюкоза. У Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes наявна вся необхідна інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у штаму *B. subtilis*, в даному випадку шлях метаболізму становить гліколіз згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (рис 4.1).

Глюкоза за допомогою глюкозоспецифічного ферменту (КФ 2.7.1.69) трансформується на глюкозу-6-фосфат, де остання за допомогою глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) та трансформується на β -D-фруктозу 6-фосфат. Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перебудову β -D-фруктози-6-фосфат у β -D-фруктозу-1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β -D-фруктозу 1,6-фосфат зумовлює трансформацію її на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат.

До наступного катаболізму глюкози включається гліцеральдегід-3-фосфат, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється у гліцерат-1,3-фосфат, що за допомогою фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат-3-фосфат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат-3-фосфат стимулює його перетворення на гліцерат-2-фосфат. За допомогою енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат-2-фосфат перетворюється на фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

					НУХТ БТЕК 04.02.32 ДП ПЗ			
<i>Зн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Розроб.</i>		Терещук.Д.О						26
<i>Керівник</i>		Волошина.І.М				Кафедра БТМ		
<i>Консультант</i>								
<i>Зав.каф.</i>		Пирог Т.П.						

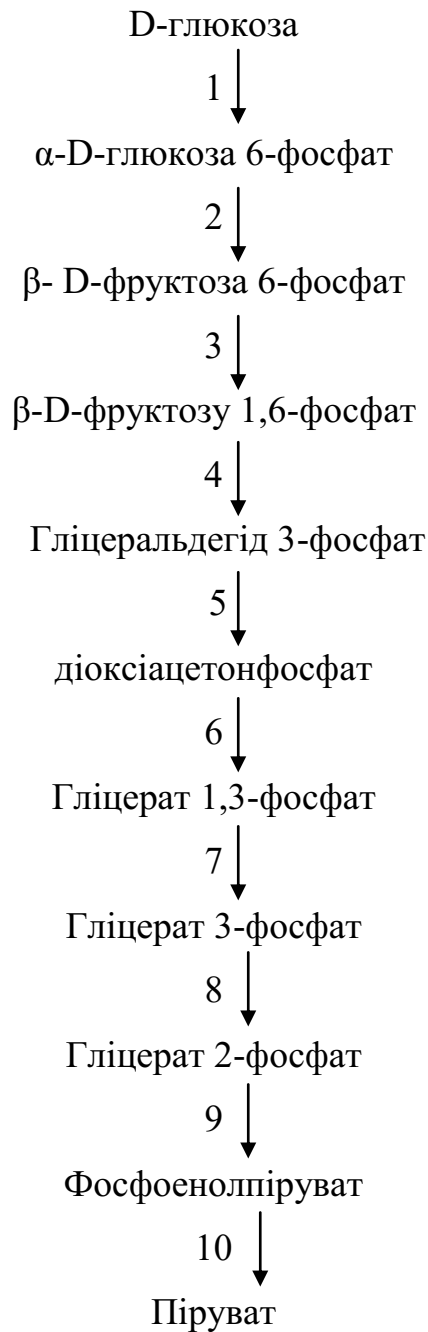


Рис 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Меейргофа-Парнаса

Ферменти:

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

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Першою реакцією на шляху утворення пуринових нуклеотидів є утворення 5-фосфорибозил-1-пірофосфату (ФРПФ). Субстратами цієї реакції є АТФ і рибозо-5-фосфат. Утворений фосфорибозилпірофосфат взаємодіє із глутаміном

На стадії 3 відбувається реакція між рибозофосфатаміном та гліцином. Вона каталізується рибозофосфатгліцинамідсинтетазою. Наслідком цієї реакції є гліцинамідрибонуклеотид. На утворення амідного зв'язку використовується одна молекула АТФ. Нарощування ланцюга відбувається в трансформілазній реакції, яка проходить між альфа-аміногрупою залишку гліцину та N-метилентетра-гідрофолієвою кислотою. Реакція супроводжується утворенням форміл-гліцинамідрибонуклеотиду (стадія 4). У наступній реакції (5) утворений амідний зв'язок рибонуклеотиду при наявності АТФ перетворюється в амідинову групу. Продуктом цієї реакції є N-формілгліцинамідинрибонуклеотид. Перетворення одержаного продукту призводить до формування циклічного імідазольного кільця 5-аміноімідазолрибонуклеотиду (6 реакція). Подальші перетворення цього напівпродукту супроводжуються формуванням 6-членного піримідинового кільця, з'єднаного з імідазольним, тобто утворенням пуринового скелета. Цей процес відбувається таким чином: спочатку в результаті карбоксилювання 5-аміноімідазолрибонуклеотиду утворюється 5-аміноімідазол-4-карбоксинуклеотид (7 стадія). У восьмій реакції карбоксильна група цього продукту реагує із NH₂ аспарагінової кислоти з утворенням 5-аміноімідазол-4-ГЧ-сукциніл-арбоксиамідрибонуклеотиду. Ця реакція вимагає енергії АТФ і здійснюється під впливом специфічної синтетази. У наступній реакції вуглецевий скелет аспарагінової кислоти відокремлюється у вигляді фумарової кислоти й утворюється 5-аміноімідазол-4-карбоксиамідрибонуклеотид (реакція 9), тобто із аспарагінової кислоти в пуринове кільце входить тільки атом азоту. Останній атом вуглецю пуринового кільця буде у вигляді формілу, що походить із N 10-формілтетрагідрофолієвої кислоти (реакція 10).

Утворений 5-формілімідоімідазол-4-карбоксамідрибонуклеотид зазнає дегідратації, циклізується і перетворюється в пуриновий нуклеотид — інозинову кислоту (реакція 11). Донором аміногрупи при синтезі АМФ служить аспартат, а для ГМФ — глутамін (рис. 13). Реакції амінування вимагають затрати енергії; при синтезі АМФ використовується ГТФ, при утворенні ГМФ — АТФ (табл. 7).

Ключові ферменти для біотрансформації інозину:

КФ 3.1.3.25- інозитол-1-монофосфатаза

КФ 1.1.1.18- оксидоредуктаза

КФ 4.2.1.44- інозодегідротаза

КФ 1.1.1.370- оксидоредуктаза

КФ 1.1.1.- сукцилоінозитол-2-дегідрогеназа (НАДФ +)

КФ 1.1.1.369- міоінозит-2-дегідрогеназа

КФ 5.3.9.911- 2-кетоміоінозитолізомераза

КФ 3.7.1.22- 3D- (3,5,4) -тригідроксциклогексан-1,2-дионацилгідролаза

КФ 5.3.1.30-5-дезоксиглюкуронатізомераза

КФ 2.7.1.92- 5-дегідроглюконокіназа

КФ 3.1.3.8- 3-фітаза

КФ 4.1.2.29- 6-фосфо-5-дегідроглюконоальдолаза

КФ 1.2.1.18- малонатальдегідрогеназа

КФ 5.3.1.1- триозофосфатізомераза

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

Біотехнологічне виробництво утворює технологічний процес, який умовно можна розділити на декілька основних блоків, визначити послідовність їх виконання та виявити вже існуючі між ними зв'язки. Ця послідовність є основою технологічної схеми виробництва і представляє собою блок-схему.

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Планувати всі допоміжні стадії виробництва необхідно врахувати всі особливості культивування продуцента діючої речовини - інозину *Bacillus subtilis* ВНИИ-48. Зважаючи на те, що оптимальними умовами росту для штаму ВНИИ-48 є температура 30°C та нейтральне (6,6-6,8) значення рН, процес культивування повинен проходити в асептичних умовах, щоб звести до мінімуму ризик контамінації сторонньою мікрофлорою.

Отже, на етап вибору миючих засобів прямий вплив мають всі вище перелічені умови та завжди потрібно враховувати всі особливості культивування *Bacillus subtilis* ВНИИ-48, щоб як наслідок не відбулася контамінація.

5.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера

Спосіб культивування *Bacillus subtilis* повинні обирати на основі фізіолого-біохімічних ознак продуцента. *Bacillus subtilis* росте на МПА, МПБ, а також на середовищах, що містять рослинні залишки, на простих живильних синтетичних середовищах для гетеротрофів.

Ця бактерія є хемоорганогетеротроф, амоніфікує білки, має здатність розщеплює крохмаль, глікоген. Ріст штаму відбувається при діапазоні температур від 35 до 37°C, оптимальною для росту температура 37±1°C. Ріст штаму відбувається на середовищах з таким значенням рН від 7,0 до 7,5, з оптимальним значенням 7,0 – 7,2.

					НУХТ БТЕК 04.02.32 ДП ПЗ		
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми		
Розроб.		Терещук.Д.О					
Керівник		Волошина.І.М					
Консультант							
Зав.каф.		Пирог Т.П.					
					Літ.	Арк.	Акрушіє
						31	30
					Кафедра БТМ		

В мікробіологічній промисловості найбільш поширеними є два способи культивування мікроорганізмів – глибинний та поверхневий. Глибинне культивування має певний ряд переваг перед поверхневим, адже дозволяє зменшити виробничі площі, виключити зі списку тяжку ручну працю (високий рівень автоматизації), спрощує та покращує механізацію, автоматизацію виробництва, покращує гігієну праці та робить можливий перехід на безперервний спосіб культивування. При глибинному способі культивування більш логічно використовувати поживні середовища, що дають можливість зменшити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів та отримувати активні вторинні метаболіти.

Метод глибинного культивування відрізняється від поверхневого тим, що мікроорганізми-продуценти вирощують не на поверхні поживного середовища, а у всій її товщі. Вирощування продуцентів відбувається у спеціальних ферментерах, ємність яких може перевищувати 50 м³. Ферментери забезпечені спеціальними трубопроводами для продування повітря у живильне середовище та мішалкою. Розвиток мікроорганізмів-продуцентів в ферментерах здійснюється при безперервному перемішуванні поживного середовища та своєчасної подачі кисню (повітря). При глибинному вирощуванні у порівнянні з поверхневим у багато разів збільшується накопичення біомаси (з розрахунку на одиницю об'єму поживного середовища).

Тому важливим є визначення таких запропонованих умов:

- ✓ для культивування *Bacillus subtilis* необхідно створити подачу кисню, адже продуцент є аеробом. Для забезпечення такого ряду умов використовують барботер для подачі кисню та перемішувач для масообмінних процесів.

Спосіб культивування *Bacillus subtilis* ВНИИ-48– продуцента інозину.

Оскільки оптимальною температурою для культивування в поживному середовищі аеробного штаму *Bacillus subtilis* ВНИИ-48 є 30°C, а оптимальним значенням рН є 6,6-6,8 то наявний ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами. Це свідчить про

необхідність дотримання асептичних умов під час біосинтезу, яке в свою чергу не можливо досягти при поверхневому культивуванні. Асептичні умови забезпечуються такими діями: стерилізацією обладнання і комунікацій, аераційного повітря та поживного середовища,. Для того щоб запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск. [2]

В результаті визначення впливу температурного чинника було виявлено, що характер біосинтезу є двофазним: при цьому перша фаза характеризується значним зростанням культури, який завершується до 48 годинах ферментації; до початку другої фази відбувається більш активне накопичення інозину . Температура вирощування посівного матеріалу має істотний впливає на розвиток культури [6].

Під час ферментації постійно контролюють споживання глюкози. Для підтримки рН на рівні 6,6-6,8 періодично додають 25%-вий розчин аміаку: так як робочий об'єм поживного середовища становить 3,2 м³, то кількість допоміжного розчину, якого необхідно простерилізувати та внести - 2 мл на 1 л середовища, тобто 16 л.

Отже, культивування *Bacillus subtilis* ВНИИ-48 здійснюється в аеробних умовах, глибинним способом у періодичному режимі протягом 85 годин при дотриманні усіх правил асептики, тому що даний метод є більш вигіднішим та дає максимальний вихід кінцевого продукту. [7]

Обґрунтування типу ферментера

Основним апаратним елементом біотехнологічного процесу є біореактор, тобто ферментер. Основним призначенням біореакторів є:

- культивування мікроорганізмів;
- накопичення біомаси;
- синтезу цільового продукту.

До ферментерів висувають такі вимоги – процес культивування продуцента повинен відбуватися в стерильних умовах при інтенсивній аерації поживного середовища. В ферментерах повинні бути забезпечені оптимальні масообмінні та гідродинамічні умови.

Всі види та форми ферментаційних систем будується, беручи до уваги основну мету: підтримання однакових умов для всіх компонентів, що знаходяться у реакторі. Ферментер повинен бути побудований так, щоб виключити можливість коніамінації, а також забезпечити збереження потрібної нам мікрофлори. Об'єм культуральної рідини повинен бути сталим. Рівень розчинного кисню обов'язково повинен підтримуватися вище критичних рівней керування культури аеробних мікроорганізмів; параметри зовнішнього середовища, такі як рН, температура та інші також повинні постійно контролюватися. Культура при вирощуванні в ферментері має добре перемішуватись [10].

Основним завданням апаратів для глибинної ферментації є забезпечення високої інтенсивності енерго- і масообміну клітин із поживним середовищем. За своєю структурою потоків, ферментери можуть бути апаратами повного витіснення або повного переміщування [6].

Конструктивні відмінності ферментерів визначаються зазвичай способами аерації середовища та підвода енергії: з підведенням енергії до рідкої фази; з підведенням енергії до газової фази та комбінованим підведенням енергії.

Ферментери, що працюють з підведенням енергії до газової фази.

В апаратах даного типу аерація та перемішування культуральної рідини відбувається за допомогою стисненого повітря, що подається у ферментер під певним тиском. До даного типу ферментерів відносять [6]:

- барботажні біореактори, в яких подача повітря відбувається через барботажні пристрої, які розташовані у нижній частині апарату;
- ерліфтні аератори, що в своєму складі мають внутрішній циліндр-дифузор, що забезпечує перемішування по розподільних трубах до нижньої частини апарату;
- газліфтні, які складаються з реактора кожухотрубчатого типу, в якому рідина потоком повітря переходить до верхньої частини апарату і,

потрапляючи до сепаратора, повертається назад до реактора, де знову захоплюється потоком повітрям та створюючи таким чином циркуляцію;

- Біореактори з форсунковим повітрярозподільником;
- Біореактори колонного типу, що являють собою циліндричну колону, що розділена горизонтальними перегородками на секції;

Біореактори з підведенням енергії до рідкої фази. До таких апаратів належать:

- ферментери із самозасмоктувальною турбіною;
- реактор із турбоежекторними пристроями. [13]

Ферментери здебільшого представляють собою герметичні циліндричні ємності, а висота в 2-2,5 рази перевищує діаметр. Як правило, їх виготовляють із нержавіючої сталі. Для підтримання температури апарат обладнаний кожухом або теплообмінником типу змійовика.

Тип біореакторів для кожного біотехнологічного процесу обирають із врахуванням таких вимог: властивостей середовища, специфіки продуцента та економічних міркувань. Важливе значення для аеробного процесу має система аерації. При цьому завжди контролюють швидкість надходження кисню із рідиною та його масопередачу від газової фази, а також швидкість споживання мікроорганізмами кисню та його своєчасного видалення разом із відпрацьованою рідиною. [7]

Культивування *Bacillus subtilis* ВНИИ-48 передбачається здійснювати за допомогою глибинного способу у ферментері. У представленій роботі обирається ферментеру з механічним перемішуванням барботажного типу.

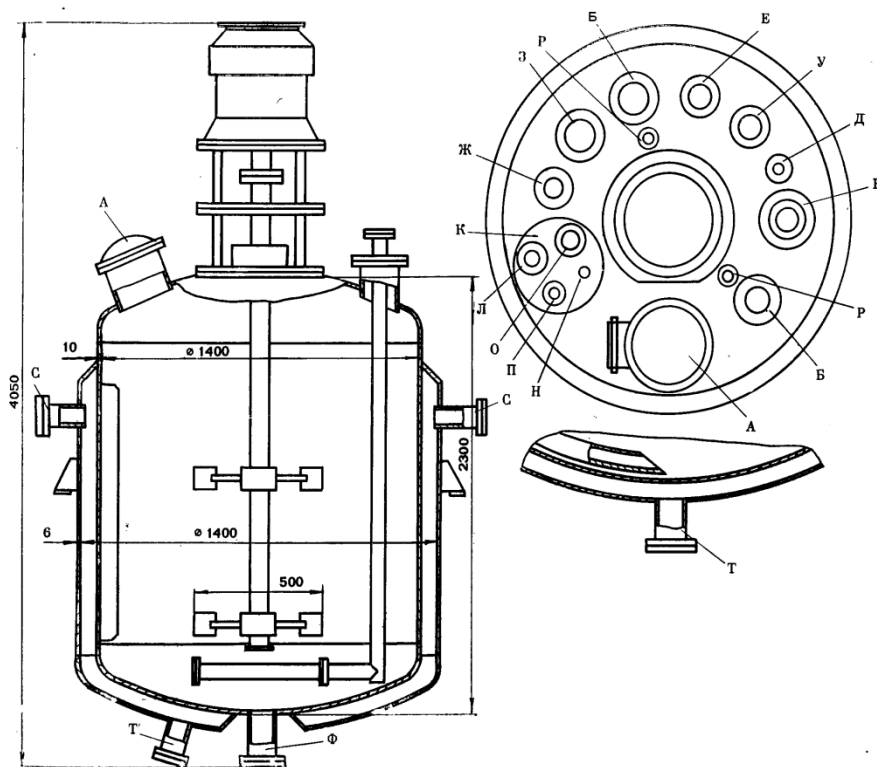


Рис 5.1 Ферментер для глибинного культивування мікроорганізмів [13].

А – люк; Б – оглядове вікно; В – для труби барботера; Д – для завантаження піногасника; Е – завантаження поживного середовища та посівного матеріалу; Ж – для посіву; З – для труби передавлювання; К – резервний; Л – для взяття проби; Н – для манометра; О – для гільзи ртутного термометра; П – для термометра опору; Р – для очистки оглядових вікон; С – для входу охолоджуючої води чи пару; Т – для виходу конденсата чи охолоджуючої води; У – для виходу повітря; Ф – для нижнього спуску

Проведення культивування *Bacillus subtilis* ВНИИ-48 є обов'язковим за наявності аерації середовища та інтенсивного перемішування, для того щоб забезпечити кращий доступ кисню до клітини. При цьому процес культивування ведуть таким чином, щоб швидкість розчинення кисню становила 250 об./хв. [6]

Ферментер, що представлений в даній роботі оснащений спеціальними пристосуваннями для досягнення достатньої аерації та перемішування культури, підтримання необхідної температури в реакторі, окрім того наявні контрольні-вимірювальні прилади.

Аерація відбувається за рахунок подання стерильного, підігрітого до необхідної для процесу температури повітря через барботер та перемішування культуральної рідини за допомогою мішалки. При цьому відбувається значно краще розчинення кисню за рахунок того, що відбувається краще диспергування в середовищі. За рахунок наявності відкритих турбінних мішалок та повітря, що подається за допомогою барботера, досягається достатній рівень масообміну.

Ферментери із механічним перемішуванням використовують найчастіше, тому що вони дають змогу легко та просто змінювати технологічні умови і ефективно постачати до клітин повітря, що визначає біосинтетичну здатність мікроорганізмів та їх характер розвитку.

Підтримання потрібної температури, оптимальної для росту продуцента інозину та виявлення їм підвищеної фізіолого-біохімічної активності, забезпечується за рахунок сорочки ферментера. На відміну від барботажно-ерліфтних та барботажних ферментерів, запропонований для процесу апарат має високі масообмінні показники по кисню, а також в ньому можна легко обирати режими масообміну та перемішування, окрім того суттєво менші є витрати стерильного повітря, порівняно велика частка робочого об'єму, забезпечується за рахунок рівномірного розподілу мікроорганізмів та вмісту компонентів поживного середовища.

Контроль за основними процесами життєдіяльності мікроорганізмів виконується контрольно-вимірювальною апаратурою, за рахунок чого дозволяється підтримувати на заданому рівні такі показники

- температуру всередині ферментера;
- рН середовища;
- витрати повітря;
- тиск всередині ферментера та інші параметри.

Ферментер оснащений пристосуваннями для перенесення інокуляту, додавання до середовища додаткових поживних речовин, необхідних для

покращеного розмноження та росту продуцента та спеціальним пристроєм для взяття проб.

Для забезпечення стерильного процесу під час ферментації в обраному біореакторі передбачено використання торцевих ущільнень валу перемішуючого пристрою із паровим захистом. За рахунок використання такої конструкції вдається практично зовсім запобігти потраплянню атмосферного повітря в апарат, в тому числі дана характеристика є дуже важливим показником для збереження асептичних умов культивування. [7]

Для культивування використовують Ферментер фірми Tankki OY

Фірма Tankki OY, було засновано у 1968 р., проектує та виробляє із нержавіючої сталі ферментери для фармацевтичної промисловості. Об'єм — 6300 л. На рис. 2. показано зовнішній вигляд. Загальні технічні характеристики: максимальна робоча температура становить +150 °С, потужність двигунів становить від 3 до 15 кВт та максимальна швидкість обертання перемішувального пристрою є 1000 хв⁻¹.



Рис.5.2. Ферментер фірми Tankki OY (Фінляндія)

Області застосування:

- мікробіологія: для культивування бактерій;
- культури клітин: для культивування клітин рослин та тварин
- маломасштабної виробництва моноклональних антитіл та білків
- навчальні та дослідні процеси

Особливості:

- управління показниками рН, температурою, рівнем розчиненості кисню, швидкістю обертів мішалки, рівнем піни та субстратом;
- 2-х стадійний контролер рівня розчиненості кисню. [16]

5.1.2. Підготовка аераційного повітря.

Згідно всіх характеристик *Bacillus subtilis* ВНИИ-48 є аеробом, тому однією з основних умов для розвитку та синтезу цільового продукту є своєчасної подачі до ферментеру стерильного аераційного повітря.

Підготовка аераційного повітря складається з таких обов'язкових стадій:

- забір атмосферного повітря відбувається за допомогою спеціальної вертикальної труби із повітро-забірником у найвищій точці Н~15 м (висота стелі будівлі становить 8,3 м, висота поверху~9 м, разом із косим дахом будівлі приблизно 11м, відбір повітря повинен відбуватися на 2-3 м вище від найвищої точки будівлі, де встановлено обладнання для стиснення і очищення повітря;
- очистка повітря від пилу та від механічних домішок ($\delta > 50$ мкм) здійснюється на пласких тканинних фільтрах грубого очищення;
- стиснення повітря відбувається на компресорах або турбоповітродувках (при цьому повітря нагрівається приблизно до температури 120-200⁰С);
- охолодження стисненого повітря відбувається до температури «точки роси», за рахунок якої волога, що міститься в повітря конденсується (використовують зазвичай водяні теплообмінники різного типу: «труба в трубі», кожухотрубно тощо);
- видалення парів мастила і конденсованої вологи, що потрапили з компресора відбувається у ресивері; окрім того ресивер зменшує пульсації руху повітря та стабілізує його;
- стабілізація таких показників як температура та тиск, за допомогою підігріванням до температури приблизно 45-50⁰С паром у відповідних теплообмінниках;

- очистка, яка проходить на головних ємнісних набивних фільтрах до ступеня очищення, що становить $E=95\%$. Головні фільтри, як правило, встановлюють поблизу ферментаційних відділень;
- очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів, встановлених на ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E 99,99\%$. [21]

5.1.3. Обґрунтування вибору мийних і дезінфікувальних засобів для культивування *Bacillus subtilis* ВНИИ-48

Для того, щоб вибрати дезінфікувальні та мийчі засоби, необхідно врахувати їх вартість та витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. На 1 м^2 затрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікуючого засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 15.11.2001 №502).

Ємнісне обладнання миють автоматичною мийкою СИП, при цьому витрати мийного засобу складають 20% від загального об'єму обладнання. Враховуючи це, для миття обладнання необхідно:

$$272,133 \times 0,2 = 54,626 \text{ м}^3 \text{ мийного засобу на рік.}$$

Ферментер та збірник на $6,3 \text{ м}^3$ тримається на валах та для зручності будується майданчик обслуговування, який також передбачає місце для зняття кришки ферментера та збірника. Цей майданчик також потребує миття 100 днів в рік (щоб в нас під час виробництва не відбулося контамінації). Обслуговуюча площа складатиме 225 м^2 та буде внесена до наступних розрахунків, площа миття майданчика в рік складатиме $225 \times 100 = 22500 \text{ м}^2$.

Обґрунтування мийчих засобів для обладнання

Для того щоб не відбулася контамінація під час культивування перед початком процесу все технологічне обладнання, яке використовується дезінфікують та миють. До дезінфікуючих та мийчих засобів висувають наступний ряд вимог:

1. повинні мати високу протимікробну активність відносно всіх збудників інфекційних, вірусних та паразитарних захворювань;
2. повинні мати невисоку токсичність для людей та не пошкоджувати слизові оболонки та шкіру;
3. бути дешевим та дієвим;
4. не мати неприємного запаху та не бажано властивостей барвників;
5. мати швидку і тривалу дію;
6. не повинні пошкоджувати предмети, які підлягають миттю та дезінфекції.

Серед багатьох відомих миючих та дезінфікуючих засобів було обрано такі засоби засоби, які забезпечують всі вище перелічені умови та із виконаних розрахунків було вибрано 3 миючих засоби для генерального прибирання (з розрахунку 1 засіб на один місяць). Це обґрунтовується тим, щоб мікроорганізми не мали резистентності до обраних миючих засобів та не відбулося контамінації, адже все це істотно вплине на проведення технологічного процесу.

Нижче наведено коротку характеристику про кожний обраний миючий засіб.

Біомой - це багатокомпонентний біоактивний миючий засіб, який має дезінфікуючий ефект (ТУ У 22902465.005-96). Даний розчин являє собою порошок зі світлих тонів. Добре та швидко розчиняється у воді (розчинність становить не менше 30 г/дм³). Обраний миючий засіб може використовуватися при митті такого ферментаційного обладнання як: комунікації та інвертар. [25]

Каустична сода - першокласний універсальний дезінфектант, який володіє бактерицидним ефектом, що засноване на сильних лужних характеристиках. Широко застосовується для хімічної дезінфекції інвентарю, приміщень і обладнання. У вигляді 2-3% го гарячого (70°C) розчину швидко справляється із великою кількістю інфекцій, що спричинені різними вірусами та бактеріями. Охарактеризований миючим розчин підходить до обробки такого обладнання: інвертар та комунікації. [24]

Гембар – це економічно вигідний препарат для дезінфекції інвентарю поверхонь та посуду. В своєму складі не має фенолу, лугу, альдегиду,

хлорпохідних та окислювальних сполук. Розчин являє собою 25%-вий концентрат. Даний розчин володіє такими властивостями: пролонгована бактерицидна, віруліцидна та фунгіцидна дію. [28]

Обґрунтування миючих засобів для оброблення стін, підлоги та вікон

Вибір та обґрунтування миючого засобу для вікон, підлоги, стін займає важливе значення, адже те, як і яким миючим засобом обробляється виробничі приміщення в кінцевому етапі впливає на процес виробництва та якість вихідної продукції.

Аналізувавши весь процес виробництва раціонально буде проводити прибирання таким чином: щоденне прибирання буде відбуватися за допомогою води–вологе і генеральне прибирання буде проводитися з розрахунку раз на місяць (а отже, виходячи із розрахунків 3 рази за весь цикл виробничого процесу). Було обрано такі миючі засоби, які є кращими порівняно з іншими аналогами.

Нижче наведено коротку інформацію про кожен миючий засіб вибраний для даного виробничого процесу.

Катамін - це дезінфекційний засіб виробництва фірми ЗАО НПФ «Бурсинтез» (Росія). За зовнішніми показниками являє собою білий порошок. Після висихання дезінфікуючого розчину на оброблених поверхнях не спостерігається утворення плівки. Зберігають даний засіб у щільно закритих ємностях за кімнатної температури і недоступними до загального користування. Обраний дезінфікуючий засіб може використовуватися при обробці комунікації, ферментаційного обладнання та інвентарю. [27]

Хлор Ліквід - це універсальний концентрований рідкий дезінфікуючий засіб, що складається з комплексу допоміжних функціональних компонентів та гіпохлориту натрію.

Призначення: дезінфекція та одночасне миття поверхонь приміщень. [26]

Бланідас Актив - це професійний засіб для дезінфекції на основі хлору «Бланідас 300». Зарекомендував себе, як один з найбільш ефективних та

економічно вигідних для проведення дезінфекції та очищення всіх поверхонь. Застосовується для очищення вікон, стель та стін. [29]

Вартість концентратів мийних, дезінфікуючих засобів та їх витрати при виробництві наведено в *табл. 5.3*.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва інозину

Таблиця 5.3

Назва мийного/ дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн.	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода	Обладнання	2,0	272,133	54,426	45	0,9	48, 983
Катамін*	Обладнання	1	272,133	54,426	86	0,86	46,807
Супераль	Обладнання	5,0	272,133	54,426	52	2,6	141,509
Біомой	Обладнання	0,3	272,133	54,426	117	3,51	191,038
Хлор Ліквід	Стіни, підлога, вікна, двері	7	26610	2661	68	4,76	259,070
<u>Гембар</u>	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5	26610	2661	432	21,6	1,176,615
Бланідас Актив	Стіни, підлога, вікна, двері	6	26610	2661	330	19,8	1,077,647

Примітка. Ціни наведено станом на вересень 2019 р.: <https://prom.ua> .

*Приклад розрахунку вартості 1 л робочого розчину мийного засобу «Катамін»: Вартість 1 л засобу складає 86 грн, концентрація його робочого розчину - 1 %, що говорить про те, що в 1000 мл робочого розчину – 10 мл (0,01 л) концентрату. Отже, $86 \times 0,01 = 0,86$ грн/л робочого розчину.

Аналогічно розраховують вартість 1 л робочого розчину для решти миючих та дезінфікуючих засобів.

Отже, проаналізувавши *таблицю 5.3.*, для миття обладнання доцільно буде використовувати каустичну соду, адже даний миючий засіб не залишає розводи на внутрішній частині ферментера та легко видаляється з нього. Для миття стін, підлоги, вікон та дверей обираємо Біомой, оскільки враховуючи концентрацію даних розчинів та їх вартість на один літр (кілограм), витрати на придбання для всього виробничого процесу становлять найменше та даний розчин швидко видаляє забруднення. Також потрібно брати до уваги те, що дані миючі засоби не мають стороннього запаху та не є шкідливими для персоналу.

Кожні 3 місяці миючі засоби необхідно змінювати, для того щоб не відбувалося утворення резистентних штамів мікроорганізмів.

Обґрунтування стадії підготовки обладнання та комунікацій

Підготовка обладнання і комунікацій включає в себе ряд таких послідовних операцій::

- ❖ миття устаткування;
- ❖ технічний огляд і перевірка на герметичність;
- ❖ стерилізація обладнання;
- ❖ Підготовка аераційного повітря до технологічного процесу.

Миття устаткування. Для того щоб помити ємнісне обладнання віддаємо перевагу циркуляційній СІР-мийці (Cleaning in place (Україна). Вибір такого типу обладнання зумовлюється такими перевагами [22]:

- ✓ можливість мити одночасно та швидко декілька об'єктів;

- ✓ можливість збору та зберігання води, що використовується для ополіскування обладнання;
- ✓ автоматичне підтримання концентрації миючого засобу та температури;
- ✓ нагрів води в малому контурі економить енергію, воду і час.

Миття виробничого устаткування проводять за такою послідовністю. Спочатку миття обладнання відбувається водою на протязі двох хвилин та з наступною передачею води у збірник для нейтралізації, перед тим як відправити рідину до каналізаційної системи. Миття обладнання продовжується розчином луку 1%, приблизно протягом 10 хвилин при температурі 40°C, з поверненням розчину в збірник для подальшої нейтралізації. Проводиться ополіскування очищеною чи пом'якшеною водою та наступною передачею води до збірника для нейтралізації;

В тому випадку коли в обладнанні присутні стійкі для видалення забруднення миття проводять розчином кислоти 1% з температурою 20 °C, з повертанням розчину у збірник для подальшої нейтралізації та проводять ополіскування пом'якшеною чи очищеною водою, з передачею води до збірника для нейтралізації; весь процес завершується ополіскуванням очищеною водою, приблизно протягом 5 хвилин та з повертанням води до збірника рециркуляційної води.

Технічний огляд та перевірка на герметичність. Якщо запустити ферментер для технологічного процесу та не провести технічний огляд можуть виникнути такі проблеми, як деформація ферментера (псування ферментаційного обладнання. Це пов'язано з тим, що при роботі можливі нещільності у місцях з'єднання, тобто проблеми із герметичністю ферментера.

З цього можна зробити висновок, що обов'язковим елементом є профілактичний огляд та перевірку на герметичність обладнання. Як правило, завжди така перевірка проводиться перед стерилізацією, коли можна виявити можливі не ущільнення у місцях з'єднання елементів обладнання і апаратури. Перевірка на герметичність всього ємкісного обладнання, з'єднань та

комунікацій буде виконуватися за допомогою найбільш простого, доступного та зручного методу - збільшення тиску в апараті за допомогою омилування звичайним розчином господарського мила. Та в ході роботи будуть спостерігати наявність чи відсутність виділення бульбашок, тобто наявність нещільності.

Якщо в ході процесу було виявлено нещільність з'єднань будуть виконувати розбір та профілактичне ущільнення комунікації і обладнання. Для з'єднань комунікацій проводять їх підтягування та перепаккування, а для обладнання підтягування кришок чи з'єднань та при необхідності заміну ущільнюючих прокладок кришок та люків. Для ущільнюючого матеріалу можна використовувати термостійку гуму, фторопласт чи пароніт тощо. [21]

Стерилізація. Один із головних етапів підготовки ємнісного обладнання та комунікацій займає стерилізація та є невід'ємним компонентом загальної підготовки технологічного процесу. Ця операція займає принципове значення для забезпечення асептичних виробництв.

Одним із основних факторів, що істото впливає на біотехнологічний процес є забезпечення стерильності виробництва, зокрема стерильності ємнісного обладнання та комунікацій, що безпосередньо контактує із культуральною рідиною.

Адже, якщо не провести стерилізацію обладнання, то ризик контамінації на виробництві істотно зростає.

Тому стерилізація ферментаційного обладнання та іншого обладнання де можливе розмноження не бажаної мікробіоти, відбувається гострою парою, тобто пара, яка безпосередньо має контакт із об'єктами стерилізації, $t = 130-135^{\circ} \text{C}$, за тиску 0,3 МПа приблизно протягом 1,5 год та подальшим охолодженням протягом 3,5 год. Гостра пара подається не лише в середину апарату, але і в прилеглі комунікації та в сорочку обладнання. В ході процесу стерилізації утворюється водяна пара, але вона в своєму складі не має шкідливих для процесу біосинтезу речовин та основні продукти, що

утворюються після процесу стерилізації становить вторинна водяна пара та конденсат. [21]

Після закінчення циклу біосинтезу в ферментері, відбувається видалення з них культуральної рідини, миття гарячою водою та очищаючи від залишків біомаси.

Перед початком стерилізації комунікації та апаратуру обполіскують водою з температурою 100 °С за допомогою магістрального трубопроводу. Одночасно відбувається стерилізація фільтрів тонкого очищення повітря (в свою чергу стерилізуються індивідуальні фільтри) та повітряні комунікації, відпрацьований пару подають назад у ферментер. Стерилізація фільтрів відбувається 1 годину під надлишковим тиском приблизно 0,12–0,15 МПа. Окрім того в процесі стерилізації будемо використовувати розчин активованого хлорного вапна та комбінувати з процесом пропарювання. Для цього процесу обмитий виробничий ферментер об'ємом 6,3 м³ спочатку заповнюють холодною водою та при перемішуванні повітрям додають приблизно 20—25 кг хлорного вапна. В такій самій кількості хлориду амонію, доливають водою до повного об'єму та інтенсивно перемішують протягом 30 хв. Після 1,5 год витримки розчин перекачують за допомогою насоса у вільний, ферментер, в якому можлива стерилізація або зливають у каналізацію. [21]

5.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу інозину використовується середовище із наступним складом (г/л):

- Глюкоза – 140;
- Кукурудзяний екстракт - 0,5;
- ББК - 25;
- MgSO₄ - 2;
- NH₄NO₃ - 20;
- CaCO₃ - 20;

Для забезпечення ефективного процесу підготовки поживних середовищ для посівних апаратів об'ємом 60 та 630 л та виробничого ферментера 6,3 м³ солі стерилізують разом, також для підтримання рівня рН в межах норми (6,6-6,8) до солей додається 25% розчин аміачної води.

Також додати всю глюкозу ми не можемо, адже дана кількість є занадто великою, через велику концентрацію, тому в нас буде відбуватися дробне внесення глюкози. [7]

Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Bacillus subtilis* ВНИИ-48, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: глюкоза (112°C, 30 мин, 0,05 МПа)

В даному випадку для стерилізації глюкози використовується температура 112°C, тому що вміст сухої речовини – 40 % і в даному випадку вона не вимагає таких високих температур оскільки її концентрація вже є несприятливою для росту та розмноження мікроорганізмів. Також за рахунок високої температури глюкоза може карамелізуватися. [7]

Композиція Б: БВК і кукурудзяний гідролізат (112 °С , режим стерилізації 0,05 МПа атм, 30 мин).

Дана композиції вимагає менших температур для того щоб всі мікроелементи збереглися.

Композиція В: NH₄NO₃ , MgSO₄ (131 °С, режим стерилізації, 0,15 МПа, 40 мин).

Композицію В для повної стерилізації вимагає більш високих температур та при взаємодії вони не випадають в осад.

Композиція Г: CaCO₃ (131 °С, режим стерилізації, 0,15 МПа, 40 мин).

Крейда стерилізується окремо та вимагає високої температури. Суспендується у воді для кращого розчинення .

Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 60 та 630 л

Оскільки об'єми поживних середовищ занадто великі для стерилізації в автоклаві, їх треба стерилізувати безпосередньо в посівному апараті. Перед кожним посівним апаратом буде розміщено збірник відповідного об'єму для приготування композиції. Це вимагає перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: глюкоза, кукурудзяний гідролізат, БВК (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: NH_4NO_3 , MgSO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40хв, рН 4,0 – 4,5).

Стерилізація композиції Б відбувається в апараті, тому що умови стерилізації є жорсткішими, ніж для композиції А.

Композиція В: CaCO_3 (131 °С, режим стерилізації, 0,15 МПа, 40 мин).

Крейда стерилізується окремо та вимагає високої температури. Суспендується у воді для кращого розчинення . [7]

Виробниче культивування в ферментаторі на 6,3 м³

Середовище ділять на такі композиції:

Підживлюючий розчин глюкози: глюкоза, (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція А: кукурудзяний гідролізат, БВК (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: NH_4NO_3 , MgSO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40хв, рН 4,0 – 4,5).

Стерилізація композиції Б відбувається в апараті, тому що умови стерилізації є жорсткішими, ніж для композиції А.

Композиція В: CaCO_3 (131 °С, режим стерилізації, 0,15 МПа, 40 мин).

Крейда стерилізується окремо та вимагає високої температури. Суспендується у воді для кращого розчинення .

Композиція Г: глюкоза, (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Інозин є ендометаболітом, тобто діюча речовина накопичується в основному в клітині, тому для того щоб отримати діючу речовину нам потрібно зруйнувати клітину.

При виборі методу виділення та очищення інозину необхідно враховувати наступні фактори:

1. Фізико-хімічні властивості культуральної рідини;
2. Властивості продукту (термолабільність, стійкість до різних хімічних агентів);
3. Вимоги до кінцевої форми продукту (ступінь чистоти).

Отже, технологія виробництва ферментних препаратів високої чистоти включає такі основні етапи:

5.2.1. Обґрунтування способу відокремлення біомаси

Культуральна рідина після біосинтезу містить, окрім інозину, біомасу продуцента і продукти його життєдіяльності. Тому першою стадією для виділення цільового продукту є відділення біомаси продуцента, адже основну увагу для нас становить культуральна рідина, а не біомаса.

Існує велика кількість способів відокремлення біомаси продуцента від рідкої суспензії середовища, зокрема такі як осадження, фільтрування, флотація, центрифугування та сепарування,.

Перевагами флотації є:

- економічність,
- висока продуктивність;
- можливість використання при безперервних процесах [4].

Даний метод часто використовують при виробництві продуктів на основі біомаси, а для одержання супернатанту культуральної рідини флотацію не доцільно використовувати, оскільки відбувається неповне відділення біомаси,

її частина залишається в культуральній рідині, і заважатиме подальшому очищенню продукту [5].

Перевагами методу фільтрації є:

- Менші енергозатрати;
- Простота та зручність методу;
- Селективність.

Проте наявні такі істотні недоліки, зокрема:

- Відбувається прилипання клітин до фільтра та утворений шар знижує швидкість потоку рідини при процесі фільтрування;
- фільтрація займає велику кількість часу та є енергоємним процесом, а виходячи із об'ємів культуральної рідини даний метод не є актуальним;
- потрібно регулярна заміна фільтруючих перегородок.

При фільтрації культуральної рідини питомий опір драглистого осаду, що утворюється у процесі є великим. Навіть тонкий шар осаду, що залишається після зрізання ножом, може призвести до різкого зниження швидкості процесу фільтрації [4].

Сепарування використовується при розділенні, концентруванні, очищенні, прояснюванні та для поетапної обробки рідини, наприклад, послідовного відділення грубодисперсного осаду від тонкодисперсних суспензій.

Але істотним недоліком даного способу є те, що швидко забиваються мундштуки та між тарілчастий простор механічними включеннями й мертвими клітинами бактерій [5].

Центрифугування у порівнянні з іншими методами відділення біомаси мають такі переваги:

- а) швидке відокремлення біомаси бактерій;
- б) здійснюється максимальне відділення культуральної рідини від біомаси та залишків компонентів поживного середовища;
- в) висока продуктивність;

г) застосування для суспензій із високою концентрацією твердих частинок в середовищі[4].

Найбільш досконалими та економічно вигідними по конструкції вважаються центрифуги із шнековим вивантаженням осаду.

Центрифуги безперервної дії представляють собою горизонтальні, відстійні із шнековим вивантаженням осаду типу ОГШ (рис. 5.1), які часто застосовуються для розділу погано фільтруючих емульсій, суспензій [5].

Отже інозин отримують в такий спосіб: осад відокремлюють центрифугуванням при 38000 об/хв на 45 хв.

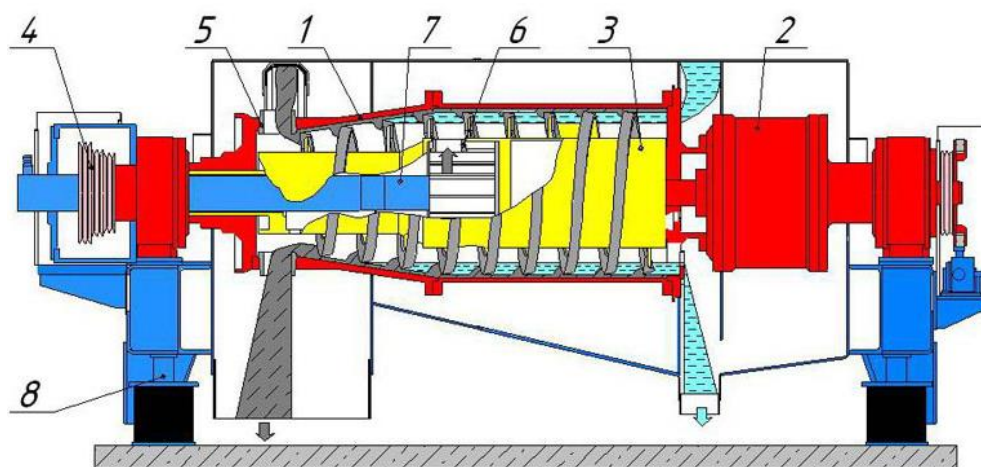


Рис. 5.3. Центрифуга типу ОГШ: 1 – ротор, 2 – редуктор, 3 – шнек, 4 – шків ротора, 5 – вікна вивантаження осаду, 6 – завантажувальні вікна, 7 – труба живлення, 8 – опора.

Культуральна рідина надходить через трубу живлення 7 на розгінний конус шнека 1 та через завантажувальні вікна 6 до внутрішньої порожнини ротора 1. За впливом відцентрової сили, частки твердої фази осідають на внутрішній поверхні ротора та видаляються шнеком 3 до шахти вивантаження осаду. Фугат стікає через вікна у стінці ротора, що прямує до шахти фугату.

Привід ротора центрифуги відбувається за допомогою асинхронного електродвигуна. Зміна частоти обертання ротора відбувається перестановкою двох ременів на багатоступеневих шківках 4. Привід шнека центрифуги відбувається у режимі «номінальний» через двоступеневий планетарний редуктор 2, що вбудований у ротор між корінних опор [17].

Так як об'єм культуральної рідини, що відправляється на центрифугування, становить $3,2 \text{ м}^3$, то доцільно використовувати центрифугу типу ОГШ-352К-04 (рис.5.1), із продуктивністю $5-7 \text{ м}^3/\text{год}$.



Рис.5.4 Зовнішній вигляд центрифуги ОГШ-352К-04

5.2.2. Очищення нативного розчину

Після центрифугування рідина може містити різного типу домішки, які не бажано щоб були присутні, тому наступним етапом при виділенні інозину є **очищення та освітлення нативного розчину.**

Для того щоб очистити рідину від домішок потрібно додати до нього адсорбент.

Адсорбенти - це високодисперсні штучні і природні пористі тверді речовини із великою зовнішньою та внутрішньою поверхнею, у якій і протікає адсорбція газів або рідин.

Як адсорбент використовують силікагель, активоване вугілля, деякі оксиди, смоли та ін.

Силікагель - це зерниста, склоподібна, пориста форма діоксиду кремнію, добута синтетичним шляхом із силікату натрію.

Переваги даного адсорбента:

- У порівнянні із природними пористими матеріалами (азбест, пемза) є можливість зміни його структури у процесі формування. Цей фактор є дуже важливим, адже ступінь та

характер пористості силікагелю обумовлюють ефективність його застосування у різних виробничих процесах;

- Інертність, тобто вважається хімічно та біологічно нешкідливим.

Недоліки:

- Силікагель відноситься до пожежо- та вибухобезпечним матеріалом;
- Дорогий адсорбент.

Цеоліт є мікропористим, алюмосилікатним мінералом, який здебільшого використовуються у якості комерційних адсорбентів та каталізаторів.

Переваги:

- Хороші каталітичні властивості;
- Швидка адсорбція.

Недоліки:

- Багато часу займає адсорбція;
- Дорогий адсорбент.

Пірогенний діоксид кремнію є легким мікронізованим порошком із вираженими адсорбційними властивостями.

Переваги:

- Велика загущувальна здатність;
- Адсорбційні властивості використовують із метою стабілізації сухих екстрактів.

Недоліки:

- Застосовується лише для загущення мазей;
- Дорогий адсорбент.

Активоване вугілля адсорбує на своїй поверхні алкалоїди, барвники, глікозиди, феноли, токсини і солі важких металів. У лужному середовищі адсорбна здатність вугілля підсилюється.

Переваги:

- Містить величезну кількість пор і завдяки цьому має дуже велику поверхню (1 г вугілля має поверхню приблизно 600–1200 м²), унаслідок чого має високу адсорбцію;

- Повністю очищує рідину від домішок;
- Надешевший адсорбент.

Недоліки:

- Довгий час адсорбції.

Виходячи із цих всіх фактів обираємо найбільш оптимальний варіант адсорбента - активоване вугілля.

Нижче наведена порівняльна таблиця цін на

Порівняльна таблиця цін на адсорбенти за 1 кг

Табл. 5.1

Назва	Ціна на 1 кг	Ціна на потреби виробництва, грн
Силікагель	100	5000
Активоване вугілля	60	2700
Цеоліт	160	1050
Аероил	250	5670

*ціни наведено на 2019 р.

1. <http://prom.ua>,
2. <http://flagma.ua>,
3. <http://agronet.ua>

До супернатанту додається 100 кг активованого вугілля (як адсорбент).

Далі рідину витримують 24 год. Далі потрібно відокремити супернатант від залишків біомаси та активованого вугілля.

5.2.3. Обґрунтування способу відокремлення залишків біомаси та активованого вугілля

Після процесів центрифугування та очищення в супернатанті можуть залишатися частинки клітин та активованого вугілля, тому нам потрібно здійснити процес відокремлення.

Фільтрування відбувається із використанням сил тиску при пропусканні НС через пористу поверхню, що фільтрує, при цьому дисперсна фаза затримується на перегородці, а все суцільне дисперсійне середовище рухається у сторону зменшення тиску та проходить через шар вологого осаду і водночас фільтрувальну перегородку. Фільтрування порівняно з **відстоюванням** і **фугуванням** забезпечує більш повне розділення дисперсних фаз. Перевага фільтрування перед процесом **осідання** полягає в тому, що рідина майже цілком звільняється від завислих частинок. Широке застосування цього методу пов'язане не тільки з простотою його здійснення, але і з легкою пристосованістю до різних умов процесу.

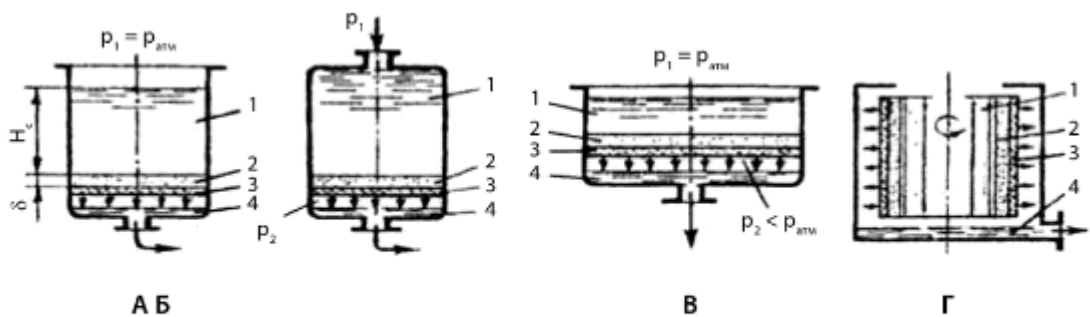


Рис. 5.3. Принципові схеми фільтрів за способом створення рушійної сили:
 1 — суспензія; 2 — осад; 3 — фільтрувальна перегородка; 4 — фільтрат



Рис 5.5. Промислова фільтраційна установка Ecosoft MO-24

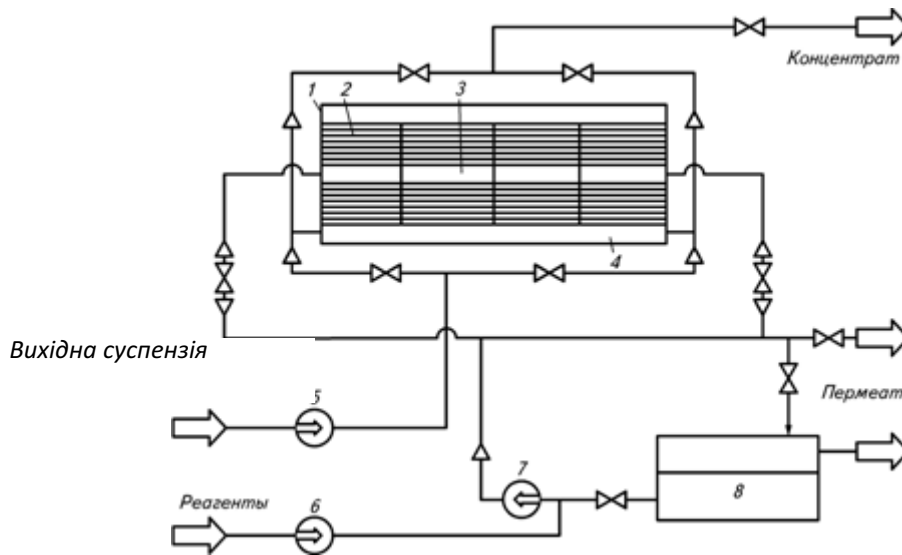


Рис. 5.6. Схема фільтраційної установки

1 - напірний корпус; 2 - мембранний елемент; 3 - центральна труба - канал пермеату; 4 - канал вихідної суспензії і відведення концентрату під час зворотнього промивання; 5-7 - насоси; 8 - бак зворотнього промивання.

Ecosoft MO-25 це автоматизована система, продуктивність якої становить 10-30 м³/год. До комплекта основного основного обладнання входить: насос високого тиску Grundfos, електромагнітні клапани Danfoss, регулюючі клапани Honeywell та мембранні елементи наднизького тиску Dow Filmtec,.

До складу системи входить контролер і комплект необхідних контрольно-вимірювальних приладів.

Основні компоненти:

- Мембранні елементи Ecosoft MO-24
- Мультифункціональний контролер
- Реле високого і низького тиску
- Насоси високого тиску Grundfos
- Електроприводні клапани Danfoss
- Фільтр механічного очищення
- Датчик електропровідності пермеату
- Поплавкове реле
- Комплект стійких до вібрацій манометрів и ротаметрів

- Металічна станина

Принцип роботи:

Концентрат, який поступає до системи, проходить попередню очистку через картриджні фільтри тонкого очищення 5 мкм, які входять до комплекту фільтраційної установки. На мембранний модуль концентрат подається за допомогою насоса високого тиску. До потоку вхідного концентрату може додаватися антискалант, який в свою чергу перешкоджає утворенню відкладень усередині мембранних елементів.

Пермеат надходить до накопичувальних баків пермеату, у якому встановлено датчик рівня, і якщо рідина підходить до заданого рівня, то відбувається відключення установки. Установка перед відключенням автоматично промивається водою.

5.2.4. Екстракція нативного розчину.

Екстракція – це спосіб розділення суміші речовин на складові частини за участі розчинника, у якому вони розчиняються неоднаково.

Для екстракція нативного розчину потрібно дотримуватися такого порядку виконання роботи: до супернатанту потрібно додати 57 л 50% етанолу (тому що він є найдешевшим та найпоширенішим) та 25% аміаку (для більш точного результату), відношення - 1:1 . Нагріти при $t=60^{\circ}\text{C}$. Через 2-3 год суміш фільтрують і випарюють.

5.2.5. Концентрування нативного розчину.

Для того щоб збільшити концентрацію діючої речовини нам потрібно видалити зайву вологу в супернатанті. Для того щоб виконати даний етап, інозин потрібно вибрати спосіб концентрування.

Випарювання – це процес концентрування рідких розчинів за допомогою часткового видалення розчинника під час кипіння даної рідини. В даному досліді використовується випарювання під вакуумом. Випарювання під вакуумом має багато переваг порівняно із випарюванням за атмосферного тиску.

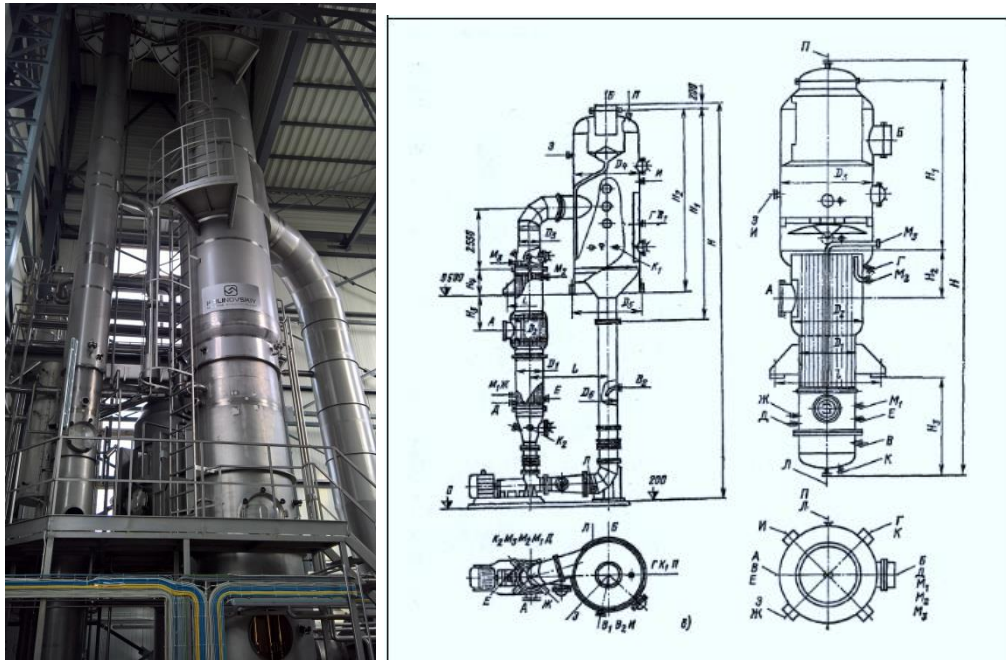


Рис.5.7 Випарна установка CDM 800 (Італія)

Переваги запропонованої установки порівняно із застарілими аналогами:

1. набагато нижчі питомі витрати електроенергії та охолодженої води;
2. високі кінцеві показники концентрації продукту;
3. легкість в ремонті та обслуговуванні.

Деталі установки, що контактують із випаровувальним продуктом, виготовлені із високоякісної, нержавіючої сталі.

За допомогою даної установки вихідна продукція має високої якості та бездоганну експлуатацію протягом тривалого терміну служби.

Опис роботи:

У фармацевтичному виробництві застосовуються вакуумвипарний апарат з центральною циркуляційною трубою та природною циркуляцією розчину під час випарюванні (рис. 5.5). У нижній частині апарата знаходиться камера нагріву, а в центрі розташована циркуляційна труба-3 великого діаметра 500 мм.

Нагрітий пар проходить у простір між трубками та обігріває рідину, яка подається зі штуцера-4. Як результат: кипіння рідини у трубках призводить до утворення парорідинної емульсії, щільність якої є менша від щільності рідини, яка нагрівається. У циркуляційній трубі теж відбувається випарювання рідини, проте щільність парорідинної емульсії набагато більша від щільності емульсії

у кип'ятильних трубках, як висновок у апараті проходить впорядкований рух рідини, тобто природна циркуляція.

Відділення крапель рідини від вторинного пару виконується у сепараторі-1 при постійному його русі через систему відбійників 5: і ході процесу вторинний пар направляється на конденсатор-2. Упарений розчин зливається у збірник за допомогою штуцера-6.

Широко у фармацевтичній промисловості використовується випарний апарат із виносним вертикальним нагрівачем, в якому можна здійснювати інтенсивну природну циркуляцію випарюваного розчину, аніж у апаратах із центральною циркуляційною трубою (рис. 5.5).

Випарювання рідини проходить в кожухотрубчастому теплообміннику-1, який являє собою пучок тонких труб довжиною до 7 м. Парорідинна емульсія, яка утворюється у них, поступає до сепаратора-2, вторинна пара відокремлюється від крапель рідини та поступає до конденсатора, а рідина поступово повертається по циркуляційній трубці-3 до кип'ятильника. Процес випарювання відбувається при 80°C приблизно 1 год.

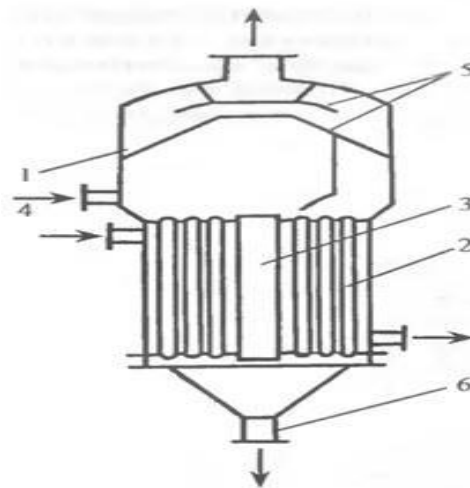


Рис. 1.4. Вакуум-випарний апарат із центральною циркуляційною трубою (схема). Пояснення в тексті

5.2.6. Кристалізація нативного розчину

Так як велика частина діючої речовини міститься в кристалах, що знаходяться в супернатанті, то нам потрібно зруйнувати кристали. Отже

концентрат потрібно кристалізувати, і тому наступним етапом є процес кристалізації.

Кристалізація відбувається при досягненні граничних умов, наприклад, перенасичення пари або переохолодження рідини, коли практично відразу виникає багато дрібних кристаликів - центрів кристалізації.



Рис. 5.8 Кристалізатор з примусовою циркуляцією (FC)

Принцип роботи:

звичайний кристалізатор із примусовою циркуляцією випаровує розчинник та за допомогою цього збільшуючи ступінь перенасичення який у свою чергу надходить на переробку розчинів та викликаючи цим кристалізацію. Більшість кристалізаторів із примусовою циркуляцією працюють під тиском або під вакуумом, який є трохи вище атмосферного. До кристалізатора із примусовою циркуляцією входить чотири основних компонента: судини кристалізатора, що забезпечує більшу частину обсягу, визначеного вимогами часу витримування за допомогою циркуляційного насоса, що забезпечує енергію змішування, теплообмінником, який подає енергію до кристалізатора та разом з вакуумним обладнанням, що обробляє пари, які утворюються у кристалізаторі.

Суспензія із посудини кристалізатора циркулює витіснювальним рухом рідини за допомогою теплообмінника та знову повертається до посудини кристалізатора, де її пересичення забирають за допомогою осаджувального матеріалу на кристалах, присутніх у суспензії. Ступінь перенасичення

контролюють так, щоб уникнути неочікуваного пароутворення, через інтенсивну циркуляційну здатність.

Випарений розчинник подається до вакуумної системи, де він одночасно конденсується та видаляється.

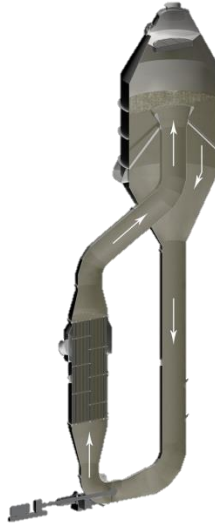


Рис 5.9. Кристаллизатор з примусовою циркуляцією (FC)

Наступна дія при виділенні інозину: додаємо до кристалів воду, нагрівають до 65-70°C та кристалізують.

Кристалізація відбувається при пониженні температури до 6-8°C протягом 5 год після цього кристали пропускають через нутч-фільтр.

Для кращої очистки інозину кристали потрібно відправити на перекристалізацію і після цього знову на нутч-фільтр.

5.2.7.Обґрунтування способу сушіння

Після процесу кристалізації, інозину потрібно надати товарну форму, адже продукт повинен бути сухим.

Сушіння може здійснюватися у пневматичних, розпилюючих, сублимаційних сушарках, з киплячим шаром та у вакуумних сушарках.

Пневматична сушарка є простою в обслуговуванні [5].

Основні недоліки пневматичних сушарок:

- ❖ високі витрати сушильного агента та теплоти;
- ❖ завелике навантаження на роботу циклону із огляду на необхідність вивантаження висушеного матеріалу [9].

Сушарки із киплячим шаром часто використовуються для сушіння рідких, сипких, та пастоподібних матеріалів. Даний тип сушарки характеризується високою інтенсивністю масо- і теплообміну, безперервність процесу [5].

Основний недолік: мала внутрішня гідродинамічна стійкість киплячого шару, яка може призвести до утворення великих зон злежування матеріалу та припинення процесу безперервної роботи установки [9].

Сублімаційне сушіння - це перехід твердої речовини за допомогою нагрівання у газоподібний стан, обминаючи стадію рідини. Проведення сублімаційного сушіння під вакуумом дає змогу знизити температуру процесу.

Переваги цього типу сушіння:

- ✓ волога видаляється поступово при низьких температурах, що майже повністю виключає термоінактивацію продукту;
- ✓ зберігається стабільна структура матеріалу [10].

Проте даний тип досить тривалий в часі та потребує високих енергозатрат, а також є достатньо високовартісною та після сушіння необхідне подрібнення висушеного продукту.

Принцип роботи **розпилювальної сушарки** полягає в тому, що висушуваний матеріал безперервно подається зверху на відцентровий механізм та розпилюється на частинки розміром приблизно 60-70 мкм.

Теплоносій поступово надходить знизу через направляючу насадку із високою швидкістю. За рахунок великій поверхні контакту, високим швидкостям руху частинок матеріалу та сушильного агента, сушіння інозину відбувається дуже швидко.

За рахунок розпилювальної сушарки досить швидко та легко можна висушувати розчини та отримувати ідеально подрібнений сухий продукт.

Тривалість розпилювальної сушки невелика, перебування продукту в сушарці становить 1-2 хв.

При поєднанні маси із теплоносієм волога відразу випаровується, частинки охолоджуються тому, незважаючи на високі температури теплоносія на виході та вході, препарат не нагрівається більше як на 35-40 °С.

Отже, виходячи із всіх тверджень обираємо розпилювальну сушарку марки DPSD-5000 (рис. 1) продуктивність якої становить 5000 кг/год.

Переваги даної сушарки:

- Немає необхідності після сушіння продукту ставити процес подрібнення та просіювання, адже інозин рівномірно розпилюється. Тому відразу відправляємо продукт на пакування;
- Покращені показники чистоти та якості одержуваного продукту;
- для того, щоб попередити забрудненню продукту та продовжити термін роботи обладнання використовується високоякісна нержавіюча сталь для виробництва деталей розпилювальної сушарки, що контактують із продуктом [3].



Рис. 5.10. Розпилювальна сушарка DPSD-5000

В комплект обладнання сушки входить: сушильна камера, над якою знаходиться розпилювальний пристрій у вигляді відцентрового розпилювального диска, що закріплений на валу електричного двигуна.

Окрім того до складу сушарки входить паровий підігрівник, що нагріває повітря за допомогою парою із тиском приблизно 1 МПа.

Отже, сушіння інозину доцільно здійснювати за допомогою розпилювальної сушарки, тому що вона продуктивною, не відбувається руйнування продукту за рахунок високих температур, а також здійснюється подрібнення інозину, і тому подальше подрібнення та просіювання продукту не доцільною.

Принцип роботи розпилювальної сушарки:

Вологий продукт (інозин) за допомогою насоса подається до диска для розпилення, що обертається з частотою приблизно 11 000 об/хв, та за участі відцентрової сили виходить на дуже великій швидкості за межі диска, розпилюючись у сушильній камері.

Гаряче повітря з температурою приблизно 120-350 °С, що здійснює сушка, надходить за допомогою кільцевого отвору до камери над обертовим диском та за допомогою наявних спеціальних напрямних переміщається до сушильній камері по спіралі.

Температура в камері становить приблизно 80-100 °С.

Для того, щоб відділити частинки продукту від повітря, які виходять із сушарки, спеціально поставлений циклон [4].

Так як розпилювальна сушка в ході процесу сушіння розпилює препарат немає необхідності ставити дробарку та просіювач.

5.2.8.Обґрунтування способу пакування

Після сушіння, подрібнення та просіювання необхідно упакувати сухий порошок інозину у поліетиленові пакети.

Пакети для фасування із поліетиленової плівки здатні відмінно захистити вміст від зовнішніх впливів, вологості та пошкоджень, а також зберегти їх початковий вигляд, стан та якість.

Переваги:

- ✓ презентабельний зовнішній вигляд;
- ✓ висока міцність;

- ✓ гарна якість;
- ✓ гігієнічність;
- ✓ зручність використання.

Фасування порошку здійснюється за допомогою спеціальних фасувальних апаратів.

Обираємо фасувальний автомат «ФАКТ-В» (рис. 5.11).

Продуктивність - 20-30 упаковок за хвилину.

Даний автомат розфасує та упакує продукти у ваговому діапазоні від 20 до 200 кг. Оператор може задавати необхідні параметри дозування. Довжина пакетів регулюється.

Стандартна комплектація апарата:

- Ваговий дозатор з накопичувальним бункером;
- Вузол запаювання поздовжнього і поперечних швів упаковки;
- Пристрій для формування 3-х шовної упаковки;
- Вузол постановки дати на шві упаковки (день, місяць, рік "XX XX XX");
- Система автоматичного пасового протягання пакувального матеріалу;
- Електронний блок управління зі світловою індикацією і відстеженням аварійних ситуацій [30].



Рис. 5.11. Фасувальний апарат «ФАКТ-В»

Отже, процес виділення та очистки інозину складається із таких етапів, що представлені нижче на *рис.5.1*. Схема виділення та очищення інозину:

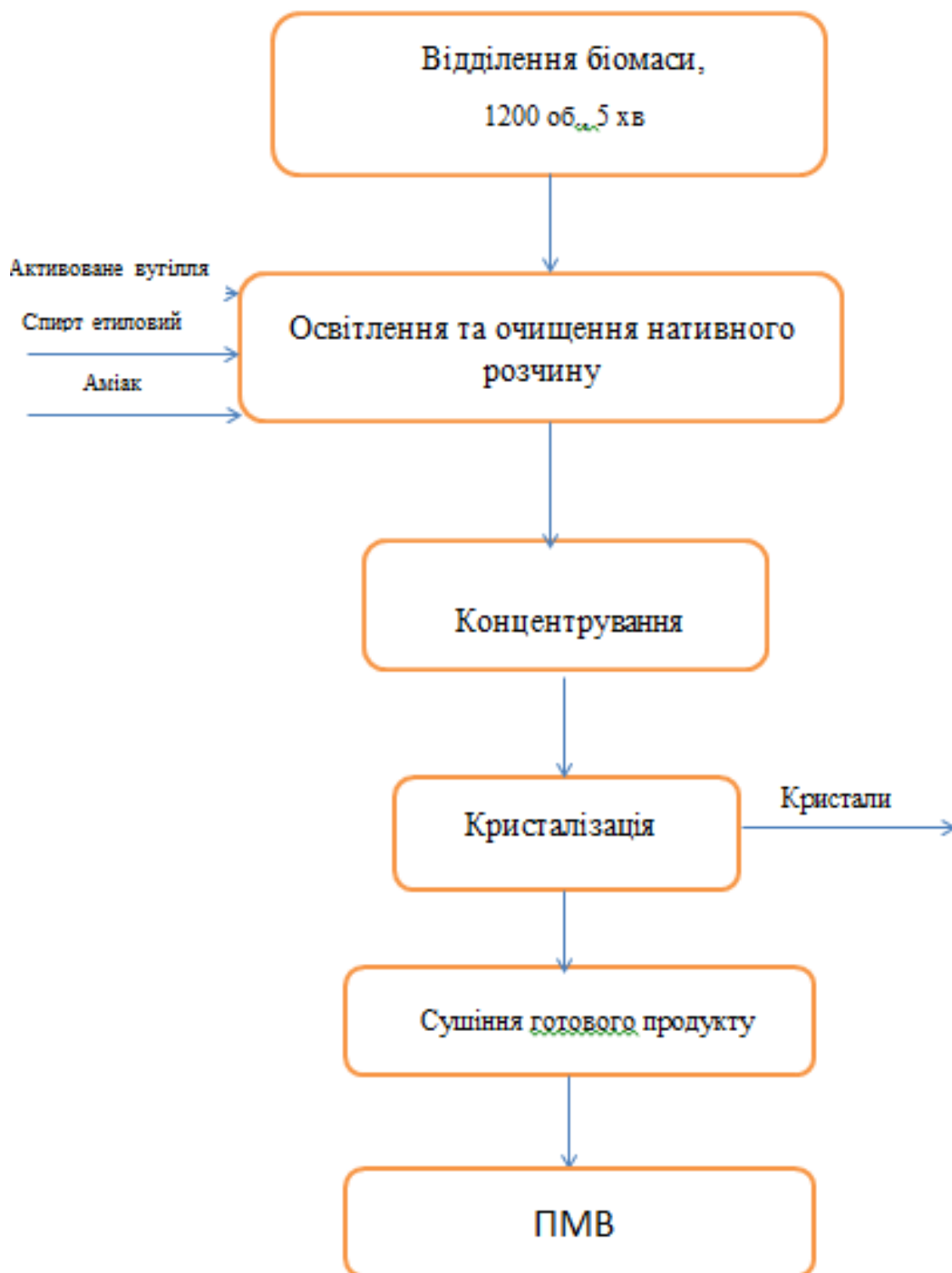


рис.5.12 Схема виділення та очищення інозину

РОЗДІЛ 6. Продуктовий розрахунок, розрахунок технологічного обладнання, матеріальний баланс на партію готового продукту.

З техніко-економічного розрахунку потреба в субстанції інозину складає $G_{нд} = 1840$ кг. За умовами цю кількість потрібно виробити за $T_{рд} = 100$ днів. За літературними даними максимальний синтез інозину, що продукує *Bacillus subtilis* ВНИИ-48 становить 32 г/л субстрату, досягається за умов росту на середовищі такого складу (г/л): глюкоза – $C1 = 140$; кукурудзяний екстракт – $C2 = 5$; БВК – $C3 = 25$; $MgSO_4$ – $C4 = 3$; NH_4NO_3 – $C5 = 20$; $CaCO_3$ – $C6 = 20$; Всього – $C\Sigma = 213$ г/л.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{Цф} = T_{ф} + T_{по} = 94$ год, де $T_{по}$ – час підготовчих операцій; коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) $K_i = 1,1$; коефіцієнт заповнення ферментера, частка (0,3 – 0,5); приймаємо $K_z = 0,5$; коефіцієнт заповнення колб, частка $K_{кол} = 0,2 - 0,3$; коефіцієнт заповнення збірника, частка (0,6 – 0,7) $K_{зб} = 0,6$.

Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{CB} = 0,01$; кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05 – 0,1) $X_{ф} = 0,05$; кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка (0,02 – 0,1) $X_{кол} = 0,1$; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в колбах, частка (0,01 – 0,05) $E_{кол} = 0,01$. При розрахунку такими втратами можна знехтувати.

6.1. Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

Кількість продукту на добу,

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 1840 / 100 = 18,4 \text{ кг/добу.}$$

					НУХТ БТЕК 04.02.32 ДП ПЗ			
<i>Зн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Терещук.Д.О			РОЗДІЛ 6. Продуктовий розрахунок, розрахунок технологічного обладнання, матеріальний баланс на партію готового продукту.	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Керівник</i>		Волошина.І.М						681
<i>Консультант</i>						Кафедра БТМ		
<i>Зав.каф.</i>		Пирог Т.П.						

Кількість продукту за цикл,

$$G_{цк} = G_{нтд} \cdot T_{ц} / 24 = 18,4 \cdot 94 / 24 = 72 \text{ кг/цикл.}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні $E_{св}$, m^3

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot C_{Ргп} / X_{кр} \cdot (1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 72 \cdot 0,95 / 32 \cdot (1 - 0,2) = 2,9$$

Кількість циклів:

$$N_{цк} = G_{нт} / G_{цк} = 1840 / 72 = 25,5$$

Уточнена кількість циклів (округлення завжди в більшу сторону):

$$N_{цкy} = 26$$

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

$$P_{кр} = G_{цк} / V_{кр} = 24,5$$

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

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу для ферментації становить:

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 2,9 / (1 - 0,1) = 3,2 m^3$$

Кількість поживного середовища в ферментері становить:

$$V_{пс1} = V_{ф} / (1 + X_{ф}) = 3,2 / (1 + 0,1) = 2,9 m^3$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву в ферментер становить:

$$V_{пмф} = V_{ф} / (1 - V_{пс}) = 3,2 - 2,9 = 0,3 m^3$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складає: $V_{гф} = V_{ф} / K_3 = 3,2 / 0,6 = 5,3$

Оскільки кількість посівного матеріалу становить $X_{ф} = X_i = X_{колб} = 0,1\%$ від кількості поживного середовища визначаємо кількість посівного матеріалу для інших стадій. Приблизна кількість посівного матеріалу для всіх інших стадій становитиме:

Посівний матеріал з інокулятора герметичним об'ємом $V_{ін} = 0,63 m^3$

$$V_{пмф} = 300 \text{ л}$$

$$V_{ін} = V_{пмф} / K_3 = 0,3 / 0,6 = 0,5 m^3$$

За таблицею 11.1 вибираємо інокулятор геометричним об'ємом $0,63 m^3$

Посівний матеріал з інокулятора герметичним об'ємом $V_{ін} = 0,06 m^3$

$$V_{\text{пін}_1} = V_{\text{пмф}} \cdot X_{\text{ін}} = 0,3 \cdot 0,1 = 0,03 \text{ м}^3 = 30 \text{ л}$$

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{пін}_1} / K_3 = 0,03 / 0,6 = 0,05$$

За таблицею 11.1 вибираємо інокулятор геометричним об'ємом $0,06 \text{ м}^3$

Посівний матеріал з качалочних колб одержуємо:

$$V_{\text{пін}_2} = V_{\text{пін}_1} \cdot X_{\text{ін}} = 30 \cdot 0,1 = 3 \text{ л}$$

Всього колб – $n_{\text{колб}} = V_{\text{пмк}} / V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зколб}} = 3 / 0,75 \cdot 0,2 = 20$ колби

6.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом $6,3 \text{ м}^3$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначену масу поживного субстрату $V_{\text{пс}}$ складають:

$G_{\text{заг}} = V_{\text{пс}} \cdot C_{\Sigma} = 2,9 \cdot 213 = 617,7 \text{ кг}$, в тому числі по компонентно, г:

Глюкоза – $G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 617,7 \cdot (140 / 213) = 406$

Кукурудзяний екстракт – $G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 617,7 \cdot (5 / 213) = 14,5$

БК – $G_4 = G_{\text{заг}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 617,7 \cdot (25 / 213) = 72,5$

MgSO_4 – $G_5 = G_{\text{заг}} (C_5 / C_{\Sigma}) = 617,7 \cdot (3 / 213) = 8,7$

NH_4NO_3 – $G_6 = G_{\text{заг}} (C_6 / C_{\Sigma}) = 617,7 \cdot (20 / 213) = 58$

CaCO_3 G_7 – $G_{\text{заг}} (C_7 / C_{\Sigma}) = 617,7 \cdot (20 / 213) = 58$

Стерилізацію будуть проводити в окремих реакторах-змішувачах гострою парою при $K=0,1$, тоді загальна кількість конденсату буде становити:

$$V_{\text{к}} = V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}} = 2,9 \times 0,1 = 0,29 \text{ м}^3$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Кількість води визначають за наступною формулою

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пс}} - G_{\text{заг}} \times (V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}}),$$

де $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування середовища, а $V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}}$ – загальна кількість утвореного конденсату.

В залежності від способу стерилізації та використовуваного обладнання величина $K_{\text{кон}}$ може складати: $K_{\text{кон}} = 0$ при стерилізації закритих

колбах або бутлях в автоклаві; $K_{кон} = 0,1$ при стерилізації компонентів у реакторах-змішувачах, інокуляторах або ферментері при подачі гострої пари безпосередньо в середовище.

Загальна кількість води необхідна для розбавлення компонентів становить:

$$V_{в} = V_{пс} - V_{к} - G_{за} = 2900 - 290 - 617,7 = 1992,3 \text{ л}$$

Загальна кількість води ($G_{в}$), що буде використана для розчинення компонентів поживного середовища становить 1992,3 л. Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1 кг.

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері геометричним об'ємом $6,3 \text{ м}^3$

Розраховуємо кількість води для розчинення по компонентно, л:

Глюкоза – $V_{1в} = V_{в} (C1/C_{\Sigma}) = 1992,3 \cdot (140/213) = 1309,5$

Кукурудзяний екстракт – $V_{1в} = V_{в} (C2/C_{\Sigma}) = 1992,3 \cdot (5/213) = 46,76$

БК – $V_{1в} = V_{в} (C3/C_{\Sigma}) = 1992,3 \cdot (25/213) = 234,83$

$MgSO_4$ – $V_{1в} = V_{в} (C4/C_{\Sigma}) = 1992,3 \cdot (3/213) = 28,06$

NH_4NO_3 – $V_{1в} = V_{в} (C5/C_{\Sigma}) = 1992,3 \cdot (20/213) = 187,07$

$CaCO_3$ – $V_{1в} = V_{в} (C6/C_{\Sigma}) = 1992,3 \cdot (20/213) = 187,07$

Формування композицій:

Склад композицій для виробничого біосинтезу в ферменті об'ємом $6,3 \text{ м}^3$

Табл.6.1.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування, г/л	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	40	106	А	448
Вода		342		

Кукурудзяний екстракт	5	14,5	Б	367,8
Вода		46,8		
БВК (білково-вітамінний комплекс)	25	72,5		
Вода		234		
MgSO ₄	3	8,7	В	281,7
Вода		28		
NH ₄ NO ₃	20	58		
Вода		187		
CaCO ₃	20	58	Г	245
Вода		187		
Конденсат		290		
Разом:		2900		

Підживлюючий розчин глюкози для дробного внесення

Табл.6.2.

Компонент:	Кількість компоненту, г\л:	Кількість глюкози для дробного підживлення, кг\л:	Кількість води для розчигння глюкози, л:	Загальна сума, кг\л:
Глюкоза	140	300	967	1267

6.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері геометричним об'ємом 0,63 м³

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в ферментері становить:

$$V_{in} = V_{пмін} / (1 - E_{in}) = 0,3 / (1 - 0,1) = 0,33 \text{ м}^3 = 330 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

$$V_{псін} = V_{in} / (1 + X_{in}) = 0,33 / (1 + 0,1) = 0,3 \text{ м}^3 = 300 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарату:

$$V_{кол} = V_{in} - V_{псін} = 0,33 - 0,3 = 0,03 \text{ м}^3 = 30 \text{ л}$$

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

$G_{заг} = V_{псін} \cdot C_{\Sigma} = 0,3 \cdot 213 = 63,9 \text{ кг}$, в тому числі по компонентно, кг:

Глюкоза – $G_1 = G_{заг} (C_2 / C_{\Sigma}) = 63,9 \cdot (140 / 213) = 42$

Кукурудзяний екстракт – $G_2 = G_{заг} (C_3 / C_{\Sigma}) = 63,9 \cdot (5 / 213) = 1,5$

БКВ – $G_3 = G_{заг} (C_4 / C_{\Sigma}) = 63,9 \cdot (25 / 213) = 7,5$

$MgSO_4$ – $G_4 = G_{заг} (C_5 / C_{\Sigma}) = 63,9 \cdot (3 / 213) = 0,9$

NH_4NO_3 – $G_5 = G_{заг} (C_6 / C_{\Sigma}) = 63,9 \cdot (20 / 213) = 6$

$CaCO_3$ – $G_6 = G_{заг} (C_7 / C_{\Sigma}) = 63,9 \cdot (20 / 213) = 6$

Стерилізація компонентів в композиціях буде здійснюватися в окремих реакторах гострою парою, приймаємо $K_{кон} = 0,1$, тоді загальна кількість конденсату становитиме:

$$V_{пак} = V_{псін} \cdot K_{кон} = 300 \cdot 0,1 = 30 \text{ л}$$

Загальна кількість води необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища, буде становити:

$$V_B = V_{псін} - V_{пак} - G_{заг} = 300 - 30 - 63,9 = 206,1 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення по компонентно, л:

Глюкоза – $V_{1B} = V_B (C_1 / C_{\Sigma}) = 206,1 \cdot (140 / 213) = 135,5$

Кукурудзяний екстракт – $V_{1B} = V_B (C_2 / C_{\Sigma}) = 206,1 \cdot (5 / 213) = 4,83$

БКВ – $V_{1B} = V_B (C_3 / C_{\Sigma}) = 206,1 \cdot (25 / 213) = 24,2$

$MgSO_4$ – $V_{1B} = V_B (C_4 / C_{\Sigma}) = 206,1 \cdot (3 / 213) = 2,9$

NH_4NO_3 – $V_{1B} = V_B (C_5 / C_{\Sigma}) = 206,1 \cdot (20 / 213) = 19,4$

$CaCO_3$ – $V_{1B} = V_B (C_6 / C_{\Sigma}) = 206,1 \cdot (20 / 213) = 19,4$

Розраховуємо кількість конденсату по компонентно, л:

Глюкоза – $V_{1к} = V_k (C1/C\Sigma) = 30 \cdot (140/213) = 19,5$

Кукурудзяний екстракт – $V_{1к} = V_k (C2/C\Sigma) = 30 \cdot (5/213) = 0,704$

БВК – $V_{1к} = V_k (C3/C\Sigma) = 30 \cdot (25/213) = 3,5$

MgSO₄– $V_{1к} = V_k (C4/C\Sigma) = 30 \cdot (3/213) = 0,41$

NH₄NO₃ - $V_{1к} = V_k (C5/C\Sigma) = 30 \cdot (20/213) = 3$

CaCO₃- $V_{1к} = V_k (C6/C\Sigma) = 30 \cdot (20/213) = 3$

Формування композицій:

**Склад композицій для стерилізації середовища для вирощування
посівного матеріалу в ферменті об'ємом 0,63 м³**

Табл.6.3.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	140	42	А	197
Вода		135,5		
Конденсат		19,5		
Кукурудзяний екстракт	5	1,5	Б	42
Вода		4,83		
Конденсат		0,704		
БВК (білково-вітамінний комплекс)	25	7,5		
Вода		24,2		
Конденсат		3,5		
MgSO ₄	3	0,9	В	32,61
Вода		2,9		

Конденсат		0,41		
NH ₄ NO ₃	20	6		
Вода		19,4		
Конденсат		3		
CaCO ₃	20	6	Г	28,4
Вода		19,4		
Конденсат		3		
Разом:		300		300

**6.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для
вирощування посівного матеріалу в ферментері геометричним об'ємом
0,06 м³**

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в ферментері становить:

$$V_{ін} = V_{пмін} / (1 - E_{ін}) = 0,03 / (1 - 0,1) = 0,033 \text{ м}^3 = 33 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

$$V_{псін} = V_{ін} / (1 + X_{ін}) = 0,033 / (1 + 0,1) = 0,03 \text{ м}^3 = 30 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарату:

$$V_{кол} = V_{ін} - V_{псін} = 0,033 - 0,03 = 0,003 \text{ м}^3 = 3 \text{ л}$$

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

$G_{заг} = V_{псін} \cdot C_{\Sigma} = 0,03 \cdot 213 = 6,39$ кг, в тому числі по компонентно, кг:

Глюкоза – $G_1 = G_{заг} (C_2 / C_{\Sigma}) = 6,39 \cdot (140 / 213) = 4,2$

Кукурудзяний екстракт – $G_2 = G_{заг} (C_3 / C_{\Sigma}) = 6,39 \cdot (5 / 213) = 0,15$

БВК – $G_3 = G_{заг} (C_4 / C_{\Sigma}) = 6,39 \cdot (25 / 213) = 0,75$

MgSO₄ – $G_4 = G_{заг} (C_5 / C_{\Sigma}) = 6,39 \cdot (3 / 213) = 0,09$

NH₄NO₃ – $G_5 = G_{заг} (C_6 / C_{\Sigma}) = 6,39 \cdot (20 / 213) = 0,6$

CaCO₃ – $G_6 = G_{заг} (C_7 / C_{\Sigma}) = 6,39 \cdot (20 / 213) = 0,6$

Стерилізація компонентів в композиціях буде здійснюватися в окремих реакторах гострою парою, приймаємо $K_{\text{кон}}=0,1$, тоді загальна кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{пак}}=V_{\text{псіп}} \cdot K_{\text{кон}}=30 \cdot 0,1=3$$

Загальна кількість води необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища, буде становити:

$$V_{\text{в}}=V_{\text{псіп}}-V_{\text{пак}}-G_{\text{заг}}=30-3-6,39=20,61 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення по компонентно, л:

Глюкоза – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C1/C_{\Sigma}) = 20,61 \cdot (140/213) = 13,5$

Кукурудзяний екстракт – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C2/C_{\Sigma}) = 20,61 \cdot (5/213) = 0,48$

БК – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C3/C_{\Sigma}) = 20,61 \cdot (25/213) = 2,5$

MgSO₄ – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C4/C_{\Sigma}) = 20,61 \cdot (3/213) = 0,29$

NH₄NO₃ – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C5/C_{\Sigma}) = 20,61 \cdot (20/213) = 2$

CaCO₃ – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C6/C_{\Sigma}) = 20,61 \cdot (20/213) = 2$

Розраховуємо кількість конденсату по компонентно, л:

Глюкоза – $V_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C1/C_{\Sigma}) = 3 \cdot (140/213) = 1,97$

Кукурудзяний екстракт – $V_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C2/C_{\Sigma}) = 3 \cdot (5/213) = 0,07$

БК – $V_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C3/C_{\Sigma}) = 3 \cdot (25/213) = 0,35$

MgSO₄ – $V_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C4/C_{\Sigma}) = 3 \cdot (3/213) = 0,042$

NH₄NO₃ – $V_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C5/C_{\Sigma}) = 3 \cdot (20/213) = 0,28$

CaCO₃ – $V_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C6/C_{\Sigma}) = 3 \cdot (20/213) = 0,28$

Формування композицій:

Склад композицій для стерилізації середовища для вирощування посівного матеріалу в ферменті об'ємом 0,06 м³

Табл. 6.4.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування	Композиція	Об'єм композиції,
Глюкоза	140	3,78	А	17,8

Продовження табл. 6.4

Вода		12,2		
Конденсат		1,8		
Кукурудзяний екстракт	5	0,135	Б	3,82
Вода		0,44		
Конденсат		0,06		
БВК (білково-вітамінний комплекс)	25	0,675		
Вода		2,2		
Конденсат		0,31		
MgSO ₄	3	0,081		
Вода		0,26		
Конденсат		0,04	В	2,9
NH ₄ NO ₃	20	0,54		
Вода		1,7		
Конденсат		0,25		
CaCO ₃	20	0,54		
Вода		1,7		
Конденсат		0,25	Г	2,5
Вода		1,7		
Конденсат		0,25		
Разом:		27		27

Композицію Б після приготування додають 25% розчин аміачної води (для підтримування рівня рН) із розрахунку 2 мл на 1 м³ розчину.

Відповідно кількість 25% аміачної води для композиції Б становить:

$$27 \cdot 2 = 54 \text{ мл}$$

6.6 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в ферментері становить:

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{пмін}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 3 / (1 - 0,1) = 3,3 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

$$V_{\text{псіп}} = V_{\text{ін}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 3,3 / (1 + 0,1) = 3 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарату:

$$V_{\text{кол}} = V_{\text{ін}} - V_{\text{псіп}} = 3,3 - 3 = 0,3 \text{ л} = 300 \text{ мл}$$

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

$G_{\text{заг}} = V_{\text{псіп}} \cdot C_{\Sigma} = 3 \cdot 213 = 639 \text{ г}$, в тому числі по компонентно, г:

Глюкоза – $G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 639 \cdot (140 / 213) = 420$

Кукурудзяний екстракт – $G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 639 \cdot (5 / 213) = 15$

БК – $G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 639 \cdot (25 / 213) = 75$

MgSO_4 – $G_4 = G_{\text{заг}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 639 \cdot (3 / 213) = 9$

NH_4NO_3 – $G_5 = G_{\text{заг}} (C_5 / C_{\Sigma}) = 639 \cdot (20 / 213) = 60$

CaCO_3 – $G_6 = G_{\text{заг}} (C_6 / C_{\Sigma}) = 639 \cdot (20 / 213) = 60$

Стерилізація компонентів в композиціях буде здійснюватися в автоклаві, тому конденсат утворюватися не буде.

Загальна кількість води необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища, буде становити:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псіп}} - V_{\text{пак}} - G_{\text{заг}} = 3000 - 639 = 2361 \text{ мл}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення по компонентно, мл:

Глюкоза – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 2361 \cdot (140 / 213) = 1552$

Кукурудзяний екстракт – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 2361 \cdot (5 / 213) = 55,423$

БК – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 2361 \cdot (25 / 213) = 277,1$

MgSO_4 – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 2361 \cdot (3 / 213) = 33,3$

NH_4NO_3 – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_5 / C_{\Sigma}) = 2361 \cdot (20 / 213) = 222$

CaCO_3 – $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_6 / C_{\Sigma}) = 2361 \cdot (20 / 213) = 222$

Формування композицій:

**Склад композицій для стерилізації середовища для вирощування
посівного матеріалу колбах на качалці**

Табл.6.5.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування, г/мл	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	140	420	А	1,972
Вода		1552		
Кукурудзяний екстракт	5	15		422,5
Вода		55,4		
БКВ (білково- вітамінний комплекс)	25	75		
Вода		277,1		
MgSO ₄	3	9		606
Вода		33,3		
NH ₄ NO ₃	20	60		
Вода		222		
CaCO ₃	20	60		
Вода		222		
Разом:		3000		3000

**6.7. Розрахунок матеріального балансу (із врахуванням кількості стадій
підготовки посівного матеріалу, розрахованої в ТЕО)**

Таблиця 6.6

Розрахунок матеріального балансу.

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм ³	Назва кінцевого продукту, відходів та	Кількість, кг, дм ³

			втрат	
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ, г (мл)			
1.1.	Глюкоза	420	Нестерильне ПС	3000
1.2.	Кукурудзяний екстракт	15		
1.3.	БКВ	75		
1.4.	MgSO ₄	9		
1.5.	NH ₄ NO ₃	60		
1.6.	CaCO ₃	60		
1.7.	Вода	2361		
	Всього:	3000	Всього:	3000
2	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ			
2.1.	Нестерильне ПС	3000	Стерильне ПС	3000
	Всього:	3000	Всього:	3000
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ, г (мл)			
3.1.	Стерильне ПС	3000	Посівний матеріал	3300
3.2.	Посівний матеріал з колби	300		
3.3.	Втрати (частка)	0,01		0
	Всього:	3300	Всього:	3300
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 0,06 м ³			
4.1.	Глюкоза	4,2	Нестерильне ПС	24,3
4.2.	Кукурудзяний екстракт	0,15		
4.3.	БКВ	0,75		
4.4.	MgSO ₄	0,095		
4.5.	NH ₄ NO ₃	0,65		
4.6.	CaCO ₃	0,65		
4.7.	Вода	20,61		
	Всього:	27	Всього:	27
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛІ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА			
5.1.	Нестерильне ПС	27	Стерильне ПС	30
5.2.	Конденсат	3	(втрат немає)	0,0
	Всього:	30	Всього:	30

6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В МАЛОМУ ІНОКУЛЯТОРІ			
6.1.	Стерильне ПС	30	Посівний матеріал	33
6.2.	Посівний матеріал з колб на качалках	3		
6.3.	Втрати (частка)	0,1		0,1
	Всього:	33	Всього:	33
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 0,63 м ³			
7.1.	Глюкоза	42	Нестерильне ПС	270
7.2.	Кукурудзяний екстракт	1,5		
7.3.	БКВ	7,5		
7.4.	MgSO ₄	0,9		
7.5.	NH ₄ NO ₃	6		
7.6.	CaCO ₃	6		
	Вода	206,1		
	Всього:	270	Всього:	270
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА			
8.1.	Нестерильне ПС	270	Стерильне ПС	300
8.2.	Конденсат	30	(втрат немає)	0,0
	Всього:	300	Всього:	300
9.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ			
9.1.	Стерильне ПС	300	Посівний матеріал	300
9.2.	Посівний матеріал з малого інокулятора	30		
9.3.	Втрати (частка)	0,1		30
	Всього:	330	Всього:	330
10.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ ОБ'ЄМОМ 6,3 м ³			
10.1.	Глюкоза	406	Нестерильне ПС	2610
10.2.	Кукурудзяний екстракт	14,5		
10.3.	БКВ	72,5		
10.4.	MgSO ₄	8,7		
10.5.	NH ₄ NO ₃	58		
10.6.	CaCO ₃	58		
	Вода	1992,3		
	Всього:	2610	Всього:	2610
11.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ			
11.1.	Нестерильне ПС	2610	Стерильне ПС	2900

11.2.	Конденсат	290	(втрат немає)	0,0
	Всього:	2900	Всього:	2900

12.	Виробничий біосинтез			
12.1.	Стерильне ПС	2900	Посівний матеріал	2880
12.2.	Посівний матеріал з інокулятора	300		
12.3.	Втрати (частка)	0,1		320
	Всього:	3200	Всього:	3200

Оскільки, кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу 2880 л) майже співпадає із кількістю культуральної рідини, визначеної відповідно у розрахунку кількості партій продукту (2900 л), похибка складає 2%, вважаємо, що матеріальний баланс зроблено вірно.

6.8. Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання

Уточнюючий розрахунок проводиться на основі продуктового розрахунку та матеріального балансу з метою уточнення коефіцієнтів заповнення обладнання.

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_3 = 0,6$:

$$V_{гф} = V_{ф}/K_3 = 3,2/0,6 = 5,3 \text{ м}^3.$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{нф} = 6,3 \text{ м}^3$.

Кількість виробничих ферментерів при заданому K_3 :

$$N_{фр} = V_{гф}/V_{нф} = 5,3/6,3 = 0,84 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів:

$$K_{зф} = V_{ф}/(V_{нф}N_{фр}) = 3,2/6,3 \cdot 1 = 0,507.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65), то приймаємо до установки ферментерів 1 + 1 запасний.

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_3 = 0,6$:

$$V_{гна} = V_{па}/K_3 = 0,3/0,6 = 0,5 \text{ м}^3.$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом посівний апарат: $V_{\text{ппа}} = 0,63 \text{ м}^3$.

Кількість посівних апаратів при заданому K_3 :

$$N_{\text{пар}} = V_{\text{ппа}}/V_{\text{ппа}} = 0,5/0,63 = 0,793 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці посівних апаратів:

$$K_{\text{зпа}} = V_{\text{па}} / (V_{\text{ппа}} N_{\text{пар}}) = 0,3 / (0,63 \cdot 1) = 0,5.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65), то приймаємо до установки посівних апаратів 1 + 1 запасний.

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора №1 при заданому $K_3 = 0,6$:

$$V_{\text{гін1}} = V_{\text{ін1}}/K_3 = 30/0,6 = 50 \text{ л.}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом інокулятор: $V_{\text{нін1}} = 60 \text{ л.}$

Кількість інокуляторів при заданому $K_{\text{зін}}$:

$$N_{\text{ін1р}} = V_{\text{гін1}}/V_{\text{нін1}} = 50/60 = 0,83 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного з таблиці інокулятора:

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{ін1}} / (V_{\text{нін1}} N_{\text{ін1р}}) = 30 / (60 \cdot 1) = 0,5.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5 – 0,65), приймаємо до установки інокуляторів 1 + 1 запасний.

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}} = 0,2$:

$$V_{\text{гколб}} = V_{\text{колб}}/K_{\text{колб}} = 3/0,2 = 15 \text{ л}$$

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

Кількість качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}} = 0,2$:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{гколб}}/V_{\text{нколб}} = 15/0,75 = 20 \text{ колб.}$$

6.9. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 6,3 м³

Композиція А:

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції А об'ємом $V_A = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 448 - 90 = 358$ л. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = V_A / K_{36} = 358 / 0,8 = 448 \text{ л} = 0,448 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 0,63 \text{ м}^3$.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Аг}} / V_{\text{нр}} = 0,448 / 0,63 = 0,7 \text{ од. Приймаємо - 1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_A / (V_{\text{нр}} N_p) = 0,358 / (0,63 \cdot 1) = 0,6.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення перевищує задані межі (0,7–0,85), то обираємо інший геометричний об'єм реактора-змішувача, який замовляємо у виробника, $V_{\text{нр}} = 0,5$ л.

Тоді уточнений коефіцієнт заповнення буде:

$$K_{3p} = V_A / (V_{\text{нр}} N_p) = 0,348 / (0,5 \cdot 1) = 0,7.$$

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

Композиція Б:

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції Б об'ємом $V_A = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 14,5 + 406,8 + 72,5 + 234 - 40,8 = 330$ л. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = V_A / K_{36} = 330 / 0,8 = 412,5 \text{ л} = 0,4125 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 0,4 \text{ м}^3$.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Аг}} / V_{\text{нр}} = 412,5 / 0,4 = 1031,25 \text{ од. Приймаємо - 1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_A / (V_{\text{нр}} N_p) = 0,33 / (0,4 \cdot 1) = 0,8.$$

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

Композиція В:

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції В об'ємом $V_A = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 8,7 + 28 + 58 + 187 - 31 = 250$ л. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{АГ}} = V_A / K_{36} = 0,25 / 0,8 = 0,3 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 0,40 \text{ м}^3$.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{АГ}} / V_{\text{нр}} = 0,3 / 0,40 = 0,75 \text{ од. Приймаємо - 1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_A / (V_{\text{нр}} N_p) = 0,25 / (0,40 \cdot 1) = 0,6.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення перевищує задані межі (0,7–0,85), то обираємо інший геометричний об'єм реактора-змішувача, який замовляємо у виробника, $V_{\text{нр}} = 0,35 \text{ м}^3$.

Тоді уточнений коефіцієнт заповнення буде:

$$K_{3p} = V_A / (V_{\text{нр}} N_p) = 0,25 / (0,35 \cdot 1) = 0,7.$$

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

Композиція Г:

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції Г об'ємом $V_A = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 245 - 90 = 218$ л. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{АГ}} = V_A / K_{36} = 0,218 / 0,8 = 270 \text{ л} = 0,27 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 0,4 \text{ м}^3$.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{АГ}} / V_{\text{нр}} = 0,27 / 0,4 = 0,6 \text{ од. Приймаємо - 1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_A / (V_{нр} N_p) = 0,218 / (0,4 \cdot 1) = 0,6.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення перевищує задані межі (0,7–0,85), то обираємо інший геометричний об'єм реактора-змішувача, який замовляємо у виробника, $V_{нр} = 0,3 \text{ м}^3$.

Тоді уточнений коефіцієнт заповнення буде:

$$K_{зр} = V_A / (V_{нр} N_p) = 0,218 / (0,3 \cdot 1) = 0,7.$$

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

Розрахунок реактора-змішувача для підживлюю чого розчину глюкози

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції А об'ємом $V_A = V_{пс} - V_{кон} = 1267 - 100 = 1167 \text{ л}$. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{Аг} = V_A / K_{зб} = 1167 / 0,8 = 1500 \text{ л} = 1,5 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр} = 1,60 \text{ м}^3$.

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

$$N_p = V_{Аг} / V_{нр} = 1,5 / 1,60 = 0,9 \text{ од. Приймаємо} - 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_A / (V_{нр} N_p) = 1,167 / (1,6 \cdot 1) = 0,7.$$

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

6.10. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом $0,63 \text{ м}^3$

Композиція А:

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції А об'ємом $V_A = V_{пс} - V_{кон} = 177,5 - 19,5 = 158 \text{ м}^3$. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{Аг} = V_A / K_{зб} = 0,158 / 0,8 = 0,2 \text{ м}^3 \text{ (200 л)}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 0,25 \text{ м}^3$

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Аг}}/V_{\text{нр}} = 0,2/0,25 = 0,8. \text{ Приймаємо } -1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}}N_p) = 0,158/(0,2 \cdot 1) = 0,8.$$

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

Композиція Б:

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції Б об'ємом $V_{\text{А}} = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 105,5 - 4,5 = 101 \text{ л}$. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}}/K_{36} = 0,101/0,8 = 0,12 \text{ м}^3 \text{ (330 л)}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 0,16 \text{ м}^3$

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Аг}}/V_{\text{нр}} = 0,12/0,16 = 0,75. \text{ Приймаємо } -1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}}N_p) = 0,101/(0,16 \cdot 1) = 0,6.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення перевищує задані межі (0,7–0,85), то обираємо інший геометричний об'єм реактора-змішувача, який замовляємо у виробника, $V_{\text{нр}} = 0,13 \text{ м}^3$.

Тоді уточнений коефіцієнт заповнення буде:

$$K_{3p} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}}N_p) = 0,101/(0,13 \cdot 1) = 0,78$$

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

Композиція В:

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції В об'ємом $V_{\text{А}} = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 29,2 - 3,2 = 26 \text{ л}$. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{АГ}} = V_{\text{А}}/K_{36} = 0,026/0,8 = 0,03 \text{ м}^3 \text{ (30 л)}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 0,03 \text{ м}^3$

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{р}} = V_{\text{АГ}}/V_{\text{нр}} = 0,03/0,03 = 1. \text{ Приймаємо -1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3\text{р}} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}}N_{\text{р}}) = 0,26/(0,03 \cdot 1) = 0,8.$$

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

Композиція Г:

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції Г об'ємом $V_{\text{А}} = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 24,4 - 3 = 22,4 \text{ л}$. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{АГ}} = V_{\text{А}}/K_{36} = 0,0224/0,8 = 0,028 \text{ м}^3 \text{ (28 л)}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 0,03 \text{ м}^3$

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{р}} = V_{\text{АГ}}/V_{\text{нр}} = 0,028/0,03 = 0,9. \text{ Приймаємо -1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3\text{р}} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}}N_{\text{р}}) = 0,0224/(0,03 \cdot 1) = 0,8.$$

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

6.11. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 0,06 м³

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції А об'ємом $V_{\text{А}} = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 17,7 - 1,7 = 16 \text{ л}$. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{АГ}} = V_{\text{А}}/K_{36} = 16/0,8 = 20 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 20$ л. Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Аг}}/V_{\text{нр}} = 20/20 = 1. \text{ Приймаємо} - 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}}N_p) = 16/(20 \cdot 1) = 0,8$$

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

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції Б об'ємом $V_{\text{А}} = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 3,8 - 0,42 = 3,4$ л. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}}/K_{36} = 3,4/0,8 = 4,3 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 5$ л. Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Аг}}/V_{\text{нр}} = 4,3/5 = 9. \text{ Приймаємо} - 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}}N_p) = 3,4/(5 \cdot 1) = 0,7$$

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

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції В об'ємом $V_{\text{А}} = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 2,9 - 0,3 = 2,6$ л. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}}/K_{36} = 2,6/0,8 = 3,3 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 5$ л. Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Аг}}/V_{\text{нр}} = 3,3/5 = 7. \text{ Приймаємо} - 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}}N_p) = 2,6/(5 \cdot 1) = 0,5$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення перевищує задані межі (0,7–0,85), то обираємо інший геометричний об'єм реактора-змішувача, який замовляємо у виробника, $V_{\text{нр}} = 4$ л.

Тоді уточнений коефіцієнт заповнення буде:

$$K_{\text{зр}} = V_A / (V_{\text{нр}} N_p) = 2,6 / (4 \cdot 1) = 0,7$$

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

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції Г об'ємом $V_A = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = 2,5 - 0,3 = 2,2$ л. Так як в нас не великий об'єм поживного середовища, тому не доцільно використовувати реактор-змішувач, в даному випадку ми будемо використовувати колби в кількості 4 шт.

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу інозину зображено в табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
СП-1 3-2 Р-3 3-4	СП-мийка	1	СІР-мийка марки SIEMENS ("Touch-screen" SIMATIC). Дана мийка складається із трьох ємностей: питної води для ополіскування обладнання (3-2), миючого розчину (Р-3) та ємності відпрацьованого миючого розчину (3-4) [1].
ПЗ-9	Повітрозабірник	1	Обладнений металевією сіткою для видалення механічних забруднень. [30]
Ф-10	Фільтр грубої очистки	1	Фільтруючий матеріал – хімволокно ФВР, Е=90%. [1]
К-11	Компресор	1	Безмасляний компресор <i>LFxR 0.7-1.0</i> компанії "Атлас Копко": максимальний тиск 10 бар, продуктивність 3.67 - 4.97 м ³ /хв. [2]
Т-12	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач серії АС-13,5 фірми «Уралкомпресормарш»(Росія) продуктивністю 13,5 м ³ /год. [3]
Р-13	Ресивер	1	Ресивер серії РВ 430/16 фірми «Уралкомпресормарш» (Росія), об'єм 430 л, робочий тиск 1,8 МПа. [4]

					НУХТ БТЕК 04.02.32 ДП ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Терещук.Д.О			РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Волошина.І.М					92	9191
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

T-14	Теплообмінник нагрівач	1	Корпус теплообмінника фірми VENTS (Україна) виготовлений із оцинкованої сталі, максимальний робочий тиск 1,6 МПа. [5]
Ф-15	Фільтр тонкої очистки	1	Модель фільтра FMW. Ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 3400 м ³ /год [6]
Д-8 Д-13 Д-16 Д-18 Д-20 Д-22 Д-25 Д-27 Д-29 Д-32 Д-35 Д-38 Д-40 Д- Д- Д-	Об'ємно- ваговий дозатор	12	Дозатор виробництва НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%. [23]
P-17	Реактор змішувач для композиції А	1	Реактори об'ємом 0,5 м ³ з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]
P-23	Реактор змішувач для композиції А	1	Реактори об'ємом 0,25 м ³ з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]

P-33	Реактор змішувач для композиції А	1	Реактори об'ємом 20 л з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]
P-19	Реактор змішувач для композиції Б	1	Реактори об'ємом 0,4 м ³ з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв.[9]
P-26	Реактор змішувач для композиції Б	1	Реактори об'ємом 0,13 м ³ з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]
P-36	Реактор змішувач для композиції Б	1	Реактори об'ємом 5 л з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]
P-21	Реактор змішувач для композиції В	1	Реактори об'ємом 0,35 м ³ з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]
P-28	Реактор змішувач для композиції В	1	Реактори об'ємом 0,03 м ³ з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]
P-37	Реактор змішувач для композиції В	1	Реактори об'ємом 4 л з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]
P-30	Реактор змішувач для композиції Г	1	Реактори об'ємом 0,3 м ³ з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]
P-39	Реактор змішувач для композиції Г	1	Реактори об'ємом 0,03 м ³ з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]

Р-42	Реактор змішувач для підживлюючого розчину глюкози	1	Реактор об'ємом 1,60 м ³ з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв. [9]
ЗК-44	Засівна колба	1	Загальний об'єм до 5 л. Нержавіюча сталь
Ф-45 Ф-46 Ф-48 Ф-49 Ф-51 Ф-52	Індивідуальний фільтр	6	Фільтри марки Bonesco Active carbon filter (Швецарія), Е=99. [8]
ІН-47	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 60 л, швидкість перемішування 180 об/хв. [7]
ІН-50	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 630 л, швидкість перемішування 180 об/хв. [7]
ФР-54	Ферментер	1	Ферментер барботажний об'ємом 6,3 м ³ , швидкість перемішування 180 об/хв. [7]
Н-21	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний з нержавіючої сталі ЦГ Насос 25/50К-5,5-5. Продуктивність 50 л/год,. Фірми «Grundfos». [10]
Н-24	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний з нержавіючої сталі ЦГ Насос 25/50К-5,5-5. Продуктивність від 60 л/год,. Фірми «Grundfos». [10]
Н-31	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний з нержавіючої сталі ЦГ Насос 25/50К-5,5-5. Продуктивність від 100 л/год,. Фірми «Grundfos». [10]
Н-34	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний з нержавіючої сталі ЦГ Насос 25/50К-5,5-5. Продуктивність від 100 л/год,. Фірми «Grundfos». [10]

Н-37	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний з нержавіючої сталі ЦГ Насос 25/50К-5,5-5. Продуктивність 200 л/год., Фірми «Grundfos». [10]
Н-40 Н-56 Н-60 Н-68 Н-70	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий герметичний з нержавіючої сталі ЦГ Насос 25/50К-5,5-5. Продуктивність від 200 л/год., Фірми «Grundfos». [10]
Н-55	Насос перистальтичний	1	Перистальтичні насоси високого тиску серії FPSH є промисловим насосом, розрахований на цілодобову роботу. Продуктивність якого становить 150 м ³ /год та тиск до 15 бар. Цей тип насоса може працювати в режимі «сухого ходу», відсутні ущільнення, є реверсивним, самовсмоктувальним та володіє високою всмоктуючою здатністю. [10]
Ц-57	Центрифуга осаджувальна	1	Центрифуга безперервної дії, осаджувальна, горизонтальна, зі шнековим вивантаженням осаду марки ОГШ-352К-04 виробник Сумське НПО ім.Фрунзе (Україна), продуктивність 5-7 м ³ /год [5].
Ф-61 З-62 Н-63 Ф-64 УМ-65	Фільтраційна установка	1	Фільтраційна установка фірми «Ecosoft МО-24» з горизонтальними фільтрувальними елементами, складається зі збірника (З-13) об'ємом 5 м ³ , насос високого тиску Grundfos (Н-14), попереднього фільтра (Ф-15) та

			фільтраційного модуля (УМ-16), продуктивність установки-10-30 м ³ /год. [6].
--	--	--	---

В-69	Випарювальна установка	1	У фармацевтичному виробництві застосовуються вакуумвипарний апарат з центральною циркуляційною трубою та природною циркуляцією розчину під час випарюванні. У нижній частині апарата знаходиться камера нагріву, а в центрі розташована циркуляційна труба-3 великого діаметра 500 мм.
Кр-71	Установка для кристалізації	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 1 м ³ , в комплект входить верхня камера, нижня камера, кип'ятильник та нутч-фільтри [2].
С-79	Розпилювальна сушильна шафа	1	Розпилювальна сушарка DPSD-5000, діапазон робочих температур до 300°C; 8 розмірів моделі від 30 до 750 літрів об'єму, виробник Italtvacuum S.r.l., (Італія) [9].
ФМ-80	Фасувальна машина	1	Фасувальний автомат «ФАКТ-В». Продуктивність - 20-30 упаковок за хвилину, виробник «Сервіс-Пак» (Україна) [12].

Примітка: підбір обладнання відбувався за допомогою таких електронних ресурсів:

1. <http://www.ventelectro.ru/ventilyaciya/fil-try/fil-try-tonkoj-ochistki/fil-tr-vozdushnyj-karmannyj-fvk-fyak-klass-f5-f9-material-iz-nan/>
2. http://www.labequip.ru/fermentery_bioreaktory/fermentery/bioflo_310/
3. <https://www.mtkisorbent.ru/filtruyushchij-material-fpp-15-1-5-tkan-petryanova>
4. http://www.labequip.ru/fermentery_bioreaktory/fermentery/bioflo_pro/
5. http://lutz.com.ua/catalog/cen_pump/TMB_pump/
6. <https://air-filter.com.ua/filters/primary/pocket/tf25>
7. <http://www.airpol.com.pl/kategoria/3-kw-22-kw-wykonanie-standardowe/91>
8. https://www.agrcomp.ru/item/ohladitely_vozduha_friulair
9. <https://prom.ua/ua/p523000363-vozduhosbornik-resiver-dlya;all.html>
10. <https://www.climatik.su/ventiljacija/teploobmenniki/teploobmennik-titan-whr-300x150-2-dlya-pryamougolnykh-kanalov-vodyanoi.html>

РОЗДІЛ 8.ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ

ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Технологічна схема біосинтезу інозину включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез інозину *Bacillus subtilis* ВНИИ 48).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.1.1. Приготування робочого (2 %) розчину каустичної соди

Для миття обладнання та комунікацій необхідно 10190 л мийного засобу (див. розд. 2). Робочий розчин каустичної соди (2 %) готують в установці СІР-мийка (СП-1). Для цього зважують за допомогою об'ємно-вагового дозатора 204 кг каустичної соди та додають 100,9 л води.

ДР 1.1.2. Приготування (0,5 %) робочого розчину Гембару

Зі складу надходить концентрат Гембару (25 %), який розводять водою до потрібної концентрації (0,5 %). Для цього зважують 33,25 кг каустичної соди та додають 631,75 л води (для всього цикла виробництва)

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Щоденне прибирання приміщень проводять після кожної зміни вологим способом. Його проводять у виробничих, лабораторних, підсобних і побутових приміщеннях. При проведенні вологого прибирання воду.

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання приміщень.

Генеральне прибирання проводять раз у місяць 0,5 %-м робочим розчином «Гембар» (від ДР 1.1.2.).

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.32 ДП ПЗ			
Розроб.		Терещук.Д.О			РОЗДІЛ 8.ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Волошина.І.М					98	971
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

Стіни, двері, стелі, та інші поверхні зрошують з гідропульту 0,5 % розчином Гембару з розрахунку 100 мл/м². Після закінчення зрошення приміщення закривають на 30-40 хвилин, після цього виливають надлишок розчину за допомогою губки. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином.

ДР 1.3. Підготовка технічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття обладнання

Для миття ємнісного обладнання використовують станцію СІР – мийки (СП-1), питну воду і 2 %-й робочий розчин каустичної соди (*від ДР 1.1.1.*).

ДР 1.3.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування здійснюють водою, протягом 30 хвилин, для виключення можливості нанесення шкоди здоров'ю персоналу розчином лугу.

ДР 1.3.3. Технічний огляд

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

ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність

Після проведення миття, ополіскування та ремонтних робіт перевіряють обладнання на герметичність, для цього в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (дифторхлорметан). Далі закривають усю запірну арматуру ємнісного обладнання і подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Після закінчення часу витримки звіряють покази манометра, якщо різниця менше 0,01 МПа, то апарат вважають герметичним. При більшому відхиленні за допомогою галогенного течіє шукача починають пошук неущільнень шляхом перевірки усіх місць з'єднань. При

наближені щупа течіє шукача до місця нещільності фіксуються пари галогенвмісної речовини, що засвідчує наявність нещільності. При знаходженні усіх таких місць їх усувають шляхом підтягування різьбових з'єднань або замінюють прокладки. Потім апарат знову перевіряють на герметичність.

ДР 1.3.5. Стерилізація обладнання

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

ДР 2 Підготовка стерильного технологічного повітря

Атмосферне повітря забруднене твердими або рідкими частинки які містять на собі різноманітні мікроорганізми, а основною вимогою аераційного повітря є його стерильність, тому проводять очищення повітря.

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 2-3 м від найвищого приміщення за допомогою пристрою для забору повітря (ПЗ-2).

ДР 2.2 Очистка від грубих домішок

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі грубої очистки (Ф-3). При проходженні повітря через фільтр грубого очищення затримується пил та механічні частки, а очищене повітря надходить у компресор. Ступінь очищення $E = 90$ %.

ДР 2.3 Компресування повітря

Для забезпечення умов нормальної аерації культури продуцента та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря необхідно стиснути.

При стисканні повітря у компресорі його температура підвищується з 15-25 °С на вході в компресор до 120-150°С на виході з неї і збільшується вмісту вологи повітря (К-4).

Після компресора повітря має наступні характеристики: $P = 0,35 \text{ МПа}$, $t = 120-150^\circ\text{C}$, $W = 70 \%$ [9].

ДР 2.4 Охолодження повітря

Стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі повітря до температури 25 °С для відведення надлишкової вологи (Т-5).

ДР 2.5 Видалення зайвої вологи

Повітря подають на ресивер (Р-6) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи $W = 60 \%$.

ДР 2.6 Нагрівання повітря

Нагрівання повітря відбувається у теплообміннику-нагрівачі до 80 °С та вмісту вологи $W=50\%$ (Т-7).

ДР 2.7 Очищення повітря на головному фільтрі

Подальше очищення повітря від мікроорганізмів здійснюється в тонкому фільтрі (Ф-8). Ступінь очищення якого збільшується до 95-98 %.

ДР 2.8 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Заключним етапом отримання аераційного повітря - використання індивідуальних фільтрів, їх ступінь очищення становить 99,9999 %. Дані фільтри (Ф-40,45,48) встановлюють перед інокулятором та посівним апаратом (Фр 43, 46), безпосередньо перед виробничим ферментером (Фр 49), та на виході відпрацьованого повітря (Ф-42,44,47).

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

Для вирощування інокуляту в колбах на качалці необхідно приготувати 3000 мл поживного середовища (посівний матеріал становить 300 мл, тобто $3300-300=3000$ мл поживного середовища потрібно приготувати). Як джерело вуглецю в середовище вноситься глюкоза та кукурудзяний екстракт, як джерело азоту – NH_4NO_3 . Вміст компонентів для приготування 3 л поживного середовища наведено у *табл. 5.1*.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3 л середовища

Таблиця 8.1

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст води у 3 л робочого середовища, мл	Композиція	Об'єм композиції, мл
глюкоза	420	1552	А	1972
БВК (білково-вітамінний комплекс)	15	55,4	Б	422,5
кукурудзяний екстракт	75	277,1		
MgSO_4	9	33,3	В	324,3
NH_4NO_3	60	222		
CaCO_3	60	222	Г	282
Разом	639	2361		3000

Д.Р. 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

Беремо стакан об'ємом 500 мл встановлюємо на технічні ваги, відтаровуємо та зважуємо 420 г глюкози, наважку поміщають у колбу об'ємом 4 л, при активному пермішуванні розчиняють у 1552 мл води з температурою 40°C . Закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують у автоклаві протягом 30 хв, 112°C, 0,05 МПа.

Д.Р. 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Беремо стакан об'ємом 300 мл встановлюємо на технічні ваги, відтаровуємо та зважуємо 15 БВК та 75 г кукурудзяного екстракту при активному пермішуванні розчиняють у 332,5 мл води з температурою 40°C та переносять у колбу об'ємом 1 л. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві протягом 112 °С , 0,05 МПа , 30 хв.

Д.Р. 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

Беремо стакан об'ємом 300 мл встановлюємо на технічні ваги, відтаровуємо та зважуємо 9 г $MgSO_4$ та 60 г NH_4NO_3 . Розчиняють у 255,3 мл дистильованої води, переносимо у колбу об'ємом 1 л. Стерилізують у автоклаві при 131 °С, режим стерилізації, 0,15 МПа, 40 хв.

Д.Р. 3.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г

Беремо стакан об'ємом 300 мл встановлюємо на технічні ваги, відтаровуємо та зважуємо 60 г $CaCO_3$ та суспендують у 0,1 л дистильованої води, переносять у колбу об'ємом 222 мл. Стерилізують у автоклаві при 131 °С, режим стерилізації, 0,15 МПа, 40 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 60 л.

Для культивування в інокуляторі об'ємом 60 л необхідно приготувати 30 л поживного середовища. Для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого 3 л (10%) та враховуючи конденсат який утворюється (10%), тому об'єм композиції становить: $V_k = 33 - 3 - 3 = 27$ л

Вміст компонентів для приготування 27 л поживного середовища наведено у табл. 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 27 л середовища

Таблиця 8.2

Компонент поживного середовища	Концентрація, кг/л	Вміст води у 27 л середовища, л	Композиція	Об'єм композиції, л
глюкоза	4,2	13,5	А	17,7
БВК (білково-вітамінний комплекс)	0,15	0,44	Б	3,79
кукурудзяний екстракт	0,75	2,5		
MgSO ₄	0,09	0,29	В	2,88
NH ₄ NO ₃	0,6	2		
CaCO ₃	0,6	2	Г	2,5
Разом	6,4	20,6		27

Д.Р. 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-9) у реактор-змішувач (Р-10) об'ємом 20 л вносять 3,78 г глюкози. Додають 12,2 л (враховуючи конденсат 10 %) питної води. Для розчинення у рубашку подають пару, для досягнення температури розчину 40°C і вмикають перемішувач. Для стерилізації в середовище подають гостру пару. Температура стерилізації – 112 °С (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв. Далі самопливом перекачують у інокулятор (ІН-43).

Д.Р. 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-11) у реактор-змішувач (Р-12) об'ємом 5 л вносять 0,15 г БВК та 0,75 г кукурудзяного екстракту, додають 2,89 л питної води. Для розчинення у рубашку подають пару, для досягнення температури розчину 40°C і вмикають перемішуючий пристрій. Для стерилізації в середовище подають гостру пару. Температура стерилізації – 112 °С (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв. Далі самопливом перекачують у інокулятор (ІН-43).

ДР. 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-13) у реактор-змішувач (Р-14) об'ємом 5 л вносять 0,9 г $MgSO_4$ та 0,6 г NH_4NO_3 та розчиняють у 2,19 л водопровідної води та вмикають перемішуючий пристрій для перемішування компонентів. Стерилізація проводиться в ферментері подачою гострої пари в середовище. Температура стерилізації 40 хв, 131 °С, 0,15 МПа. Для кращого розчинення компонентів подають глуху пару в сорочку ферментера. Далі самопливом перекачують у інокулятор (ІН-43).

ДР. 3.2.4. Приготування і стерилізація композиції Г

Беремо стакан об'ємом 300 мл встановлюємо на технічні ваги, відтаровуємо та зважуємо 0,6 г $CaCO_3$. Наважку переносим у колбу об'ємом 4 л та суспендуємо у 1,7 л водопровідної води, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві при 40 хв, 131 °С, 0,15 МПа. Далі самопливом перекачують в стерильних умовах (через факел) в інокулятор (ІН-43).

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту інокуляторі об'ємом 600 л.

Для культивування в інокуляторі об'ємом 600 л необхідно приготувати 300 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 30 л та враховуючи конденсат який утворюється (10%), тому об'єм композиції становить: $V_k = 330 - 30 - 30 = 270$ л, то загальна кількість поживного середовища, яке потрібно приготувати – 270

л. Вміст компонентів для приготування 270 л середовища наведено у табл. 4.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 270 л середовища

Таблиця 8.3

Компонент поживного середовища	Концентрація, кг/л	Вміст води у 270 л середовища, л	Композиція	Об'єм композиції, л
глюкоза	42	135,5	А	177,5
БВК (білково-вітамінний комплекс)	1,5	4,83	Б	38,03
кукурудзяний екстракт	7,5	24,2		
MgSO ₄	0,9	2,9	В	29,2
NH ₄ NO ₃	6	19,4		
CaCO ₃	6	19,4	Г	26,5
Разом	64	206		270

Д.Р. 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий (Д-15) дозатор у реактор-змішувач (Р-16) об'ємом 0,25 м³ вносять 42 кг глюкози. Після цього у реактор-змішувач заливають 135,5 л питної води та перемішують.

Стерелізацію здійснюють гострою парою. Для стерилізації в середовище подають гостру пару. Температура стерилізації – 112 °С (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв. Далі за допомогою насоса (Н-17) перекачують у інокулятор (ІН-46).

Д.Р. 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-18) у реактор-змішувач (Р-19) об'ємом 0,13 м³ вносять 1,5 кг БВК та 7,5 кг кукурудзяного екстракту, заливають 29 л питної води, вмикають мішалку для розчинення компонентів, після

перемішування її вимикають. Стерилізацію здійснюють гострою парою. Процес відбувається при температурі 112 °С, тиску – 0,05 МПа протягом 30 хв. Далі за допомогою насоса (Н-20) перекачують у інокулятор (ІН-46).

ДР. 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-21) у реактор-змішувач (Р-22) об'ємом 30 л переносимо 0,9 кг $MgSO_4$ та 6 кг NH_4NO_3 , заливають 22 л питної води, вмикають мішалку для повного розчинення компонентів, після перемішування її вимикають. Далі самопливом перекачують композицію в інокулятор (ІН-46).

Стерилізацію здійснюють в ферментері гострою парою. Процес відбувається при температурі 131 °С, тиску – 0,15 МПа протягом 40 хв.

ДР. 3.3.4. Приготування і стерилізація композиції Г

Через об'ємно-ваговий (Д-23) дозатор у реактор-змішувач (Д-24) об'ємом 30 л переносимо 6 кг $CaCO_3$. Додоють 19,4 л водопровідної води. Стерилізацію здійснюють гострою парою. Процес відбувається при температурі 131 °С, тиску – 0,15 МПа протягом 40 хв. Далі самопливом перекачують композицію в інокулятор (ІН-46).

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Для культивування в ферментері об'ємом 6300 м³ необхідно приготувати 2900 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 300 л та враховуючи конденсат який утворюється (10%), тому об'єм композиції становить: $V_k = 2900$ (враховуючи дробне внесення глюкози як підживлюючий розчин). Вміст компонентів для приготування 2900 л середовища наведено у табл. 4.5.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2900 л середовища

Таблиця 8.4

Компонент поживного середовища	Концентрація, к/л	Вміст води у 2900 л середовища, л	Композиція	Об'єм композиції, л
глюкоза	106	342	А	448
БВК (білково-вітамінний комплекс)	14,5	46,8	Б	367,8
кукурудзяний екстракт	72,5	234		
MgSO ₄	8,7	28	В	281,7
NH ₄ NO ₃	58	187		
CaCO ₃	58	187	Г	245
Конденсат	300			
Разом	318	1025		2900

Розрахунок підживлюючого розчину глюкози для дробного внесення

Табл.8.5

Компонент поживного середовища	Концентрація, кг/л	Вміст компонента у 560 л середовища, л	Об'єм композиції, л
глюкоза	300	967	1267

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація підживлюючого розчину глюкози для дробного внесення у ферментер об'ємом 6300 м³.

Для дробного внесення глюкози потрібно за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-37) відвантажити 300 кг глюкози та розчиняють у 967 л води. Стерилізацію проводять у реакторі-змішувачі (Р-38) об'ємом 1,60 м³. Для кращого розчинення компонентів в сорочку подається глуха пара. Температура стерилізації – 112 °С (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв. Далі за допомогою насоса (Н-39) перекачують у інокулятор (49).

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-25) у реактор-змішувач (Р-26) об'ємом 0,5 л відважують 106 кг глюкози. Після цього у збірник заливають 342 л питної води та вмикають перемішуючий пристрій для розчинення компонентів.

Стерилізацію здійснюють у реакторі-змішувачі через нижній пуск апарату гострою парю. Температура стерилізації – 112 °С (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації. Далі за допомогою насоса (Н-27) перекачують у інокулятор (ІН-49).

ДР 3.4.3. Приготування і стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-28) у реактор-змішувач (Р-29) об'ємом 0,4 м³ л відважують 14,5 г БВК (білково-вітамінний комплекс) та 72,5 г кукурудзяного екстракту. Заливають 280,8 л питної води, вмикають перемішувальний пристрій для розчинення компонентів.

Стерилізацію здійснюють в реакторі-змішувачі подачою гострої пари в середовище. Процес відбувається при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв. Далі за допомогою насоса (Н-30) перекачують у інокулятор (ІН-49).

ДР 3.4.4. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-31) у реактор-змішувач (Р-32) об'ємом 0,35 м³ відважують MgSO₄ 8,7 кг та 58 г NH₄NO₃. Заливають 215 л питної води та періодично. Вмикають мішалку для повного розчинення всіх компонентів, після перемішування її вимикають. Далі за допомогою насоса (Н-33) перекачують у інокулятор (ІН-49). Стерилізацію здійснюють в ферментері

подачою гострої пари в середовище. Процес відбувається при температурі 131 °С (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.4.5 Приготування і стерилізація композиції Г

Через об'ємно-ваговий дозатор(Д-34) у реактор-змішувач (Р-35) об'ємом 0,3 м³ відважують 58 кг СаСО₃. Заливають 187 л питної води. Вмикають мішалку, після перемішування її вимикають. Процес стерилізації відбувається в ректорі-змішувачі при температурі 131 °С (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв. Далі за допомогою насоса (Н-36) перекачують у інокулятор (ІН-49).

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП.4.1. Підтримання колекційної культури

Для засіву посівного матеріалу використовують партії продуцента, вирощеного на поверхні скошеного МПА. Для цього використовують косяки третьої генерації (термін зберігання не більше 7 діб).

Посівний матеріал повинен бути стерильним. Його можна зберігати при температурі 4 ± 2 протягом 24 діб, при цьому схожість культури зберігається не нижче 700 колоній в 1 мл при розведенні в 10 разів.

ТП 4.2. Одержання робочої культури з колекційної

Культуру з суцільного агару змивають стерильним фізіологічним розчином (5-7 мл в пробірку). Витримують 20-30 хвилин. Вирощування виробляють в термостаті при температурі 37°С протягом однієї доби.

ТП 4.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Культуру з суцільного агару від (ТП 4.1) змивають стерильним фізіологічним розчином (6-7 мл в пробірку). Засів пробірки виробляють суспензією, змитого з одного косяка. Витримують 10-20 хвилин. Вирощування виробляють в термостаті при температурі 37°С протягом однієї доби.

ТП 4.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л із 1972 мл розчину композиції А (від ДР 3.1.1) в асептичних умовах вносять 422,5 мл розчину композиції Б (від ДР 3.1.2), 324,3 мл розчину композиції В (від ДР 3.1.3) та 282 мл розчину композиції Г (від ДР 3.1.4). Перемішують і

розливають в 20 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл. У пробірку з робочою культурою *Bacillus subtilis* ВНИИ-48, вирощену на МПА, вносять 7 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою в асептичних умовах відбирають одержану суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують біомасу, одержану з однієї пробірки. Після вирощування бактерій у колбах на качалці (220 об/хв) упродовж 48 год культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 7 л. Активність культури 32 г/л.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л.

В інокулятор об'ємом 60 л, попередньо простерилізованою гострою парою вносять 3,79 л композицію Б (від ДР 3.2.2), 29,2 л композицією В (від ДР 3.2.3.) та 26,5 л композицією Г (ДР 3.2.4.) в асептичних умовах вносять 17,7 л стерильного розчину композиції А (від ДР 3.2.1.) та перекачують посівний матеріал із засівної колби через патрубок відкривши вентиль (від ТП 4.4) і вмикають перемішуючий пристрій. У ферментер подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване. У кожух ферментера подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода. Кожні 5-6 години здійснюємо мікробіологічний контроль, та визначення концентрацій біомаси, джерела вуглецю і азоту.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі (ІН-43) – 28-30 °С, тривалість –84 год. Швидкість перемішування становить 220 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 630 л. Активність культури 32 г/л.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 630 л.

В інокулятор об'ємом 630 л з, попередньо простерилізованою гострою парою вносять 38,03 л композицію Б (від ДР 3.3.3), 12,3 композицією В (від ДР 3.3.4.) , 12,12 л композицією Г (ДР 3.3.5) та в асептичних умовах вносять

177,5 л стерильного розчину композиції А (від ДР 3.3.2) та перекачують посівний матеріал із засівної колби через патрубок відкривши вентиль (від ТП 4.5) і вмикають перемішуючий пристрій. У ферментер подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване. У кожух ферментера подається холодна вода, а також виводиться оборотна вода. Кожні 5-6 години здійснюємо мікробіологічний контроль, та визначення концентрацій біомаси, джерела вуглецю і азоту.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі (ІН-46)- 28-30 °С, тривалість – 85 год. Швидкість перемішування становить 220 об/хв. Активність культури 32 г/л.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

В попередньо простерилізований ферментер об'ємом 6,3 м³ в асептичних умовах за допомогою насоса перекачують 367,8 л попередньо простерилізованою гострою парою композицію Б (від ДР 3.4.3) , 281,7 композиції В (від ДР 3.4.4), 245 л композиції Г (від ДР 2.4.5) та 448 л розчину композиції А (від ДР 3.4.2). Також додається підживлюючий розчин глюкози для досягнення заданої концентрації 1267 л (від ДР 3.4.1). За допомогою труби перетискування перекачують посівний матеріал (від ТП 5.6) і вмикають перемішуючий пристрій. Перемішуючим пристроєм слугує одновальна турбінна мішалка, якою обладнаний ферментер. Швидкість перемішування становить 250 об/хв. Тривалість виробничого культивування становить 85 годину при температурі 28-30 °С та тиску у ферментері 0,3-0,4 атм, рН 6,6-6,8. У ферментер подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване. У кожух ферментера подається холодна вода, а також виводиться оборотна вода.

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

Процес ферментації проводили в умовах високої аерації . Активність культури 32 г/л.

ТП 6. Відділення біомаси

ТП 6.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина з ферментеру відцентровим насосом подається в збірник культуральної рідини об'ємом 6,3 м³ (Р-11).

Зі збірника (Р-10) відцентровим насосом (Н-12) культуральна рідина подається у центрифугу безперервної дії зі шнековим вивантаженням осаду (Ц-13), де здійснюється центрифугування при 3800 об/хв, тривалість центрифугування становить 45 хв.

Супернатант, що утворився після закінчення процесу центрифугування, за допомогою відцентрового насоса (Н-12) подається у збірник об'ємом 5 м³ (Р-15) для подальшого процесу очищення.

Вивантаження біомаси здійснюється автоматично шнеком. Біомаса подається на знешкодження відходів (ЗВ 11.1).

ТП 7. Очищення інозину

ТП 7.1. Очищення інозину активованим вугіллям.

Концентрат після фільтрації (від ТП 4.1) подають у реактор-змішувач об'ємом 1 м³ (Р-15), у якому здійснюється очищення інозину активованим вугіллям. Очищення інозину проводять додаванням активованого вугілля до супернатанту.

Через ваговий дозатор (Д-14) подають 100 кг активованого вугілля окремими порціями, вмикають перемішуючий пристрій та постійно перемішують, витримують 24 год.

Після очищення супернатант за допомогою відцентрового насоса (Н-16) подається на фільтраційну установку (Ф-17), де відбувається процес фільтрації.

ТП 8. Фільтрація супернатанту

ТП 8.1. Фільтрація інозину

Фільтрація супернатанту (від ТП 3.1) здійснюється на фільтраційній установці (Ф-16) для концентрування супернатанту та очищення розчину інозину.

Супернатант зі збірника (З-18) за допомогою відцентрового насоса (Н-19) через фільтр попередньої очистки (Ф-20) подається на фільтраційний модуль (ФМ-21) де протягом 35 хв при температурі 25 °С здійснюється фільтрація на мембранах з діаметром пор 2 нм. Промивання мембран здійснюють водою питною.

Після фільтрації концентрат інозину за допомогою відцентрового насосу (Н-19) подається у реактор (Р-23) для подальшого освітлення інозину.

Пермеат відводиться по центральній трубі і передається на знешкодження відходів (ЗВ 11.2).

ТП 9. Екстракція інозину

ТП 9.1. Екстракція інозину 50% етанолом та 25% аміаком

Після фільтрації концентрат інозину подається у реактор-змішувач (Р-23) для екстракції розчину. Для освітлення нативного розчину потрібно дотримуватися такого порядку виконання роботи: Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-22) потрібно додати 57 л 50% етанолу та 25% аміаку (який попередньо закуповується), відношення-1:1 . Нагріти при $t=60$ °С . Через 2-3 год суміш випарюють.

Після екстракції супернатант за допомогою відцентрового насоса (Н-24) подається на випарну уставку (В-25), де відбувається процес концентрування.

ТП 10. Концентрування

ТП 10.1. Концентрування інозину

Після освітлення розчин інозину (від ТП 5.1) подається у випарну установку (В-24), де відбувається концентрування розчину.

Нагрітий пар надходить у простір між трубками й обігріває рідину, що подається зі штуцера. У результаті кипіння рідини в трубках утворюється парорідинна емульсія. У циркуляційній трубі теж проходить випарювання рідини.

Відділення крапель рідини від вторинного пару відбувається у сепараторі при русі його через систему відбійників: вторинний пар при цьому

потрапляє у конденсатор. Упарений розчин зливається в збірник через штуцер. Процес випарювання відбувається при 80°C протягом 1 год.

Після випарювання рідина через відцентровий насос (Н-26) по трубопроводі прямує до установки на кристалізацію (Кр-27).

ТП 11 Кристалізація інозину

ТП 11.1 Кристалізація

Процес кристалізації відбуватиметься на кристалізаторі з примусовою циркуляцією (Кр-26). Після випарювання рідина через відцентровий насос (Н-32) по трубопроводі прямує до установки на кристалізацію з примусовою кристалізацією.

Суспензія з посудини кристалізатора циркулюють по методу витіснювальний руху рідини через теплообмінник і знову повертається в посудину кристалізатора, де її перенасичення знімають шляхом осадження матеріалу на кристалах, присутніх в суспензії. Випарений розчинник подається в вакуумну систему, де він конденсується і видаляється.

Кристалізація відбувається при понижені температури до 6-8°C протягом 5 год після цього кристали пропускають через нутч-фільтр.

Для кращої очистки інозину кристали потрібно відправити на перекристалізацію і після цього знову на нутч-фільтр.

Після кристалізації інозит за допомогою відцентрового насоса (Н-34) подається на сушильницю установку (С-35), де відбувається процес сушіння інозину.

ТП 12. Сушіння

ТП 12.1. Сушіння інозину

Сушіння інозину здійснюють у розпилювальній сушильній шафі (С-34).

Перед сушінням здійснюють завантаження вологого осаду на піддони (П-38) (вологість осаду становить 60-80%) (від ТП 7.2). Перед сушінням відкривають вакуумний клапан, включають вакуумний насос і створюють в сушильній камері необхідний тиск (6,6 мбар).

Сушіння здійснюють при 50 °С протягом 16 годин до вологості інозину 5%.

Після процесу сушіння інозин має вигляд порошку, тому немає необхідності подрібнювати та просіювати інозин.

ПМВ 13. Фасування та пакування інозину

ПМВ 13.1. Фасування висушеного інозину

Фасування порошку інозину здійснюють на фасувальному автоматі (ФМ-37) у поліетиленові пакети по 1 кг.

Подрібнений і просіяний порошок інозину (*від ТП 9.1*) подається у накопичувальний бункер вагового фасувального автомату, звідки за допомогою вагового дозатора фасується по 1 кг у поліетиленові пакети, які формуються на пристрої для формування 3-х шовної упаковки, далі пакети запаюються за допомогою вузла запаювання поздовжнього і поперечних швів упаковки та маркуються.

ПМВ 13.2. Пакування у коробки

Пакування поліетиленових пакетів з порошком інозину (*від ПМВ 10.1*) у картонні коробки здійснюється вручну. Коробки відвантажуються на склад.

ЗВ 14. Знешкодження відходів

ЗВ 14.1. Знешкодження твердих відходів

Утилізацію твердих відходів найкраще здійснювати або аеробним, або анаеробним біологічним методом, за допомогою яких відбувається не тільки утилізація відходів, а й утворюються цінні продукти (біогаз), покращуються властивості ґрунту.

Перетворення біомаси у вторинний енергоносій відбувається за допомогою мікроорганізмів. При анаеробному бродінні біомаси під впливом різних груп бактерій відбувається утворення біогазу, який складається в основному з метану (55-70%) і вуглекислого газу (25-35%) [37].

Аеробне перетворення біомаси (компостування) відбувається на повітрі, тепло, яке звільняється при цьому, можна використовувати в теплових насосах або як низькотемпературне тепло [37].

Компостні ряди з природною аерацією повинні мати трикутну в перетині форму, ширину 2,5 м, висоту 1,5 м і будь-яку довжину. У таких рядах матеріал можна кілька разів перемішати, а іноді він може і не вимагати перемішування, якщо структура матеріалу забезпечує нормальну аерацію, температура не піднімається вище 60°C [38].

ЗВ 14.2. Знешкодження рідких відходів

Схема очищення стічних вод включає наступні етапи:

1) Механічне очищення. Здійснюється відстоюванням або фільтрацією. В результаті механічного очищення кількість мінеральних забруднень знижується на 60-70%, а БСК - на 30%. Крім того, проведення даного етапу очищення дуже важливо для встановлення рівномірного руху стоків (їх усереднення), що дозволяє уникнути значних коливань об'єму стічних вод на наступному біологічному етапі [39].

2) Біологічне очищення – за допомогою біофільтрів. Принцип дії біофільтра полягає в наступному: водорозподільний пристрій забезпечує рівномірне зрошення стічною водою поверхні завантаження біофільтра, дренажний пристрій служить для видалення очищеної стічної води. Знизу подається постійний потік повітря для аерації.

При контакті стічної води з біоплівкою відбувається сорбція органічних забруднень поверхнею біоплівки. Під час паузи між зрошеннями сорбовані забруднення окиснюються, і відновлюється сорбційна активність біоплівки. У біофільтрі відбувається безперервний приріст і відмирання біоплівки. Відмерла плівка виноситься проточною водою і осідає у вторинних відстійниках [38].

3) Дезінфекція стічних вод – відбувається остаточне знезараження стоків. Знезараження очищених стічних вод здійснюють за допомогою установок ультрафіолетового опромінення, або протягом 30 хвилин проводиться обробка хлором.

Але так як хлор є дуже токсичною хімічною речовиною і може представляти величезну небезпеку для навколишнього середовища, то

доцільніше для знезараження стоків використовувати інші реагенти: дезавіт, гіпохлорит або здійснювати озонування [39].

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва інозину

9.1. Мікробіологічний контроль інозину

До мікробіологічного контролю входить: забезпечення та підтримання умов, необхідних для нормальної росту та розмноження мікроорганізмів-продуцентів; постійний контроль виробничого процесу та в кінцевому етапі готової продукції; стерильність умов виробництва та своєчасне виявлення контамінації, встановлення джерела її появи [17].

Протягом всього часу вирощування посівного матеріалу та процесу виробничого біосинтезу відбирають кожні 5-8 годин проби з культуральної рідини для аналізів. Із відібраних проб роблять мікроскопіювання та візуально оглядають. Для визначення можливих заражень під час виробництва здійснюється періодичний посів проб на чашки Петрі із агаризованими середовищами .

Колонії бархатисті, дробнозморшкуваті, сухі, безбарвні чи рожеві. Край колонії трохи хвилястий. Вирощування відбувається на МПА. Ця бактерія-хемоорганогетеротроф, також розщеплює крохмаль, глікоген та амоніфікує білки. Після посіву штрихом на середовищі МПА спостерігається помірний ріст, поверхня матова, край колоній гладенький, забарвлення жовто-кремове. Якщо здійснити посів уколом спостерігається слабкий ріст у товщі агару, а на поверхні ріст помірний (Рис.9.1).

					НУХТ БТЕК 04.02.32 ДП ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Терещук.Д.О			РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Волошина.І.М					119	118
Консультант						Кафедра БТМ 118		
Зав.каф.		Пирог Т.П.						

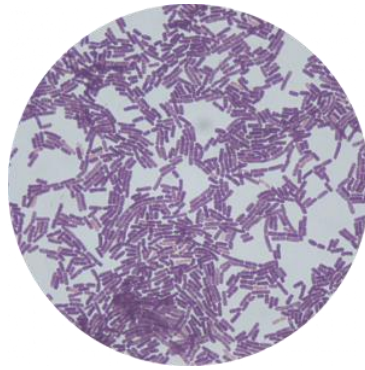


Рис. 9.1 Клітини мутантного штаму *Bacillus subtilis* ВНИИ-48 на середовищі МПА (збільшення 40х)

Для мікроскопіювання використовують зазвичай препарати «роздавлена крапля». Для того щоб провести дослід у вигляді «роздавленої краплі» на середину чистого, знежиреного предметного скла потрібно нанести маленьку краплину води, перенести в неї невелику кількість культуральної рідини, добре перемішати, зверху накрити покривним склом та мікроскопіювати. Мікроскопіювання відбувається зі збільшенням об'єктиву на 8х та 40х.

9.2.Спосіб отримання інозину з культуральної рідини

Культуральну рідину у кількості 0,5 л відбирають з ферментера, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 1500 об., 15-20 хв. Одержану суміш витримують ~ 10 год при $t=4^{\circ}\text{C}$, осад відокремлюють центрифугуванням при 1200 об., 5 хв. До супернатанту додається 10 г активованого вугілля та витримують 24 год при $t=4^{\circ}\text{C}$.

Водну фракцію відокремлюють фільтруванням, до твердої фази, далі потрібно додати 20 мл 50% етанолу та 25% аміаку (1:1). Нагріти при $t=60^{\circ}\text{C}$. Через 2-3 год суміш фільтрують та випарюють при 10 мм рт. ст. Отриманий продукт екстрагують 0,3 М NH_4 -форміатним буфером ($\text{pH} = 8,9$), промивають ацетоном (2×10 мл).

Кінцева очистка інозину проводилася методом ІОХ на відкаліброваній колонці з ручним відбором проб розмірами 150×10 мм з катіонообмінною смолою. [10] Аналітичне визначення інозину проводять в об'ємі 10 мкл на хроматографічних пластинках (150×150 мм) із закріпленим шаром флуоресцентного носія. Елюювання плям проводять 0,1 н. HCl . УФ-

поглинання елюатів визначали на спектрофотометрі, використовуючи стандартну калібрувальну криву.

9.3.Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначаємо за оптичною густиною клітинної суспензії та із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності із калібрувальним графіком [9].

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

9.4.Визначення амінного азоту

В основі даного методу визначення амінного азоту є взаємодія амінокислоти із формаліном, як висновок-утворюються метиленові з'єднання.

Утворені кислоти можуть бути відтитровані лугом.

Вміст амінних груп визначають за кількістю лугу, що був витрачений на титрування.

Реактиви та матеріали :

- Формалін - 40%-ий розчин
- 1%-ий спиртовий розчин фенолфталеїну
- NaOH - 0,5 н .; 0,05 н.
- Індикатор - брометиловий синій
- Гліцин - 0,5 г

Методика проведення аналізу

У мірну пробірку (об'ємом 10 мл) вносять 0,5 г гліцину та доводять до 10 мл водою, при перемішуванні розчиняють. Вміст пробірки переносять до плоскодонної колби, об'ємом 200 мл. В колбу вносять 10 мл супернатанту культуральної рідини (культуральну рідину у кількості 50 мл, що попередньо було злито з ферментера, переносять до центрифужних пробірок та центрифугують при 2000 об., 10 хв.), далі до отриманої суміші додають приблизно 5 крапель брометилового синього, в ході реакції розчин

забарвлюється у жовтий колір. Пізніше додають 3 краплі 0,05 н. NaOH та спостерігається перехід до жовто-зеленого забарвлення (для нейтралізації розчину, рН 7,0). До розчину приперемішуванні додають 2 мл формалінової суміші (25 мл 40%-вого розчину формаліну та 1 мл 1%-вого спиртового розчину фенолфталеїну), після чого розчин титрують 0,5 н. NaOH до появи яскраво-синього забарвлення (рН 9,7).

Паралельно проводять аналогічний дослід із водою (10 мл), тобто контроль. При додаванні індикатора спостерігається зміна забарвлення води на зелене. Після додавання формалінової суміші розчин набуває жовте забарвлення. Титруємо до рН 9,7.

Розрахунок амінного азоту ведуть за формулою:

$$X = (a - б) \cdot T \cdot 0.7$$

де X - кількість амінного азоту, що міститься в 2 см³ досліджуваного зразка;
а - кількість см³ 0,5 н. NaOH, витраченого на титрування випробуваного зразка; б - кількість см³ 0,5 н. NaOH, витраченого на титрування контрольного зразка; T - поправка до титру; 0,7 - коефіцієнт перерахунку, при використанні 0,05 н. NaOH (1 см³ 0,05 н. NaOH відповідає 14 · 0,05 = 0,7

9.5.Спосіб визначення амонійного азоту

Метод Несслера ґрунтується на утворенні важкорозчинної забарвленої сполуки при взаємодії реактиву Несслера (K₂HgI₄) із аміаком при нейтральних або лужних розчинах:



Великого надлишку лугу потрібно уникати, тому що може відбутися розкладання NH₂Hg₂I₃ із утворенням оксиду ртуті. Забарвлена сполука NH₂Hg₂I₃ сприятливий до утворення негативно заряджених колоїдних частинок. Для того щоб отримати рівномірну та стійку суспензію до розчину потрібно додати захисний колоїд – полівініловий спирт чи желатин. За малих концентраціях аміаку колоїдні розчини набувають жовтого забарвлення, якщо збільшити концентрацію з'являється бурий відтінок. Отриманий в ході дослідів колоїдний розчин, здатний до коагуляції та значно понижує

відтворюваність результатів аналізу, що були одержувані методом Несслера. Для визначення аміаку до 1 мл супернатанту додають 1 мл реактиву Несслера. Коефіцієнт екстинції вимірюють при довжині хвилі 400–425 нм. Концентрацію аміаку визначають за допомогою калібрувального графіку. Фотометричному визначенню азоту методом Несслера заважають іони, які випадають у осад в лужному середовищі та в ході цього утворюють нерозчинні сполуки з йодид - іонами та іонами ртуті [9].

9.6.Визначення концентрації глюкози

Основним джерелом вуглецю в поживному середовищі виступає глюкоза. Його концентрація визначається модифікованим глюкозооксидазним методом з використанням біосенсорів із іммобілізованою глюкозооксидазою та амперометричним датчиком.

Культуральну рідину у кількості 50 мл (була попередньо відібрана з ферментера), переносять до центрифужних пробірок та центрифугують при 1500 об/хв 15-20 хв, далі суспензію фільтрують через фільтрувальний папір, фільтрат відбирають у окрему ємність для аналізів.

Відбирається об'єм проби, далі його розводять у 250-1000 разів, потім від розведеного розчину відбирають 5-10 мл та переносять 20 мл 20 мМ буферного розчину системи: KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 із рН 7.2. До отриманої системи додають глюкозооксидазу іммобілізовану на полімері ЕДТ (20 мМ фосфатному буфері, рН 6,2, що складалася із 10^{-2} М 3,4-етилендіокситіофену, 10^{-3} М поліетиленгліколю і 30 мг/мл розчину ГОД), що має вигляд суспензії.

Вимірюють концентрацію глюкози за допомогою амперометричного перетворювального приладу, до складу якого входить традиційна триелектродна система, в якій присутній друкований електрод SensLab (SensLab GmbH, Leipzig, Німеччина), що [15] поєднує у собі всі три електроди: платиновий робочий, поміжний і електрод порівняння. Платинові друковані електроди SensLab досліджували на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до +600 мВ. Вимірювання проводять опусканням

датчика амперометричного приладу у розчин-систему із глюкозооксидазою і підготовленою для досліду культуральною рідиною.

Величина, яка вимірюється - сила струму, яка визначається у нА. Концентрацію глюкози визначають за допомогою градуовального графіку залежності сили струму (нА) та концентрації глюкози (мМ) [9]. Одержане значення концентрації спочатку перемножують на ступінь розведення, а пізніше переводять концентрацію з мМ у г в певному об'ємі або г/л[8].

9.7. Гідроліз білків біомаси.

До 10 мг сухої біомаси після обробки сумішу хлороформ-метанолацетон (2:1:1об.%) додавали 5 мл 6 н. 2 НСІ. Ампули витримували при 110 ° С в Протягом ~ 24 год. Після цього реакційну масу суспендованих в гарячій 2H₂O, фільтрували. Гідролізат упаривали при 10 мм рт. ст. залишки 2НСІ видаляли шляхом витримування в ексікаторі над твердим NaOH.

9.8. Гідроліз внутрішньоклітинних полісахаридів.

50 мг сухої біомаси поміщали в круглодонну колбу місткістю 250 мл, додавали 50 мл дист. H₂O і 1.6 мл 25% -ної H₂SO₄ (в 2H₂O) і кип'ятили і витримували на водяній бані протягом ~ 90 хв. Після охолодження реакційну суміш суспендованих в одному об'ємі гарячої дист. H₂O і нейтралізували 2 н. Ва(OH)₂ (в 2 H₂O) до рН 7.0. Випав осад ВаSO₄ відокремлювали центрифугуванням (1500 g, 5 хв), супернатант упарювали при 10 мм рт. ст.

9.9. Визначення вологості

Визначення вологості інозину після сушіння проводять за допомогою аналізатора вологості RADWAG MA 50.R (рис. 9.6).



Рис. 9.2. Аналізатор вологості RADWAG MA 50.R

Аналізатор вологості - професійний прилад для контролю вмісту вологості в зразку із удосконаленою технологією висушування зразка.

Даний аналізатор слід віднести до непрямого вимірювання вмісту вологості. Принцип визначення вологості продукту: зразок продукту поміщають до сушильної камери та проводять визначення різниці маси зразка до і після його висушування.

Аналізатор вологості забезпечений системою калібрування маси тари, який дозволяє отримати результат вимірювання із високою точністю.

Максимальна маса аналізованої речовини становить 200 грам. Мінімальна маса аналізованої речовини становить 50 грам.

Діапазон вимірювання вмісту вологості становить від 0...100%. Відносна точність вимірювання вмісту вологості приблизно 0,01%.

Час необхідний для проведення експрес-аналізу вмісту вологості від 1...60 с [68]

9.10. Карта контролю

Таблиця 9.1

Карта постадійного контролю стадій виділення та очищення інозину

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
K _x 1.1.1 Підготовка робочого розчину Каустичної соди	Концентрація розчину каустичної соди	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 2 %
K _x 1.1.2 Приготування робочого розчину Гембару	Концентрація розчину Гембару	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 0,5 %
K _T , K _M 1.2.1, 1.2.2 Підготовка виробничих приміщень	М/б чистота поверхонь виробничих приміщень (стіни, підлога, двері)	Змиви тампонами або метод відбитків	Після прибирання	В змивах з площею 10 x 10 см допускається ріст не більше 50 м м/о (бактерій і грибів сумарно);
K _T 1.3.1, 1.3.2 Технологічний контроль миття обладнань та комунікацій	Обладнання та комунікації, температура	Термометр технічний, годинник	Під час проведення миття	t = 40 °C, τ = 30 хв
K _T 1.3.3, 1.3.4 Технологічний контроль герметичності обладнання	Обладнання та комунікації, тиск	Датчик	Після миття та ополіскування обладнання	P = 0,01 МПа, τ = 1 год
K _T , K _M 1.3.5 Стерилізація обладнання	Обладнання, режим стерилізації вузлів, тиск, температура, мікробна контамінація.	Манометр, термометр м/б метод, висіви на	Температура та тиск визначаються безперервно під час виробничого процесу.	p = 0,003, 0,005 Мпа, t = 130°C, τ = 1 год

		чашки Петрі		
К _т 2.2 Попереднє грубе очищення	Повітря, ступінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Пезперервно при подачі повітря	E = 90%
К _т 2.3 Компресування повітря	Повітря, температура, тиск стиснення повітря	Термометр, мономент технічний	Після компресування повітря	p = 0,35 МПа, t = 120-250 °С
К _т 2.4 Охолодження повітря	Повітря, температура	Темометр технічний	Після охолодження повітря	t = 25-40°С,
К _т 2.5 Видалення зайвої вологи	Вологість повітря	Психромет-ричний метод	Видалення зайвої вологи	W=60-70%
К _т 2.6 Нагрівання повітря	Повітря, температура	Темометр технічний	Після нагрівання	t = 35°С
К _т 2.7 Очищення на головному фільтрі	Повітря, вміст часток, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очищення повітря у головному фільтрі	E = 96 %
К _т 2.8 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря, тупінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Безперервно при подачі повітря	E = 99,99%
К _т , К _м 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2, 3.4.2 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 20 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
К _т , К _м 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2, 3.4.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 20 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
К _т , К _м 3.1.3, 3.2.3, 3.3.3,3.4.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Композиція В Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
К _т , К _м 3.1.4, 3.2.4, 3.3.4,	Композиція Г	Манометр, годинник,	Температура визначається	t= 131 °С, τ= 40 хв,

3.4.4 <i>Приготування і стерилізація композиції Г</i>	Тиск, температура, час, стерильність	мікробіологічний контроль	безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P=0,15$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1. <i>Підтримання колекційної культури</i>	Температура, час, асептичність	Термометр технічний, мікробіологічний контроль	Температура, час та зовнішній вигляд визначається безперервно під час підтримання культури	$t = 3-4$ °С, $\tau = 3-4$ місяці., відсутність сторонньої мікробіоти
Км, Кт 4.2. <i>Одержання робочої культури на агаризованому середовищі</i>	Температура, час, асептичність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і зовнішній вигляд визначається під час виробничого процесу. Мікробіологічний контроль по закінченню процесу	$t = 30$ °С, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Км 4.3 <i>Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі</i>	Колекційна культура <i>Bacillus subtilis</i> ВНИИ-48 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин	Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин	$t = 28 \pm 2$ °С, $\tau = 24$ год, $\omega = 250$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти $c = 32$ г/л
Кт, Км 4.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 60 л</i>	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин	$t = 30$ °С, $\tau = 24$ год, $\omega = 250$ об/хв, $P_{\text{надл.}} = 0,02$ МПа, відсутність сторонньої мікробіоти $c = 32$ г/л,
Кт, Км 4.6 <i>Вирощування культури в</i>	Посівний матеріал , тривалість вирощування,	Годинник,	Температура і швидкість обертання контролюються і	$t = 30$ °С, $\tau = 24$ год, $\omega = 300$ об/хв,

<i>інокуляторі об'ємом 630 л</i>	температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп	підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин	$P_{\text{надл.}}=0,02$ МПа, відсутність сторонньої мікробіоти $c=32$ г/л,
Кт, Кх, Км 4.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 6300 л</i>	Культуральна рідина , тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, концентрація клітин <i>Bacillus subtilis</i> ВНИИ-48	Датчик рН Годинник, термометр технічний, тахометр, манометр, мікроскоп	рН визначають в останні години культивування; температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання – кожні 8 годин	$t=24$ °С, $\tau=84$ год, $\omega=300-400$ об/хв, $P_{\text{надл.}}=0,02$ МПа, відсутність сторонньої мікробіоти, $c=32$ г/л, рН=6,6-6,8
Кт, Кх, Км 5.1 <i>Концентрація цільового продукту в рідині</i>	Температура, концентрація продукту, час,	Годинник, термометр	рН визначають в останні години культивування; температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання – кожні 8 годин	$t=24$ °С, $\tau=84$ год $c=32$ г/л,

Кт 6.1 <i>Центрифугування культуральної рідини</i>	Культуральна рідина, частота обертання, час	Годинник, датчик обертів	Під час процесу центрифугування	$n=3800$ об/хв $\tau=45$ хв
Кт 7.1 <i>Очищення інозину активованим вугіллям</i>	Супернатант, час	Годинник,	Під час процесу очищення	$\tau=24$ год, $m=100$ кг
Кт 8.1 <i>Фільтрація інозину</i>	Супернатант, температура, час, діаметр пор мембрани	Термометр технічний, годинник, перевірка діаметру пор згідно паспорту мембрани	Під час процесу фільтрації	$t=20$ °С $\tau=30$ хв, d пор = 2 нм
Кт, Кх 9.1 <i>Осадження інозину 50% етанолом та 25% аміаком</i>	Концентрат, концентрація аміаку та етанолу, температура	Термометр технічний, дозатор	Температура визначається під час освітлення, концентрація аміаку та етанолу перед початком процесу	$t=60$ °С, $C1=50\%$, $C1=25\%$,
Кт 10.1 <i>Концентрування інозину</i>	Концентрат інозину, температури, час	Годинник, Термометр технічний,	Під час процесу концентрування	$t=80$ °С, $\tau=60$ хв

1	2	3	4	5
Кт 11.1 <i>Кристалізація інозину</i>	Концентрат інозину, час	годинник	Під час процесу кристалізації	$t_1=65-70^{\circ}\text{C}$, $t_2=6-8^{\circ}\text{C}$, $\tau=5$ год
Кт 12.1 <i>Сушіння інозину</i>	Кристалічний осад інозину, температура, час	Годинник, датчик температури, манометр, датчик вологості	Під час процесу сушіння	$t=50^{\circ}\text{C}$, $\tau=16$ год, $n=5$ об/хв, $P=6,6$ мбар, $W=5\%$

РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва

Принцип роботи **розпилювальної сушарки** полягає в тому, що висушуваний матеріал безперервно подається зверху на відцентровий механізм та розпилюється на частинки розміром приблизно 60-70 мкм.

Теплоносій поступово надходить знизу через направляючу насадку із високою швидкістю. За рахунок великій поверхні контакту, високим швидкостям руху частинок матеріалу та сушильного агента, сушіння інозину відбувається дуже швидко.

За рахунок розпилювальної сушарки досить швидко та легко можна висушувати розчини та отримувати ідеально подрібнений сухий продукт.

Тривалість розпилювальної сушки невелика, перебування продукту в сушарці становить 1-2 хв.

При поєднанні маси із теплоносієм волога відразу випаровується, частинки охолоджуються тому, незважаючи на високі температури теплоносія на виході та вході, препарат не нагрівається більше як на 35-40 °С.

Отже, виходячи із всіх тверджень обираємо розпилювальну сушарку марки DPSD-5000 (рис. 1) продуктивність якої становить 5000 кг/год.

Переваги даної сушарки:

- Немає необхідності після сушіння продукту ставити процес подрібнення та просіювання, адже інозин рівномірно розпилюється. Тому відразу відправляємо продукт на пакування;
- Покращені показники чистоти та якості одержуваного продукту;
- для того, щоб попередити забрудненню продукту та продовжити термін роботи обладнання використовується високоякісна нержавіюча сталь для виробництва деталей розпилювальної сушарки, що контактують із продуктом [3].

					НУХТ БТЕК 04.02.32 ДП ПЗ		
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Терещук.Д.О			Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Волошина.І.М				133	131
Консультант					Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Пирог Т.П.					



Рис. 10.1. Розпилювальна сушарка DPSD-5000

В комплект обладнання сушки входить: сушильна камера, над якою знаходиться розпилювальний пристрій у вигляді відцентрового розпилювального диска, що закріплений на валу електричного двигуна.

Окрім того до складу сушарки входить паровий підігрівник, що нагріває повітря за допомогою парою із тиском приблизно 1 МПа.

Отже, сушіння інозину доцільно здійснювати за допомогою розпилювальної сушарки, тому що вона продуктивною, не відбувається руйнування продукту за рахунок високих температур, а також здійснюється подрібнення інозину, і тому подальше подрібнення та просіювання продукту не доцільною.

Принцип роботи розпилювальної сушарки:

Вологий продукт (інозин) за допомогою насоса подається до диска для розпилення, що обертається з частотою приблизно 11 000 об/хв, та за участі відцентрової сили виходить на дуже великій швидкості за межі диска, розпилюючись у сушильній камері.

Гаряче повітря з температурою приблизно 120-350 °С, що здійснює сушка, надходить за допомогою кільцевого отвору до камери над обертовим диском та за допомогою наявних спеціальних напрямних переміщається до сушильної камери по спіралі.

Температура в камері становить приблизно 80-100 °С.

Для того, щоб відділити частинки продукту від повітря, які виходять із сушарки, спеціально поставлений циклон [4].

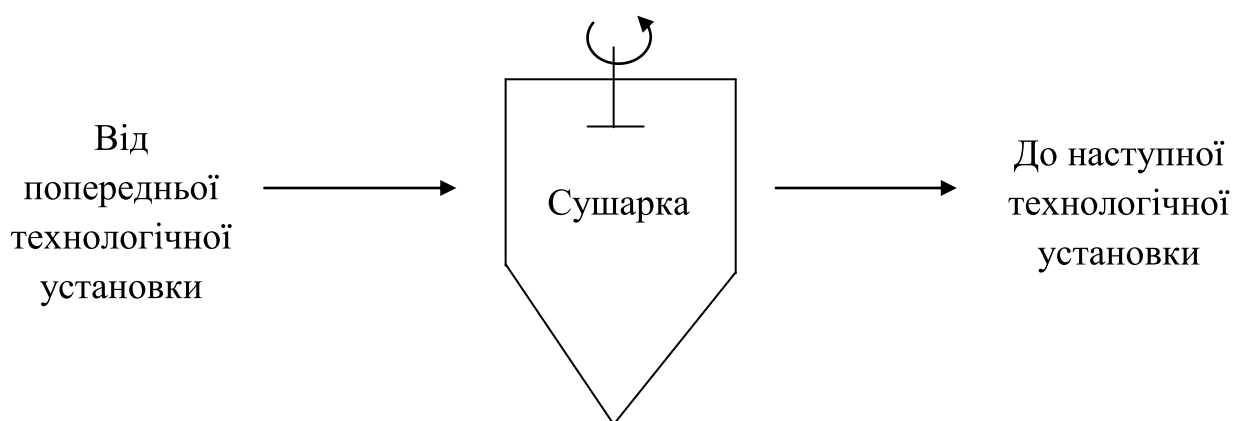


Рис. 10.2. Машинно-апаратурна схема процесу сушіння

Отже, автоматизація розпилювальної сушарки повинна відповідати таким основним вимогам:

1. Контроль та регулювання температури повітря на вході та виході.
2. Контроль та регулювання температури в камері сушильної установки.
3. Контроль та управління частотою обертання розпилювального пристрою в апараті.

Завдання на розробку системи автоматизації

№	Машина, апарат	Параметр	Значення параметру, допустимі відхилення	Система автоматизації		
				Вид СА	Характер контролю, регулювання, управління	Засоби управління та контролю
1	Розпилювальна сушарка	Температура повітря на вході до камери	120-350 °С	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
2		Температура в камері	80-100 °С	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Дія на подачу теплоносія у апарат
3	Частота обертання розпилюючого пристрою	11 000 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора	
			Управління	Пуск/стоп, зміна частоти	Частотний перетворювач	

ОПИС СХЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ ТА СПЕЦИФІКАЦІЯ ЗАСОБІВ АВТОМАТИЗАЦІЇ

В **першому контурі** автоматичного контролю, у розпилювальній сушарці необхідно контролювати температуру повітря на вході та виході у сушильну камеру, яка має регламентоване значення 120-350 °С.

Спостерігаючи за зміною температури передбачається на АРМі оператора-технолога зі реєстрацією цих змін у його архіві.

Температура вимірюється за допомогою датчика термопари (1а). Сигнал від датчика подається на контролер.

В **другому контурі** автоматичного контролю та управління, у розпилювальній сушарці необхідно постійно контролювати та регулювати температуру в камері, яка має регламентоване значення 80-100 °С.

Спостереження за зміною температури передбачається на АРМі оператора-технолога із реєстрацією цих змін в його архіві.

Для регулювання температури спостерігається стабілізація на заданому значенні за рахунок подачі гарячого повітря до сушильної камери.

Температура вимірюється за допомогою датчика термоперетворювача опору (2а). Сигнал від датчика подається до контролера та в залежності від температури відбувається управління подачею повітря регулюючим органом, тобто пневматичним регулюючим клапаном (2в), який приводиться в дію за допомогою перетворювача електропневматичного (2б).

У **третьому контурі** автоматичного контролю та управління, необхідно постійно контролювати та регулювати частоту обертання розпилюючого пристрою, що має регламентоване значення приблизно 11000 об/хв.

Спостереження за зміною роботи частоти обертання передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві.

Для управління частотою обертання ротора передбачається її зміна за допомогою частотного перетворювача (3а).

Специфікація засобів автоматизації наведена у *табл. 3*.

Таблиця 10.2

Специфікація засобів автоматизації

№	№ позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
1	2	3	4	5
1	1а	Цифровий термометр з термопарою К-типу і датчиком температури повітря, клас точності – 1%, діапазон вимірювань: - 50...750 °С [1].	HYELEC MS6501	Hyelec (Китай)
2	2а	Датчик температури - термоперетворювач опору, вихідний сигнал 4...20 мА, клас точності – 0,25%, діапазон вимірювань: - 50...180 °С [5].	50М	«ТЕРА» (Україна)
3	2б	Перетворювач електропневматичний, вхідний сигнал 4...20 мА, вихідний сигнал 20–100 кПа, номінальний тиск 140 кПа. Клас точності – 1% [6].	ЭП-1324	ЧП "КОМП" (Україна)
4	2в	Клапан регулюючий пневматичний, управляючий сигнал 20-100 кПа, допустима максимальна температура 550 °С [7].	GV2	Doruk Endustri (Туреччина)
5	3а	Частотний перетворювач, потужність – 1,5 кВт, вихідна напруга - 220В [8].	VFD015M2 1А.	Delta (Тайвань)

Підбір засобів автоматизації здійснювався за допомогою електронних ресурсів:

- 1- <https://prom.ua/p830110356-klapan-pnevmaticheskij-reguliruyuschij.html>
- 2 – <https://prom.ua/p606565353-preobrazovatel-chastoty-vfd.html>
- 3 - <https://prom.ua/p656984078-tsifrovoj-termometr-hyelec.html>
- 4- <https://prom.ua/p3486527-termopreobrazovatel-soprotivleniya-50m.html>
- 5-<https://prom.ua/p750899470-preobrazovatel-elektropnevmaticheskij-1324.html>

Список використаної літератури:

1. *Пирог. Т.П.* Загальна мікробіологія: Підруч. - 2-е вид., доп. I перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
2. Загальна мікробіологія і вірусологія: Метод. Рекомендації до викон.курс.роботи для студентів напряму 6.051401 “Біотехнологія” ден.форм.навч. / Уклад: *Т.П.Пирог, А.П.Софілкавич, А.Д.Конон.* - К.: НУХТ, 2011. – 26 с.
3. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: За редакцією *В.П. Широбокова* / Видання 2-е. – В.: Нова книга, 2011. – 952 с.
4. *Т.П. Прищеп, В.С. Чучалин, К.Л. Зайков и др.* Основы фармацевтической биотехнологии. – Ростов н/Д.: Феникс, 2006. – 251 с.
5. Фотометрические методы определения аммиака [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://c-carbon.info/?p=745>.
6. Пат. 790781(13)A1(51) . СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИНОЗИНА / *Ерохина Л.А., Казаринова Л.И., Юдина Л.И, Дебабов В.Г., Полунин А.Н., Кузнецова О.А., Юдина Р.И., Орехова В.М., Кузменок В.А., Чагин Б.А., Савина Н.Н.* // – Опубл. 17.12.2012.
7. Пат. 2244004C2. Способ получения инозиновой кислоты / *Гронский С.В., Закатаева Н.П., Лившиц В.А.* // – Опубл. 15.07.2014
8. *Герхарт. Ф.* Методы общей бактериологии. – М.: Мир, 1984 – 472 с.
9. *Александрова Л.Н., Найденова О.А.* Лабораторно-практические занятия по почвоведению. – Москва.: 1976. – 205 с.
10. Пат. 2027762. Способ получения пуринасодержимых продуктов/ *Башкович А.П., Пучков А.И., Федонина Е.А.*//- Опуб. 27.01.1995.
11. Пат.5061178/13 Штамм бактерий bacillus subtilis - продуцент инозина/ *Казаринова Л.А., Шакулов Р.С., Марков Р.Ф., Шипанов Н.П., Савина Н.Н.* // Опуб.25.07.2010.

12. Компендіум. Лікарські засоби. [Електронний ресурс] . – Режим доступу: <http://compendium.com.ua/info/95468>. Загл. з екрану. Дата звернення: 20.03.2016.
13. *Гойтман А.І.* Вивчення процесу біосинтезу інозину в регульованих умовах з використанням методу матеріально - енергетичного балансу. дис. На здобуття наукового ступеня к.б.н. Л, 1985. – 138 с.
14. *Казаріонова Л.А., Кострахіна М.А.* Вивчення умов біосинтезу інозину мутантами *Vacillus subtilis*. М: Мікробіологічна промисловість, 1973. – 21с.
15. *Сидоров Ю.І.* Пілотні ферментери // Журнал “Біотехнологія”, 2012. –Т.5, №3. – с. 20-25.
16. *Андріанова Т.В., Бобир В.В., Виноград Н.О.* та ін. Медична мікробіологія, вірусологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / За редакцією В.П. Широбокова / Видання 2-е. – В.: Нова Книга, 2011. – 952 с.
17. SIGN (Scottish Intercollegiate Guidelines Network). Risk Estimation and the Prevention of Cardiovascular Disease. A National Clinical Guideline. 2007. Report
18. World Health Organization. *Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases.* 2002. Report No. 916.
19. *Last JM*, ed. A Dictionary of Epidemiology. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2001.
20. *Ferret BS, Colkesen EB, Visser JJ, Spronk S, Kraaijenhagen RA, Steyerberg EW, Hunink MG.* Systematic review of guidelines on cardiovascular risk assessment: which recommendations should clinicians follow for a cardiovascular health check? *Arch Intern Med* 2010;170:27–40.
21. *Карлаш Ю.В.* Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В. Карлаш – К: НУХТ, 2013. – 143 с.
22. СІР-станція [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.milk-system.com/produksiia/cip-stantsiia>

23. *Калуняц К.А.* Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с.
24. Сода кустическая (натрий углекислый, карбонат натрия) гост 5100-85 [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.plasma.com.ua/chemistry/chemistry/sodium_carbonate.html
25. Кислотний засіб для СІР "Бланідас-АВ" (Blanidas-AB) [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://blanidas.com.ua/blanidas-ab -201/>
26. Хлор Ліквід [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://kronos-agro.com.ua/ru/Products_RU/RU
27. Катамін [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyushee-sredstvo -kiev>
28. Биомой средство для мытья и дезинфекции [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://profiplus.in.ua/p772014975-fermisept-sredstvo-dlya.html>
29. Бланідас АКТИВ [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://agronet.ua/obyavlenie/id25199-preparat-kormoviy-biokatalizatorniy>.
30. Забор – атмосферный воздух. Большая Энциклопедия Нефти и Газа. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ngpedia.ru/id20748p1.html>
31. *Блейхер И.Г.* Компрессорные станции: учеб./ *И.Г. Блейхер, В.П. Лусеев* – М.: Машгиз, 1959. – 323 с.

Схема з бази KEGG трансформація ростового субстрату

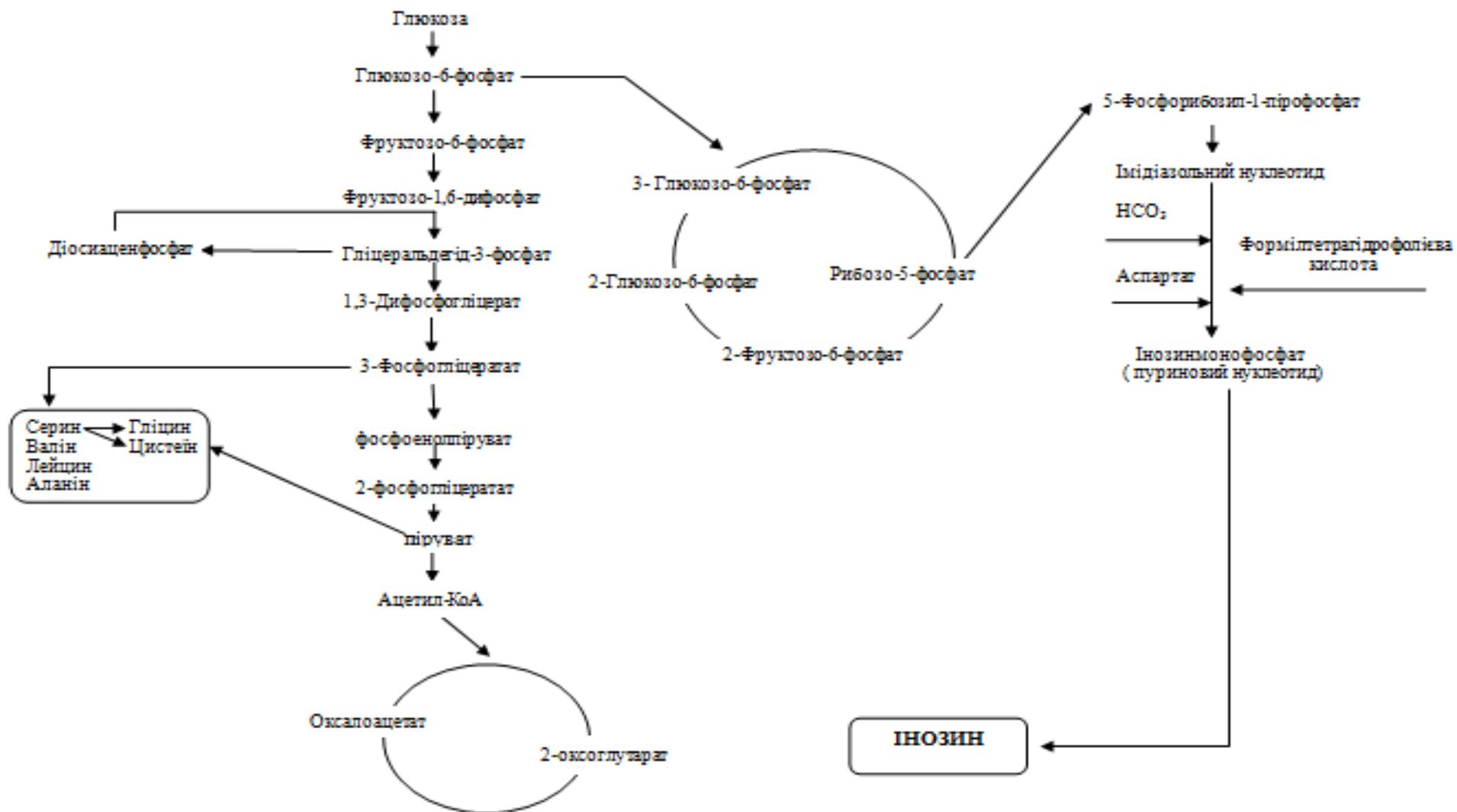
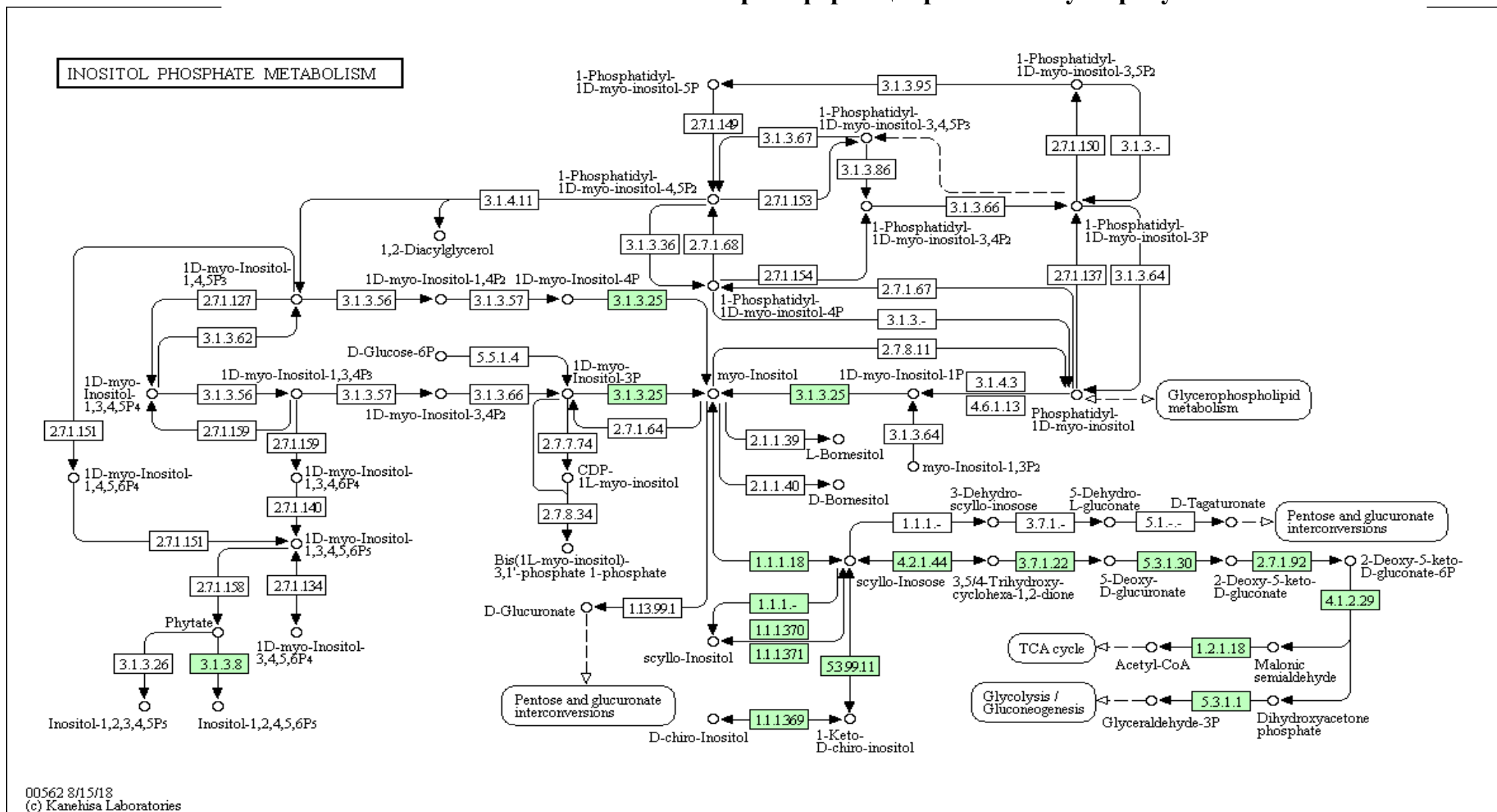


Схема біотрансформації ростового субстрату в інозин

Схема з бази KEGG трансформація ростового субстрату



Основні статті та першоджерела

Способ получения рибоксина

Авторы патента:

[Ерохина Л.И.](#)
[Казаринова Л.А.](#)
[Юдина Л.И.](#)
[Дебабов В.Г.](#)
[Полунин А.Н.](#)
[Кузнецова О.А.](#)
[Юдина Р.И.](#)
[Орехова В.М.](#)
[Кузменок В.А.](#)
[Чагин Б.А.](#)
[Савина Н.Н.](#)

(19)SU(11)790781(13)A1(51) МПК⁵ C12P19/32⁽¹²⁾ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к авторскому

свидетельству Статус: по данным на 17.12.2012 - прекратил действие Пошлина:

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РИБОКСИНА

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к способам для получения рибоксина (инозина), используемого в медицине при терапевтическом лечении ряда болезней сердца, печени и при нарушениях клеточного метаболизма, таких как лейкопении и др. Он может быть использован в качестве сырья для получения антиметаболитов - противоопухолевых препаратов. Кроме того, рибоксин является исходным соединением при химическом и микробиологическом получении инозиновой кислоты. Известен способ получения рибоксина микробиологическим синтезом, согласно которому в качестве продуцента используют штамм *Bacillus subtilis* Ген = 265, не продуцирующий аденин, тирозин, гистидин. Максимальный выход инозина по этому способу составляет 7-10 г/л. Известен также способ получения инозина путем культивирования продуцирующих его микроорганизмов вида *Bacillus subtilis* на питательной среде, содержащей чистые аминокислоты (метионин, лизин, глутаминовая кислота), витамины (В₁, В₂, В₁₂), рибонуклеиновые кислоты, гидролизат соевого белка. Выход инозина в оптимальных условиях ферментации составляет в данном случае 17,2 г/л. Наиболее близким техническим решением к заявленному по достигаемому эффекту является способ получения рибоксина, предусматривающий приготовление посевного материала - продуцента *Bacillus subtilis* на агаризованной среде, культивирование его на питательной среде, содержащей источники углерода, азота, ростовые факторы и минеральные соли, в условиях азрации среды с последующим отделением полученной биомассы и выделением целевого продукта. В качестве продуцента используют штамм *Bacillus subtilis* ЦМПМ-1321. Ферментацию ведут на средах, содержащих недефицитное сырье, а именно: техническую глюкозу, сахар, гидрол, БВК, кукурузный экстракт соли аммония, магния и кальция. Получают в культуральной жидкости 10-12 г/л инозина за 65-120 ч ферментации. Целью изобретения является разработка нового более эффективного способа получения рибоксина (инозина), обеспечивающего более высокий выход продукта на стадии ферментации в полупромышленных и промышленных условиях. Поставленная цель достигается тем, что в качестве продуцента используют штамм *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-48. Для повышения выхода рибоксина целесообразно использовать агаризованные среды, содержащие кукурузный экстракт и гидролизат БВК, культивирование продуцента вести на среде, содержащей, % : техническая глюкоза 12-15; азотнокислый аммоний 1-3; БВК 2,5-3,0; кукурузный экстракт 0,5; мел 2,0; хлористый или сернокислый магний 0,3-0,5 и вода. При этом в процессе культивирования азрацию ведут так, что скорость растворения кислорода составляет 2,4-3,8 г О₂/л ч, содержание аммонийного азота поддерживают в среде в пределах 0,1-0,2%, а культивирование продуцента осуществляют при рН, равном 6,4-6,6. Содержание углекислого газа в процессе культивирования в пределах 0,7-0,9% регулируют путем подачи воздуха в количестве 0,7-2,5 об/об мин. Высокопродуктивный мутантный штамм *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-48 получен из штамма *Bacillus subtilis* ЦМПМ В-1321 в результате применения генетико-селекционных методов работы, в частности приобретения резистентности к 6-тиогуанину. Штамм ВНИИгенетика-48 обладает более высоким уровнем накопления инозина. Выращивание севного материала на штамме ВНИИгенетика-48 осуществляют как на агаризованной среде Хоттингера, так и на

Купите мужское термобелье ▾

allmulticam.ru

Выбираешь масло? Попробуй ZIC! ▾

zicoil.ru

Подключение...

решающей ролью штамма. Штамм ВНИИгенетика-48 обладает самым высоким уровнем накопления продукта. Выращивание посевного материала на штамме ВНИИгенетика-48 осуществляют как на агаризованной среде Хоттингера, так и на агаризованных средах, содержащих дешевое, легкодоступное сырье - кукурузный экстракт и гидролизат БВК. Штамм ВНИИгенетика-48 хранится в музее культур промышленных микроорганизмов института ВНИИгенетика, имеет регистрационный номер ЦМПМ В-1796. Способ осуществляют следующим образом. В качестве продуцента используют мутантный штамм *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-48. Культуру штамма, выращенную на агаризованной среде Хоттингера или на дешевых агаризованных средах, содержащих кукурузный экстракт и БВК, в течение 20-24 ч при 37⁰С, переносят в колбы с посевной средой и выращивают при постоянном перемешивании и аэрации в течении 20-24 ч при температуре 28⁰С. Затем посевной материал, выращенный описанным способом, или суспензию клеток, смытых физраствором с поверхности агаризованной среды, переносят в ферментационную среду в количестве 0,05-2 об. %. Процесс биосинтеза осуществляют в колбах на качалке (240-270 об/мин) и в ферментерах (объем 1 м³) при аэрации и перемешивании, соответствующих скорости растворения кислорода 2,4-3,8 г О₂/л ч.

Оптимальная температура процесса ферментации 30-34⁰С. Посевные и ферментационные среды содержат в качестве источника углерода техническую глюкозу, источника азота - азотнокислый аммоний, источника ростовых факторов - БВК, кукурузный экстракт, пептон, минеральные соли (MgCl₂ или MgSO₄, NaCl), мел. Все компоненты питательных сред смешивают и стерилизуют. В полупроизводственных и производственных условиях регуляцию процесса биосинтеза осуществляют путем стабилизации рН на уровне 6,4-6,6 с помощью 25% -ного раствора аммиака, поддержания уровня аммонийного азота в пределах 0,1-0,2% периодическим добавлением 20% -ного водного раствора азотнокислотного аммония и регулирования содержания СО₂ на выходе в пределах 0,7-0,9% изменением скорости подачи воздуха в аппарат в пределах 0,7-0,9% изменением скорости подачи воздуха в аппарат в пределах 0,7-2,5 об/об мин для обеспечения достаточной вентиляции с целью снятия ингибирующего действия СО₂. Способ обеспечивает выход рибоксина (инозина) до 30-40 г/л за 85-120 ч ферментации.

Пример 1. Культуру штамма *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-48, выращенную в течение 24 ч при 37⁰С на агаризованной среде Хоттингера, переносят на жидкую посевную среду следующего состава, % : Глюкоза техническая 2,0 Пептон 1,0 БВК 1,0 NaCl 0,25

Посевной материал выращивают в колбах емкостью 750 мл, содержащих 100 мл, среды на качалке, делающей 220-250 об/мин в течение 20-24 ч при 28⁰С. Инокулят передают в ферментационную среду в количестве 2 об. %. Состав ферментационной среды, % : Глюкоза техническая 12,0 БВК 2,5 NH₄NO₃ 2,5 MgCl₂ 0,5 Мел 2,0 рН 7,0

Процесс ферментации проводят методом глубинного культивирования в колбах Эрленмейера емкостью 750 мл, содержащих 20 мл среды, скорости растворения кислорода 3,6 г О₂/л ч и температуре 30⁰С, на качалке, делающей 240-270 об/мин.

Выход рибоксина после 120 ч ферментации составляет 30 г/л. Выделение рибоксина осуществляют известными способами.

Пример 2. Культура и условия ферментации те же, что в примере 1. Отличие состоит в составе питательной агаризованной среды для поддержания культуры и в подготовке посевного материала. Культуру выращивают в течение 20-24 ч при 37⁰С на агаризованных питательных средах следующего состава, % : Глюкоза техническая 1,0 Гидролизат БВК 5,0 Пептон 1,0 NaCl 0,5 или глюкоза техни- ческая 2,0 пептон 1,0 кукурузный экстракт 2,5 NaCl 0,5

Выросшую культуру смывают с поверхности агаризованной средой физиологическим раствором и засевают ею ферментационную среду в объеме 1-2 об. %. Выход рибоксина после 140-160 ч ферментации составляет 30 г/л.

Пример 3. Культура и условия ферментации те же, что в примере 1. Отличие состоит в составе ферментационной среды и температурном режиме. Ферментацию осуществляют при температуре 34⁰С на ферментационной среде следующего состава, % : Глюкоза техническая 14,0 БВК 3,0 NH₄NO₃ 3,0 Мел 2,0 MgCl₂ 0,5 рН 7,0

Выход рибоксина после 120 ч ферментации составляет 40 г/л. Пример 4. Культуру выращивают на агаризованной среде как указано в примере 2, активируют на качалке при температуре 28-30⁰С в течение 2-3 ч и засевают ферментационную среду суспензией клеток в количестве 0,05 об. %. Состав ферментационной среды, % : Глюкоза техническая 14-15 БВК 2,5 Кукурузный

Выход рибоксина после 120 ч ферментации составляет 40 г/л. При этом культуру выращивают на агаризованной среде, как указано в примере 2, активируют на качалке при температуре 28-30°C в течение 2-3 ч и засевают ферментационную среду суспензией клеток в количестве 0,05 об. %. Состав ферментационной среды, % : Глюкоза техническая 14-15 БВК 2,5 Кукурузный экстракт 0,5 NH₄NO₃ 1-2 Мел 2,0 MgSO₄ 0,3 pH 6,8-7,0

Процесс ферментации проводят в аппарате емкостью 1 м³. Аппарат снабжен турбинной мешалкой, дающей 240 об/мин, барботером и системой автоматического пеногашения. В процессе ферментации контролируют потребление глюкозы, аммонийного азота, изменение pH, а также уровень CO₂. Для поддержания pH на уровне 6,4-6,6 периодически добавляют 25% -ный раствор аммиака; для поддержания концентрации аммонийного азота в среде в пределах 0,1-0,2% периодически добавляют 20% -ный водный раствор азотнокислого аммония; для поддержания содержания CO₂ на выхлопе в пределах 0,7-0,9% регулируют подачу воздуха в аппарат от 0,7 до 2,5 об/об мин. Выход рибоксина после 85 ч ферментации составляет 32 г/л. Выделение рибоксина осуществляют известными способами. Максимальный выход рибоксина (инозина) на штамме ВНИИгенетика-48 составляет 30-40 г/л за 85-120 ч ферментации на оптимизированных питательных средах, содержащих недефицитное сырье, при повышенной температуре и достаточной аэрации. Высокая эффективность предлагаемого способа на основе нового штамма в полупроизводственных и производственных условиях достигается регулированием процесса биосинтеза рибоксина путем поддержания pH на оптимальном уровне раствором аммиака, концентрации аммонийного азота в среде в определенных пределах и обеспечения достаточного перемешивания и аэрации с целью снятия ингибирующего действия CO₂. (56) Авторское свидетельство СССР N 382676, кл. С 12 D 13/06, 1971. Патент США N 3960661, кл. 195-28, 1976. Авторское свидетельство СССР N 594769, кл. С 12 D 13/06, 1976.

Формула изобретения

1. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РИБОКСИНА, предусматривающий приготовление посевного материала - продуцента *Bacillus subtilis* на агаризованной среде, культивирование продуцента в условиях аэрации на питательной среде, содержащей источники углерода, азота, ростовые факторы и минеральные соли, с последующим отделением полученной биомассы и выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью увеличения выхода рибоксина, в качестве продуцента используют штамм *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-48. 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что при приготовлении посевного материала-продуцента используют агаризованную среду, содержащую кукурузный экстракт и гидролизат БВК. 3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивирование продуцента ведут на среде следующего состава, % : техническая глюкоза 12 - 15; азотнокислый аммоний 1 - 3; БВК 2,5 - 3,0; кукурузный экстракт 0,5; мел 2,0; хлористый или сернокислый магний 0,3 - 0,5; вода - остальное. 4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в процессе культивирования аэрацию среды ведут так, что скорость растворения кислорода составляет 2,4 - 3,8 г O₂/л ч. 5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что при культивировании содержание аммонийного азота в среде составляет 0,1 - 0,2% . 6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивирование продуцента ведут при pH, равном 6,4 - 6,6. 7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в процессе культивирования содержание углекислого газа в пределах 0,7 - 0,9% регулируют путем подачи воздуха в количестве 0,5 - 2,5 об/об мин.

ММ4А Досрочное прекращение действия патента Российской Федерации на изобретение из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Номер и год публикации бюллетеня: **29-2002**

Извещение опубликовано: **20.10.2002**



Основні статті та першоджерела

Способ получения инозина

[Формула](#) | [Описание](#) | [Похожие патенты](#) | [МПК / Метки](#) | [Текст](#) | [Заявка](#) | [Код ссылки](#)

Номер патента: 1755583

Авторы: Гуляева, Соколов, Марков, Кузьменок, Преображенская, Юдина, Шолин, Гулько, Шакулов, Полунина, Позднякова, Казаринова, Савина, Шипанов

Индекс Директ

Отопление для помещений, выше 4 м.!

Готовый бизнес по франшизе под ключ

Выбираешь масло? Попробуй ZIC!

Купить Аппарат для Дистилляции

Формула

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИНОЗИНА, предусматривающий культивирование продуцирующего микроорганизма *Bacillus subtilis* в регулируемых условиях аэрации и поддержания pH среды подачей источника азота на питательной среде в присутствии глюкозы и БВКс последующим отделением полученной биомассы, выделением и очисткой целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода, удешевления процесса за счет снижения расхода глюкозы и упрощения выделения и очистки, культивирование ведут на питательной среде, дополнительно содержащей азотнокислый аммоний и сернокислый магний, в качестве источника азота используют аммиачную воду, а глюкозу подают в процессе культивирования дробно в виде 50%-ного раствора из расчета достижения концентрации ее в среде 0,05 - 0,9%.

Описание

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается способа получения инозина (рибоксина) методом микробиологического синтеза. С целью повышения выхода инозина, удешевления процесса за счет снижения расхода глюкозы и упрощения выделения и очистки, культивирование ведут на питательной среде, содержащей белково-витаминный концентрат (БВК), азотнокислый аммоний и сернокислый магний, в качестве источника азота используют аммиачную воду, а глюкозу в процессе культивирования дробно из расчета достижения концентрации ее в среде 0,05-0,9%. Использование такого способа позволяет увеличить сьем инозина с аппарата, снизить расход глюкозы на единицу продукции, упростить процесс выделения и очистки и повысить производительность процесса биосинтеза.

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к способу получения инозина (рибоксина) методом микробиологического синтеза.

Целью изобретения является увеличение выхода инозина, удешевление процесса за счет снижения расхода глюкозы и упрощения выделения и очистки.

Способ получения инозина осуществляют путем культивирования *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика 72 в регулируемых условиях аэрации на среде, содержащей БВК, соли аммония и магния. В качестве источника азота используют аммиачную воду, которую подают автоматически в соответствии с заданным уровнем pH (6,5-6,7). Глюкозу добавляют в процессе культивирования дробно из расчета достижения ее концентрации в среде 0,05-0,9%.

Пример 1. Односуточную культуру штамма *B. subtilis* ВНИИгенетика 72 переносят в колбы, содержащие посевную среду следующего состава, (мас.%) : глюкоза - 2,0, БВК - 2,0, NaCl - 0,25. Посевной материал выращивают на качалке, делающей 220-240 об/мин при температуре 34°C в течение 18 ч. Затем посевной материал в количестве 2 об.% переносят в ферментер емкостью 1,2 л содержащий 700 л ферментационной среды следующего состава (мас.%) : БВК 2,0; NH_4NO_3 - 0,5; MgSO_4 - 0,5. Культивирование осуществляют в аппаратах емкостью 1,2 л в течение 86 ч при 34°C, скорости перемешивания 750 об/мин, скорости подачи воздуха 0,7 л/мин. В процессе культивирования раствор глюкозы (50%-ный) добавляют в среду с постоянной скоростью 1,3 г/л, что обеспечивает содержание глюкозы в культуральной жидкости на уровне 0,15%, а источник азота - аммиачную воду (25%) подают в среду автоматически в соответствии с заданным уровнем pH 6,0. При этом накопление инозина составляет 18,4 г/л, а сьем с аппарата 13,7 г, расход глюкозы 6,1 г/г.

1 л культуральной жидкости с концентрацией инозина 28 г/л прогревают 10 мин при 90°C, вносят 3 г перлита при перемешивании и затем ведут фильтрацию при 60-70°C через бумажный фильтр на воронке Бюхнера.

Полученный раствор вторично фильтруют на той же воронке, но через угольную "подушку" (масса угля 9 г). После отделения биомассы и осветления на угле объем нативного раствора составляет 940 мл имеет следующие характеристики: СВ 6%, pH 5,9 сумма неорганических катионов 135 мг-экв/л, цветность 0,212 ($\lambda = 530$ нм), содержание гипоксантина 0,05 г/л, гуанозина 0,5 г/л, гуанина 0,08 г/л. Нативный раствор

упаривают на ротормном испарителе до объема 400 мл и ведут кристаллизацию при 6-8°C в течение 5 ч, затем кристаллы отделяют на фильтре. Объем маточного раствора 350 мл концентрация инозина 8 г/л.

Полученные кристаллы растворяют в воде при 65-70°C и фильтруют через угольную "подушку" на воронке Бюхнера и затем сушат в сушильном шкафу при 60-70°C. Получено 20 г инозина, общий выход составляет 71,5% без утилизации маточных растворов. После утилизации маточных растворов выход готового продукта повышается на 90% по отношению к исходной концентрации инозина в культуральной жидкости.

Полученный препарат соответствует требованиям, предъявляемым к медицинскому препарату.

Примеры 2-5. Процесс осуществляется также, как описано в примере 1, но ведут при pH 6,5, 6,7, 7,2 и 7,5 соответственно.

Результаты примеров с 1 по 5 приведены в табл. 1.

Наилучшие результаты, как видно из табл. 1, достигнуты при поддержании pH на протяжении всей ферментации на уровне 6,5-6,7.

Примеры 6-12. Процесс осуществляют, как в примере 1, но ведут при pH 6,7 и с разной скоростью подачи глюкозы, обеспечивающей содержание глюкозы в культуральной жидкости от 0,03% в примере 6 до 1,2% в примере 12. Результаты этих примеров в сравнении с известным способом без пробной подачи глюкозы (прототип) приведены в таблице 2.

Как видно из табл. 2, при ведении процесса с подпиткой сьем инозина с аппарата выше, а расход глюкозы на единицу продукта ниже, чем при ведении процесса по известному способу, без дробной подачи глюкозы. Наилучшие результаты по всем технологическим показателям (накопление инозина, сьем с аппарата, расход глюкозы) достигнуты при поддержании глюкозы в среде на уровне 0,05-0,9%.

Пример 13. Суспензию клеток штамма *B. subtilis* ВНИИгенетика 72, смытых физраствором с 2 матрасов Хоттингера после 24 ч выращивания при 34°C, используют для засева посевного аппарата объемом 2 м³, содержащего 600 л посевной среды следующего состава, мас.%) : глюкоза 2,0; БВК 2,0; NaCl 0,25.

Способ получения инозина осуществляют путем культивирования *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика 72 в регулируемых условиях аэрации на среде, содержащей ББК, соли аммония и магния. В качестве источника азота используют аммиачную воду, которую подают автоматически в соответствии с заданным уровнем pH (6,5-6,7). Глюкозу добавляют в процессе культивирования дробно из расчета достижения ее концентрации в среде 0,05-0,9%.

Пример 1. Односуточную культуру штамма *B. subtilis* ВНИИгенетика 72 переносят в колбы, содержащие посевную среду следующего состава, (мас.%) : глюкоза - 2,0, ББК - 2,0, NaCl - 0,25. Посевной материал выращивают на качалке, делающей 220-240 об/мин при температуре 34°C в течение 18 ч. Затем посевной материал в количестве 2 об.% переносят в ферментер емкостью 1,2 л содержащий 700 л ферментационной среды следующего состава (мас.%) : ББК 2,0; NH₄NO₃ - 0,5; MgSO₄ - 0,5. Культивирование осуществляют в аппаратах емкостью 1,2 л в течение 86 ч при 34°C, скорости перемешивания 750 об/мин, скорости подачи воздуха 0,7 л/мин. В процессе культивирования раствор глюкозы (50%-ный) добавляют в среду с постоянной скоростью 1,3 г/л, что обеспечивает содержание глюкозы в культуральной жидкости на уровне 0,15%, а источник азота - аммиачную воду (25%) подают в среду автоматически в соответствии с заданным уровнем pH 6,0. При этом накопление инозина составляет 18,4 г/л, а сьем с аппарата 13,7 г, расход глюкозы 6,1 г/г.

1 л культуральной жидкости с концентрацией инозина 28 г/л прогревают 10 мин при 90°C, вносят 3 г перлита при перемешивании и затем ведут фильтрацию при 60-70°C через бумажный фильтр на воронке Бюхнера.

Полученный раствор вторично фильтруют на той же воронке, но через угольную "подушку" (масса угля 9 г). После отделения биомассы и осветления на угле объем нативного раствора составляет 940 мл имеет следующие характеристики: СВ 6%, pH 5,9 сумма неорганических катионов 135 мг-экв/л, цветность 0,212 ($\lambda = 530$ нм), содержание гипоксантина 0,05 г/л, гуанозина 0,5 г/л, гуанина 0,08 г/л. Нативный раствор

упаривают на роторном испарителе до объема 400 мл и ведут кристаллизацию при 6-8°C в течение 5 ч, затем кристаллы отделяют на фильтре. Объем маточного раствора 350 мл концентрация инозина 8 г/л.

Полученные кристаллы растворяют в воде при 65-79°C и фильтруют через угольную "подушку" на воронке Бюхнера и затем сушат в сушильном шкафу при 60-70°C. Получено 20 г инозина, общий выход составляет 71,5% без утилизации маточных растворов. После утилизации маточных растворов выход готового продукта повышается на 90% по отношению к исходной концентрации инозина в культуральной жидкости.

Полученный препарат соответствует требованиям, предъявляемым к медицинскому препарату.

Примеры 2-5. Процесс осуществляется также, как описано в примере 1, но ведут при pH 6,5, 6,7, 7,2 и 7,5 соответственно.

Результаты примеров с 1 по 5 приведены в табл. 1.

Наилучшие результаты, как видно из табл. 1, достигнуты при поддержании pH на протяжении всей ферментации на уровне 6,5-6,7.

Примеры 6-12. Процесс осуществляют, как в примере 1, но ведут при pH 6,7 и с разной скоростью подачи глюкозы, обеспечивающей содержание глюкозы в культуральной жидкости от 0,03% в примере 6 до 1,2% в примере 12. Результаты этих примеров в сравнении с известным способом без пробной подачи глюкозы (прототип) приведены в таблице 2.

Как видно из табл. 2, при ведении процесса с подпиткой сьем инозина с аппарата выше, а расход глюкозы на единицу продукта ниже, чем при ведении процесса по известному способу, без дробной подачи глюкозы. Наилучшие результаты по всем технологическим показателям (накопление инозина, сьем с аппарата, расход глюкозы) достигнуты при поддержании глюкозы в среде на уровне 0,05-0,9%.

Пример 13. Суспензию клеток штамма *B. subtilis* ВНИИгенетика 72, смытых физраствором с 2 матрацев Хоттингера после 24 ч выращивания при 34°C, используют для засева посевного аппарата объемом 2 м³, содержащего 600 л посевной среды следующего состава, мас.%) : глюкоза 2,0; ББК 2,0; NaCl 0,25.

УДК 579.871.08

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ [²H]ИНОЗИНА ВЫСОКОГО УРОВНЯ ДЕЙТЕРИРОВАННОСТИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ХЕМОГЕТЕРОТРОФНОЙ БАКТЕРИЕЙ *Bacillus subtilis*

© 2013 г. О. В. Мосин*, В. И. Швец*, Д. А. Складнев**, И. Игнатов***

*Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, 117571
e-mail: mosin-oleg@yandex.ru**Государственный научно-исследовательский центр генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, 113545
e-mail: genetika@genetika.ru***Научно-исследовательский центр медицинской биофизики, София 1111
e-mail: mbioph@dir.bg

Поступила в редакцию 11.05.2012 г.

Осуществлен микробиологический синтез ²H-меченого пуринового рибонуклеозида инозина (выход 3.9 г/л культуральной жидкости, КЖ) с использованием адаптированного к дейтерию штамма грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* в тяжеловодородной среде высокого уровня дейтерированности (99.8 атом. % ²H) с 2%-ным гидролизатом дейтерированной биомассы факультативной метилотрофной бактерии *Brevibacterium methylicum* как источника ²H-меченых ростовых субстратов, полученной в минимальной среде M9 с 98%-ной ²H₂O и 2%-ным [²H]метанолом. Фракционирование инозина из КЖ штамма-производителя производили адсорбцией (десорбцией) на поверхности активированного угля, экстракцией 0.3 M NH₄-формиатным буфером (pH 8.9) с последующей перекристаллизацией в 80%-ном этаноле и колоночной ИОХ на катионообменнике AG 50WX 4, уравновешенном 0.3 M NH₄-формиатным буфером с 0.045 M NH₄Cl. Уровень дейтерированности инозина, исследованный методом масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА), составил 5 атомов дейтерия (62.5% ²H) с включением 3 атомов дейтерия в рибозный и 2 атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы.

DOI: 10.7868/S0555109913030136

Природные нуклеозиды, меченные дейтерием (²H), представляют значительный научно-практический интерес для прикладной биохимии и микробиологии, многочисленных биохимических и диагностических целей [1], структурно-функциональных исследований [2], а также для изучения клеточного метаболизма [3]. Тенденция к их предпочтительному использованию обусловлена отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле спектроскопией ¹НЯМР [4], ИК- и лазерной спектроскопией [5], а также масс-спектрометрией [6]. Развитие технической и компьютерной оснащённости современных аналитических методов за последние годы позволило существенно повысить эффективность проведения биологических исследований *de novo*, а также изучать структуру и функции нуклеозидов и их аналогов на молекулярном уровне [7]. В частности, дейтерированные рибонуклеозиды и их аналоги применяются в матричных синтезах молекул дейтерированных РНК для изучения их пространственной структуры и конформационных изменений [8].

Важным фактором в исследованиях с дейтерированными нуклеозидами и их аналогами является их доступность. ²H-меченые нуклеозиды могут быть синтезированы с использованием химических [9], ферментативных [10] и микробиологических методов [11]. Химические синтезы часто многостадийны, требуют больших расходов дорогостоящих реагентов и ²H-меченых субстратов и приводят к конечному продукту, представляющему собой рацемическую смесь D- и L-форм, для разделения которых требуются специальные методы [12]. Более тонкие химические технологии синтеза [²H]нуклеозидов связаны с комбинацией химических [13] и ферментативных [14] подходов.

Для многих научно-прикладных целей микробиология предлагает альтернативный микробиологический метод синтеза [²H]нуклеозидов, который характеризуется высокими выходами синтезируемых продуктов, эффективным включением дейтерия в молекулы и сохранению природной конфигурации синтезируемых соединений [15]. Традиционным подходом при этом является выращивание штаммов-производителей в средах с максимальными концентрациями ²H₂O и дейтериро-

важных субстратов [16]. Однако основным препятствием практической реализации этого метода является недостаток ^2H -меченых ростовых субстратов высокого уровня дейтерированности. Прежде всего это связано с ограниченной доступностью и дороговизной высокоочищенного дейтерия, выделяемого из природных источников. Природная распространенность дейтерия составляет 0.015 атом. %, однако несмотря на невысокое содержание дейтерия в пробах, разработанные в последние годы методы обогащения и очистки дейтерия позволяют получать ^2H -меченые субстраты высокого уровня изотопной чистоты [17].

Начиная с первых экспериментов по выращиванию природных объектов в тяжелой воде, в нашей стране разрабатываются подходы с использованием гидролизатов дейтерированной биомассы бактерий и микроводорослей как ростовых субстратов для биосинтеза штаммов-продуцентов [18]. Эксперименты обнаружили бактериостатический эффект $^2\text{H}_2\text{O}$, заключающийся в ингибировании жизненно-важных функций клетки, оказываемой 50%-ным $^2\text{H}_2\text{O}$ на растительные клетки [19] и 80–90%-ным $^2\text{H}_2\text{O}$ на клетки простейших и бактерий [20]. Попытки использовать для синтеза в $^2\text{H}_2\text{O}$ природных объектов различной таксономической принадлежности, включая бактерии, микроводоросли и дрожжи [21], не получили широкого распространения в биотехнологии из-за трудности биосинтеза, использования комплексных ростовых сред, сложности технологической схемы и т.п. Поэтому целый ряд практических вопросов биосинтеза природных дейтерированных соединений в $^2\text{H}_2\text{O}$ остается неизученным.

Более перспективны технологические схемы синтеза с использованием в качестве дейтерированных ростовых субстратов биомассы метилотрофных бактерий, ассимилирующих метанол по рибулозо-5-монофосфатному (РМФ) и сериновому пути фиксации углерода, интерес к которым возрастает благодаря интенсивному развитию технологии химического синтеза метанола [22, 23]. Усваиваемость метилотрофной биомассы клетками простейших организмов и эукариот составляет 85–98%, а их производительность, измеренная по уровню биоконверсии метанола в клеточные компоненты, достигает 50–60% [24]. Как было показано нами ранее, метилотрофные бактерии – неприхотливые объекты, растут на минимальных средах с 2–4% [^2H]метанола, в которых другие бактерии не размножаются, и достаточно легко адаптируются к максимальным концентрациям $^2\text{H}_2\text{O}$, что существенно для биосинтеза дейтерированных природных соединений [25, 26].

Большой научно-практический интерес к использованию дейтерированной биомассы мети-

лотрофных бактерий для биосинтеза рибонуклеотидов определил направление исследования.

Цель работы – изучение принципиальной возможности микробиологического синтеза [^2H]инозина штаммом грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* за счет использования в качестве источника дейтерированных субстратов 99.8%-ной $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2%-ного гидролизата дейтеро-биомассы факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylcum*, полученной со среды с максимальным содержанием дейтерия.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Объектом исследования являлся полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу (потребность 10 мг/л) штамм спорообразующих аэробных грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157 – продуцент инозина, полученный из коллекции культур ГОСНИИ Генетики и селекции промышленных штаммов микроорганизмов. Исходный штамм был предварительно адаптирован к дейтерию рассевом до отдельных колоний на 2%-ном агаре со ступенчато увеличивающимся градиентом концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ и последующей селекции по признаку устойчивости к $^2\text{H}_2\text{O}$.

Для приготовления ростовых сред использовали $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.8 атом. % ^2H), ^2HCl (95.5 атом. % ^2H) и [^2H]метанол (97.5 атом. % ^2H) (ЗАО “Изотоп”, Санкт-Петербург, Россия). Неорганические соли и D, L-глюкозу (“Reanal”, Венгрия) предварительно перекристаллизовывали в $^2\text{H}_2\text{O}$, $^2\text{H}_2\text{O}$ дистиллировали над KMnO_4 с последующим контролем изотопной чистоты ^1H ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 (“Bruker Daltonics”, ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт Me_4Si). Согласно данным ^1H ЯМР, уровень дейтерированности ростовой среды был ниже на 8–10 атом. % изотопной чистоты исходной $^2\text{H}_2\text{O}$.

Биосинтетический [^2H]инозин. [^2H]инозин получен с выходом 3.9 г/л на тяжеловодородной (ТВ) среде (89–90% атом. ^2H). В качестве источника ^2H -меченых ростовых субстратов использовали 2%-ный гидролизат дейтерированной биомассы метанолассимилирующего штамма факультативных грамотрицательных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylcum* ВКПМ В-5662, полученного селекцией в условиях многоступенчатой адаптации на твердой (2%-ный агар) минимальной среде М9 ((г/л): KH_2PO_4 – 3, Na_2HPO_4 – 6, NaCl – 0.5, NH_4Cl – 1) с 2%-ным [^2H]метанолом и ступенчато увеличивающимся

градиентом концентрации тяжелой воды (от 0, 24.5, 73.5 до 98% $^2\text{H}_2\text{O}$). Сырую метилотрофную биомассу (выход 200 г/л среды) суспендировали в 100 мл 0.5 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$), автоклавировали 30–40 мин при 0.8 атм. Полученную суспензию нейтрализовали 0.2 н. KOH (в $^2\text{H}_2\text{O}$), до pH 7.0, после чего использовали в качестве источника ростовых субстратов при выращивании штамма-продуцента инозина. Для этого посевной материал в количестве 5–6 мас. % переносили в ТВ-среду с $^2\text{H}_2\text{O}$ (мас. %): глюкоза – 12, гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* – 2, NH_4NO_3 – 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1, CaCO_3 – 2, аденин – 0.01, урацил – 0.01. В качестве контроля использовали протонированную среду с 2%-ным белково-витаминным концентратом (БВК) дрожжей. Выращивание бактерий проводили в колбах Эрленмейера на 500 мл со 100 мл среды в течение 3–4 сут при 32°C в условиях интенсивной аэрации на орбитальной качалке S-380 (“Biorad Labs”, Венгрия). Бактериальный рост контролировали по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных (2%-ный агар) сред, а также по величине ОП суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) при $\lambda = 540$ нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Уровень биоконверсии углеродного субстрата определяли, используя глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4).

Аналитическое определение инозина. Определение проводили в пробах КЖ, объемом 10 мкл на хроматографических пластинках (150 × 150 мм) с закрепленным слоем флуоресцирующего носителя Silufol UV-254 (“Kavalier”, Чехия) с использованием стандартного набора рибонуклеозидов фирмы “Beckman-Spinco” (США) в системе растворителей: н-бутанол–уксусная кислота–вода (2 : 1 : 1, об. %). Элюцию пятен проводили 0.1 н. HCl . УФ-поглощение элюатов определяли на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США), используя стандартную калибровочную кривую.

Выделение $[^2\text{H}]$ инозина. Пробы КЖ разделяли на центрифуге Т-26 (“Carl Zeiss”, ФРГ) при 2000 g, 10 мин, концентрировали при 10 мм рт. ст. в роторном испарителе РВО-6 (“Microtechna”, Венгрия) до объема, в два раза меньше исходного, добавляли ацетон при 0°C (3 × 5 мл). Смесь выдерживали ~10 ч при 4°C, осадок отделяли центрифугированием при 1200 g, 5 мин. К супернатанту добавляли 10 г активированного угля, выдерживали 24 ч при 4°C. Водную фракцию отделяли фильтрованием, к твердой фазе добавляли 20 мл 50%-ного этанола в 25%-ном аммиаке (1 : 1, об. %), нагревали при 60°C с обратным водяным холодильником. Через 2–3 ч смесь фильтровали и упарива-

ли при 10 мм рт. ст. Продукт экстрагировали 0.3 М NH_4 -формиатным буфером (pH 8.9), промывали ацетоном (2 × 10 мл), сушили над безводным CaCl_2 . Инозин перекристаллизовывали из 80%-ного этанола ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1.61^\circ$, выход 3.1 г/л, 80%). Конечная очистка инозина производилась методом ИОХ на откалиброванной колонке (150 × 10 мм) с катионообменной смолой AG50WX 4 (“Pharmacia”, США). Колонку уравнивали 0.3 М NH_4 -формиатным буфером (pH 8.9) с 0.045 М NH_4Cl и элюировали тем же буфером в условиях изократической элюции (хроматографическая чистота 92%). Элюат подвергали лиофильной сушке и хранили в запаянных ампулах при –4°C.

$[^2\text{H}]$ инозин. Выход 3.1 г/л (80%); $T_{\text{пл}} = 68\text{--}70^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1.61^\circ$ (этанол); $R_f = 0.5$; $pK_a = 1.2$ (фосфатный буфер, pH 6.87). УФ-спектр (0.1 н. HCl): $\lambda_{\text{макс}} = 249$ нм, $\epsilon_{249} = 7100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; масс-спектр БА (глицериновая матрица Cs^+ , ускоряющее напряжение 5 кВ, ионный ток 0.6–0.8 мА): $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ (I, %): 273, 20% (4 атом. ^2H); 274, 38% (5 атом. ^2H); 275, 28% (6 атом. ^2H); 276, 14% (7 атом. ^2H), $[\text{A} + \text{H}]^+ 136, 46\%$; $[\text{B} + \text{H}]^+ 138, 55\%$; $[\text{B} - \text{HCN}]^+ 111, 49\%$; $[\text{B} - \text{HCN}]^+ 84, 43\%$.

Гидролиз белков биомассы. К 10 мг сухой биомассы после обработки смесью хлороформ–метанол–ацетон (2 : 1 : 1, об. %) добавляли 5 мл 6 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$). Ампулы выдерживали при 110°C в течение ~24 ч. После этого реакцию массу суспендировали в горячей $^2\text{H}_2\text{O}$, фильтровали. Гидролизат упаривали при 10 мм рт. ст. Остатки ^2HCl удаляли путем выдерживания в эксикаторе над твердым NaOH .

Гидролиз внутриклеточных полисахаридов. 50 мг сухой биомассы помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл дист. H_2O и 1.6 мл 25%-ной H_2SO_4 (в $^2\text{H}_2\text{O}$) и кипятили с обратным водяным холодильником в течение ~90 мин. После охлаждения реакционную смесь суспендировали в одном объеме горячей дист. H_2O и нейтрализовали 2 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (в $^2\text{H}_2\text{O}$) до pH 7.0. Выпавший осадок BaSO_4 отделяли центрифугированием (1500 g, 5 мин), супернатант декантировали и упаривали при 10 мм рт. ст.

УФ-спектры. Регистрировали на программируемом спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) в диапазоне длин волн $\lambda = 220\text{--}280$ нм.

Аминокислотный анализ. Анализ гидролизатов биомассы проводили на катионообменной колонке Biotronic LC-5001 (“Eppendorf-Netheler-Hinz”, ФРГ) (230 × 3.2); неподвижная фаза – сульфированная стирольная (7.25% сшивки) смола UR-30 (“Beckman-Spinco”, США); диаметр гранул 25 мкм; элюент 0.2 н. Na -цитратный буфер

(рН 2.5); рабочее давление 50–60 атм; скорость подачи элюента 18.5 мл/ч; нингидрина 9.25 мл/ч; детекция при $\lambda = 570$ нм и $\lambda = 440$ нм (для пролина).

Анализ углеводов. Анализ осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer Smartline ("Knauer", ФРГ), снабженном насосом Gilson ("Gilson Inc.", ФРГ) и рефрактометром Waters K 401 ("Water Associates", ФРГ); неподвижная фаза: Ultrasorb CN; габаритные размеры колонки 250 × 10 мм; диаметр гранул 10 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил–вода (75 : 25, об. %); скорость подачи 0.6 мл/мин.

Масс-спектры ББА. Получены на импульсном масс-спектрометре VG-70 SEQ ("Fisons VG Analytical", США), снабженным цезиевым источником Cs^+ на глицириновой матрице с ускоряющим напряжением 5 кВ и ионным током 0.6–0.8 мА.

Масс-спектры электронного удара (ЭУ). Получены на приборе MB-80A ("Hitachi", Япония) с двойным фокусированием (энергия ионизирующих электронов 70 эВ, ускоряющее напряжение 8 кВ, температура катодного источника 180–200°C) после модификации аминокислот в метиловых эфиры N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот по разработанной ранее методике [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение 2H -меченой биомассы *B. methylicum*. В качестве продуцента инозина использовали мутантный полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу штамм грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157 (предварительно адаптированный к дейтерию селекцией до отдельных колоний), который из-за нарушения метаболических путей регуляции биосинтеза пуриновых рибонуклеозидов синтезирует в стандартных условиях выращивания (БВК-среда, поздний экспоненциальный рост, 32°C) 17–20 г инозина на 1 л КЖ [28]. Максимальный выход инозина достигался при использовании протонированной среды, содержащей в качестве источника углерода и энергии глюкозу (не менее 12 мас. %), а в качестве источника ростовых факторов и аминного азота – 2%-ный БВК дрожжей. При проведении биосинтеза требовалось заменить протонированные ростовые субстраты их дейтерированными аналогами, а также использовать 2H_2O высокого уровня изотопной чистоты. Для решения поставленной задачи использовали автолизированную биомассу адаптированного к дейтерию грамтрицательного штамма факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В-5662, ассимилирующего метанол по рибулозо-5-монофосфатному циклу фиксации углерода, который благодаря 50–60%-ному уровню биоконверсии метанола (при эффектив-

ности конверсии 15.5–17.3 г сух. биомассы на 1 г потребленного субстрата) и устойчивому росту в минимальной дейтерированной среде М9 с 2H_2O и $[^2H]$ метанолом оказался очень удобным источником для наработки дейтеро-биомассы, а затраты на биоконверсию определяются, в основном, стоимостью 2H_2O и $[^2H]$ метанола [29]. Проведение адаптации для *B. methylicum* определялось необходимостью улучшения ростовых характеристик штамма и достижения высокого выхода микробной биомассы в максимально дейтерированной среде М9. Для этого использовали ступенчато увеличивающийся градиент концентрации 2H_2O в ростовых средах М9 (от 24.5, 49.0, 73.5 до 98% $^2H_2O^1$) в присутствии 2%-ного метанола и его дейтерированного аналога, так как предполагалось, что постепенное привыкание клеток к 2H_2O будет оказывать благоприятный эффект на ростовые параметры штамма.

Для изучения влияния уровня дейтерированности источника углерода на ростовые параметры штамма в опытах (1, 3, 5, 7, 9) использовали протонированный метанол, а в опытах (2, 4, 6, 8, 10) $[^2H]$ метанол (табл. 1). Согласно полученным данным, замена протонированного метанола его дейтерированным аналогом в условиях одинаковой концентрации 2H_2O в среде приводила к небольшим уменьшениям ростовых характеристик штамма (табл. 1, опыты 2, 4, 6, 8, 10). Поэтому в дальнейших опытах использовали среды М9 с 2H_2O и $[^2H]$ метанолом. При росте исходного штамма *B. methylicum* в контрольной протонированной среде с водой и метанолом продолжительность лаг-периода и времени клеточной генерации составили 20 и 2.2 ч, а выход микробной биомассы 200 г на 1 л КЖ (табл. 1, опыт 1). В промежуточных опытах (2–10) биосинтетические параметры изменялись пропорционально концентрации 2H_2O (табл. 1). Выявленная закономерность заключалась в увеличении продолжительности лаг-периода и времени клеточной генерации при уменьшении выходов микробной биомассы с фиксированием самых низких значений этих параметров в опыте 10 с использованием максимально дейтерированной среды с 98%-ной 2H_2O и 2%-ным $[^2H]$ метанолом, где продолжительность лаг-периода и время генерации увеличивались в 3 и 2.2 раза по сравнению с контрольными условиями (табл. 1, опыт 1) на обычной воде и метаноле, а выход микробной биомассы уменьшался в 3.1 раза. Улучшить ростовые характеристики штамма *B. methylicum* в максимально дейтерированной среде М9 позволила адаптация к дейтерию, условия которой показаны в опыте 10' (табл. 1). За ходом адаптации наблюдали, сни-

¹ Здесь и далее использованы проценты по объему.