

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 06 ” листопада 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

РЯБУШЕНКО Ілони Юріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus subtilis* для одержання рибофлавіну

керівник роботи УДИМОВИЧ Віктор Миколайович, ст. викл.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023 року № 915-к

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus subtilis*, цільовий продукт: рибофлавін, об'єм ферментера 2,5 м³, коефіцієнт заповнення 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика рибофлавіну. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва рибофлавіну. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва рибофлавіну. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання виробництва рибофлавіну. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми виробництва рибофлавіну. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва рибофлавіну. РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва рибофлавіну – 1 аркуш формату А1 та 1 аркуш формату А2. Апаратурна схема виробництва рибофлавіну – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 06 листопада 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика рибофлавіну	01.11.2023 – 10.11.2023	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.11.2023 – 15.11.2023	
3	Техніко-економічне обґрунтування виробництва рибофлавіну	16.11.2023 – 27.11.2023	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва рибофлавіну	28.12.2023 – 02.01.2024	
5	Специфікація обладнання виробництва рибофлавіну	02.01.2024 – 09.01.2024	
6	Опис технологічної схеми виробництва рибофлавіну	10.01.2024 – 15.01.2024	
7	Контроль виробництва рибофлавіну	16.01.2024 – 20.01.2024	
8	Охорона довкілля	20.01.2024 – 22.01.2024	
9	Оформлення пояснювальної записки	22.01.2024 – 23.01.2024	
10	Виконання графічної частини кваліфікаційної роботи	23.01.2024 – 31.01.2024	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Ілона РЯБУШЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

Віктор УДИМОВИЧ _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу водорозчинного вітаміну рибофлавіну за використання мутованого бактеріального штаму *Bacillus subtilis* КССМ 10445, який синтезує на середовищі із глюкозою 26,8 г/л відповідного цільового продукту. Такий вітамін використовується в якості профілактики, а також лікуванні багатьох захворювань.

Обрахована потужність виробництва рибофлавіну складає 271,3 кг/рік. Технологічна схема виробництва рибофлавіну складається із допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація кислотного і лужного титрувальних агентів, приготування і стерилізація 40%-го підживлювального розчину глюкози, підготовка поживних середовищ) та власне технологічного процесу (підготовка культури, 3 стадії вирощування посівного матеріалу і виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2,5 м³ із коефіцієнтом заповнення 0,6).

Робота включає в себе вступ, п'ять розділів, графічну частину (технологічна схема формату А1 та А2, апаратурна схема формату А1) та список використаних джерел із 88 найменувань. Загальний об'єм пояснювальної записки – 103 сторінки, 7 рисунків, 16 таблиць, 5 додатків, 2 креслення формату А1 та 1 креслення формату А2.

Ключові слова: рибофлавін, вітаміни, *Bacillus subtilis*, підживлювальний розчин, біосинтез, технологічна схема, апаратурна схема.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОФЛАВІНУ	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента для біосинтезу рибофлавіну	15
2.2. Морфолого-культуральні ознаки <i>Bacillus subtilis</i> КССМ 10445	22
2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>Bacillus subtilis</i> КССМ 10445	23
2.4. Таксономічний статус <i>Bacillus subtilis</i> КССМ 10445	23
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ	25
3.1. Потреба у рибофлавіні.....	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва водорозчинного вітаміну.....	26
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для одержання річної потреби рибофлавіну та об'єму ферментера.....	28
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	29
3.5. Схема біотрансформації глюкози у рибофлавін	32
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ	36
4.1. Обґрунтування вибору способу культивування <i>Bacillus subtilis</i> КССМ 10445 та типу ферментера	36
4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	38
4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва рибофлавіну	40
4.4. Особливості підготовки та стерилізації середовища для виробництва рибофлавіну	44
4.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	45

4.4.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для отримання інокуляту у посівних апаратах об'ємом 30 і 250 л.....	46
4.4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2,5 м ³	46
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ	47
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ	51
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ	67
7.1. Мікробіологічний контроль	67
7.2. Визначення концентрації джерела амінного азоту та карбону	68
7.3. Визначення концентрації біомаси	70
7.4. Визначення концентрації рибофлавіну	70
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	78
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва рибофлавіну щодо можливих місць емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	78
8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	80
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	80
8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	83
8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	84
Список використаної літератури	87
ДОДАТКИ.....	98

ВСТУП

Вітаміни групи В — це група з восьми незамінних розчинних вітамінів, які працюють окремо та разом, з метою полегшення загального фізіологічного функціонування організму. Вітаміни групи В містяться в тваринних і молочних продуктах, таких як м'ясо, птиця, рибні яйця та молоко; однак їх також багато в рослинних дієтах у свіжих фруктах, овочах, горіхах, насінні, зернових, бобових, соєвих продуктах і збагачених злаках [1].

Вітаміни групи В є важливою групою вітамінів, що беруть участь у багатьох клітинних процесах, таких як виробництво енергії та утворення інших вітамінів. Одним із «ключових гравців» у цих процесах є вітамін В₂, або рибофлавін, і його похідні, флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД). Похідні ФМН і ФАД відіграють вирішальну роль як кофактори для реакцій, що каталізуються ферментами [2].

Дефіцит рибофлавіну є найпоширенішим дефіцитом вітаміну в країнах, що розвиваються, де в раціоні відсутні продукти, багаті рибофлавіном, такі як молоко та м'ясо. Клінічні симптоми дефіциту рибофлавіну з'являються лише через кілька місяців недостатнього споживання рибофлавіну та варіюються від більш легких симптомів, таких як біль у горлі, втрата волосся та запалення шкіри, до серйозних симптомів, таких як набряк язика, анемія та порушення нервових функцій [3].

Задля нормального функціонування будь-якого людського організму за умови нестачі рибофлавіну у ньому, необхідним є прийом лікарських препаратів або дієтичних добавок із достатнім вмістом даного вітаміну. Рибофлавін вводять як пероральним, так і парентеральним шляхом у вигляді моновітаміну або полівітамінного препарату вітамінів групи В [4].

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ВСТУП</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Рядишенка І. Ю.</i>						<i>7</i>	<i>103</i>
<i>Керівник</i>	<i>Удимович Ю. М.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		

Новизною даної кваліфікаційної роботи є використання бактеріального мутованого штаму *Bacillus subtilis* КССМ 10445 для виробничого біосинтезу рибофлавіну. Даний продуцент здатен синтезувати до 26,8 г/л готового цільового продукту за умов росту на глюкозі.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РИБОФЛАВІНУ

Рибофлавін (також відомий як вітамін В₂) – водорозчинна сполука, яка може синтезуватися як рослинами, так і мікроорганізмами. Даний вітамін є необхідним для тварин, оскільки відіграє важливу роль у багатьох метаболічних процесах та не має здатності до синтезу у таких організмах [5].

Рибофлавін вперше було описано у 1879 році науковцем Блітто як жовтий пігмент, попередньо знайдений у молоці [6]. Вперше Д'єрдом, Куном і Вагнер-Юреггом цей вітамін був виділений із яєчного білка (овофлавін), із сечі (урофлавін), із печінки (гепатофлавін), а дещо пізніше у великих кількостях із сироватки (лактофлавін). Було виявлено, що чисті кристалічні сполуки флавіну містять рибозу та є ідентичними, тому назва рибофлавін стала стандартною для даних сполук [7].

Зазвичай, промислове виробництво рибофлавіну здійснюється шляхом хімічного, напівхімічного або мікробного синтезу. У наш час виробництво даного вітаміну шляхом мікробної ферментації повністю замінило хімічний синтез (6-8 стадій, починаючи від глюкози) [7]. Достатньо чисельними є мікроорганізми, що здатні до синтезу рибофлавіну, тоді як *Candida famata*, *Ashbya gossypii*, *Lactobacillus fermentum* і *Clostridium acetobutylicum* можуть накопичувати надлишок рибофлавіну. Типовими бактеріальними і дріжджовими видами, які використовуються для промислового виробництва рибофлавіну, є штами *Bacillus subtilis*, *Candida famata* та *Ashbya gossypii* [8].

Вітамін В₂ присутній у таких харчових продуктах, як м'ясо, молоко, жирна риба, горіхи, яйця та овочі, такі як шпинат і квасоля, а також деякі фрукти [2]. Крім того, рибофлавін часто додають до продуктів, збагачених вітамінами, таких як дитяче харчування та каші, і було припущено, що деякі бактерії у мікробіомі людини здатні синтезувати рибофлавін [9].

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>	<i>Рядишенко І. Ю.</i>				<i>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Удимович Ю. М.</i>						9	103
<i>Н. контр</i>					<i>РИБОФЛАВІНУ</i>	<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Після надходження в організм вітамін В₂ фосфорилується у флавінмононуклеотид (ФМН), який, у свою чергу, метаболізується у флавінаденіндинуклеотид (ФАД) [6]. Дані коферменти відіграють центральну роль у метаболізмі, виконуючи роль переносників водню у біологічних окисно-відновних реакціях [10].

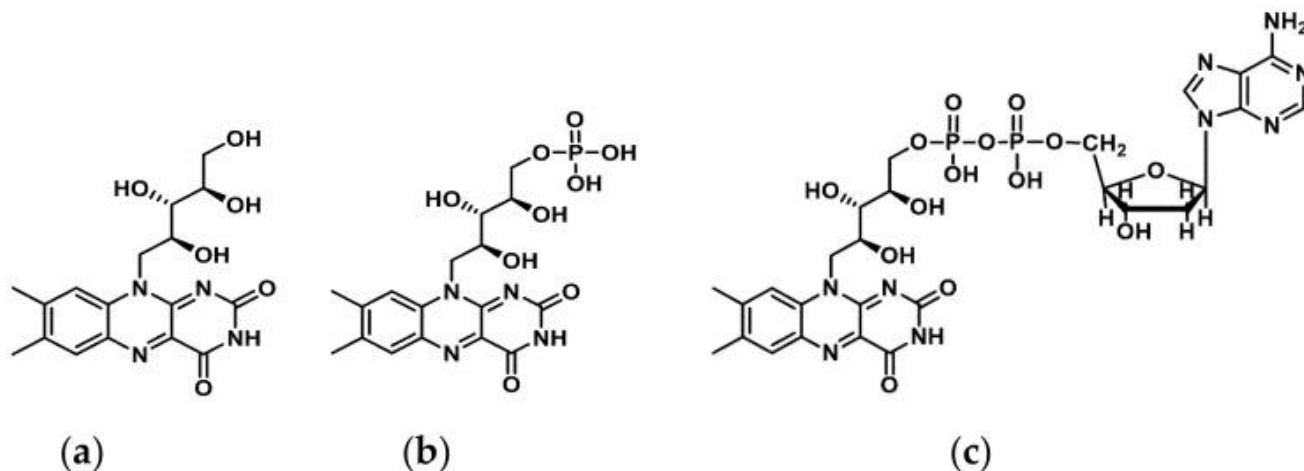


Рис. 1.1. Хімічна структура рибофлавіну (а), ФМН (b) і ФАД (c) [6]

За органолептичними показниками рибофлавін – кристалічний порошок від жовтого до оранжево-жовтого кольору зі слабким запахом та гірким смаком. Брутто-формула даного вітаміну – C₁₇H₂₀N₄O₆, а молярна маса складає 376,4 г/моль. Відомо, що рибофлавін за концентрації 10 – 13 мг/100 мл добре розчиняється у воді при 25 °С, слабо розчинний у бензиловому та етиловому спиртах, фенолі, амілацетаті і циклогексанолі, не розчинний а ацетоні, хлороформі, етиловому ефірі. Температура плавлення вітаміну складає 280 °С. Розчини рибофлавіну здатні розкладатися під дією видимого та ультрафіолетового світла, чутливі до лугів, але є стабільними у присутності кислот та окисників [11].

Вітамін В₂ бере активну участь у циклі Кребса та синтезі метіоніну. Крім того, рибофлавін і його метаболіти володіють антиоксидантними властивостями і беруть участь в окисно-відновному циклі глутатіону [12]. Рибофлавін добре всмоктується в шлунково-кишковому тракті та зв'язується з білками плазми. Вітамін виводиться з сечею у вигляді метаболітів, а при надмірному застосуванні також в незмінній формі. Період напіввиведення

вітаміну В₂ становить 1,1 — 1,4 год. Рибофлавін накопичується в невеликих кількостях в печінці та нирках. Має також здатність до виведення з крові під час гемодіалізу. Адсорбція рибофлавіну у шлунково-кишковому тракті може бути порушена при синдромі недостатнього всмоктування [13].

Добова потреба у рибофлавіні коливається від 1,0 до 1,3 мг/добу для дорослих, вживання ще більших кількостей рекомендовано молодим людям, вагітним і годуючим жінкам, спортсменам, а також літнім людям. Надлишок рибофлавіну виводиться із сечею у вигляді рибофлавіну або його метаболітів, 7-гідроксиметилрибофлавіну та люміфлавіну. На сьогоднішній день немає широкодоступних даних про ускладнення, пов'язані із добавками рибофлавіну, навіть у випадку передозування [3].

Таблиця 1.1

Рекомендовані дози щодо споживання рибофлавіну залежно від віку та статі [14]

Вік	Чоловіки	Жінки	Вагітність	Годування груддю
Від народження до 6 місяців	0,3 мг	0,3 мг	—	—
7 – 12 місяців	0,4 мг	0,4 мг		
1 – 3 роки	0,5 мг	0,5 мг		
4 – 8 роки	0,6 мг	0,6 мг		
9 – 13 років	0,9 мг	0,9 мг		
14 – 18 років	1,3 мг	1,0 мг	1,4 мг	1,6 мг
19 – 50 років	1,3 мг	1,1 мг	1,4 мг	1,6 мг
51 рік і більше	1,3 мг	1,1 мг	—	—

Достатньо широко поширеним є дефіцит рибофлавіну у багатьох частинах світу, особливо у слаборозвинених країнах. Тривалий дефіцит вітаміну В₂ може спричинити різноманітні клінічні відхилення, а саме ураження шкіри, погіршення зорової функції, анемію, пошкодження нирок та печінки, ризику хвороб серцево-судинної системи, тривалу затримку росту та дегенеративні зміни у нервовій системі [10, 15].

Дефіцит рибофлавіну може також викликати неврологічні порушення, пов'язані із периферичною нейропатією (дем'єлінізуюча нейропатія), та підвищувати ризик виявлення раку [8, 16]. Дефіцит даного вітаміну

найчастіше виникає при дефіциті інших поживних речовин, наприклад, у тих, хто погано харчується. Симптоми можуть включати:

- потріскані губи;
- біль у горлі;
- набряк ротової порожнини та горла;
- набряклість язика (глосит);
- втрата волосся;
- висип на шкірі;
- анемія;
- сверблячі червоні очі;
- катаракта у важких випадках.

Допустимий верхній рівень споживання рибофлавіну досі не встановлено, оскільки токсичний рівень не спостерігався із продуктів харчування або від тривалого прийому високих доз добавок [17]. Щодо взаємодії з іншими речовинами, то трициклічні антидепресанти та похідні фенотіазину підвищують потребу організму у Вітаміні В₂. Пробенецид та алкоголь мають здатність зменшувати всмоктування рибофлавіну у шлунково-кишковому тракті [13].

Рибофлавін – легкозасвоюваний водорозчинний мікроелемент, який відіграє ключову роль у підтримці здоров'я людини. Як і інші вітаміни групи В, він підтримує виробництво енергії, допомагаючи метаболізму жирів, вуглеводів і білків. Вітамін В₂ доволі необхідний для утворення еритроцитів і дихання, виробництва антитіл, а також для регуляції росту і репродукції людини. Даний вітамін потрібен в організмі людини для покращення здоров'я шкіри, нігтів, росту волосся та загального здоров'я, включаючи регуляцію діяльності щитовидної залози. Рибофлавін також відіграє важливу роль у профілактиці та/або лікуванні багатьох типів захворювань очей, включаючи деякі випадки катаракти [11].

Для рибофлавіну характерним є висока антимікробна дія. Декілька досліджень показали, що вітамін В₂ проявляє антимікробні властивості проти

патогенних мікроорганізмів, включаючи *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* і *Plasmodium falciparum*. Крім того, рибофлавін та флавіни (будівельні блоки або продукти розпаду рибофлавіну) є натуральними та ефективними джерелами фотосенсибілізаторів (ФС), які здатні до продукції активних форм кисню (АФК) під впливом світла, тим самим викликаючи окисне пошкодження у тканинах, що призводить до руйнування клітин. Тому дану фотосенсибілізуючу властивість рибофлавіну використовують у фотодинамічній терапії, яка вважається неінвазивним і безпечним методом лікування різних бактеріальних інфекцій [18].

Рибофлавін використовується в дієтичних добавках і при лікуванні запальних захворювань, таких як глосит, хейліт, сепсис, катаракта та мігрень. Крім того, у деяких дослідженнях показано, що вітамін В₂ може підвищувати фагоцитарну активність нейтрофілів і макрофагів, а отже, стимулювати розмноження нейтрофілів і моноцитів [6]. У комплексі із ультрафіолетовим випромінюванням рибофлавін можна використовувати у терапевтичних підходах щодо покращення біомеханічних та біохімічних властивостей рогівки [19].

Введення або чистого рибофлавіну, або бактерій, що продукують рибофлавін, полегшує хімічно індукований коліт у мишей. Аналогічно, інші експериментальні дослідження на тваринах продемонстрували протизапальну дію рибофлавіну, таку як зниження вироблення прозапальних цитокінів, фактора некрозу пухлини - α [TNF- α] та інтерлейкін-6 [IL-6], а також потенційний вплив на протизапальну дію дексаметазону [20].

Рибофлавін є безпечною харчовою добавкою, яка була схвалена Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів (FDA). Потенційним є використання такого вітаміну в якості безпечного ад'юванту вакцини проти грипу [21]. Вітамін В₂ можна використовувати для фарбування харчових продуктів, безалкогольних напоїв, сирів і сирних продуктів, молочних продуктів, хлібобулочних виробів, рибних продуктів,

кондитерських виробів, десертної пудри, шербетів, джемів і желе, майонезів і заправок для салатів, жирів і масла, гірчиці, а також в якості ароматизаторів [22].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента для біосинтезу рибофлавіну

Використання загальновідомих хімічних методів синтезу вітамінів, як правило, є дорогим, достатньо шкідливим для навколишнього середовища, схильним до утворення відходів і дорогої їх утилізації. На сьогодні метод мікробної ферментації привертає велику увагу через низьку вартість, низьке споживання енергії та легку переробку відходів. В даний час біотехнологічний метод виробництва визнаний дослідниками, і він є більш екологічним і безпечним, ніж хімічні методи. Оскільки такий метод поступово розвивається, то поступово стає можливою його масштабування у промислових умовах [23].

Протягом останніх десятиліть кілька груп дослідників повідомили про успішні досягнення у створенні генетично модифікованих штамів видів, таких як *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes* і *Candida spp.*, шляхом застосування стратегій метаболічної інженерії. Частіше такі стратегії призводять до покращення продуктивності штаму та виходу промислового продукту біосинтезу [24, 25].

Під час аналізу літературних даних було знайдено найбільш продуктивні прокаріотичні та еукаріотичні штами (див. табл. 2.1). Отже, найвищу синтезувальну здатність рибофлавіну проявляє бактеріальний штам *B. subtilis* КССМ 10445 (26,8 г/л), споріднений штам *B. subtilis* RH44 продукує меншу кількість вітаміну (16,36 г/л) [26, 27]. Еукаріотичні мікроорганізми *Ashbya gossypii* W122032 і *Candida famata* AF-4 синтезують 13,7 і 16,4 г/л рибофлавіну [28, 29].

					НУХТ БТЕК 05.01.13 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літера	Аркш	Аркшів
Розробник	Рядишенка І. Ю.						15	13
Керівник	Удимавич Ю. М.							
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консильт								
Зав. каф.	Стадніков В.П.							

Склад поживних середовищ для культивування вище зазначених мікроорганізмів та тривалість їх культивування суттєво різняться, тому слід розрахувати оптимальну вартість виробництва вітаміну В₂ (*табл. 2.2*).

Таблиця 2.1

Особливості синтезу рибофлавіну різними продуцентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація рибофлавіну, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus subtilis</i> КССМ 10445 мутований	Глюкоза сухі дріжджі кукурудзяний екстракт MgSO ₄ · 7H ₂ O KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ сечовина еритроміцин хлорамфенікол	100 20 5 0,5 1,5 3,5 6 0,01 0,01	90	26,8	Культивування у колбах на качалці (n = 200 об/хв, t° = 37 °C, pH = 7,2 – 7,4)	Lee K. H., Park Y. H., Han J. K., Park J. H., Lee K. H., Choi H. (2007). <i>U.S. Patent No. 7,166,456</i> . Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
<i>Bacillus subtilis</i> RH44 генно-інженерний	Глюкоза дріжджовий екстракт K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O	80 5 1 1 0,1	48	16,36	Культивування у ферментері об'ємом 5 л (n = 850 об/хв, t° = 41 °C, pH = 7,2)	Wu Q.-L., Chen T., Gan Y., Chen X., Zhao X.-M. Optimization of riboflavin production by recombinant <i>Bacillus subtilis</i> RH44 using statistical designs. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> . 2007, 76 (4): 783 – 794. doi: 10.1007/s00253-007-1049-y.

Продовження табл. 2.1

<p><i>Ashbya gossypii</i> W122032 генно-інженерний</p>	<p>Рапсова олія кукурудзяний екстракт желатин KH₂PO₄ гліцин розчин мікроелементів : CoCl₂ MnCl₂ · 4H₂O ZnSO₄ · 7H₂O MgSO₄ · 7H₂O</p>	<p>73 60 30 1,5 15, г/200 мл: 0,88 (0,002) 3,6 (0,005) 8,8 (0,01) 2,03 (0,001)</p>	<p>216</p>	<p>13,7</p>	<p>Культивування у ферментері об'ємом 3 л (n = 600 об/хв, t° = 28 ± 0,5 °C, pH = 6,8)</p>	<p>Park E. Y., Ito Y., Nariyama M., Sugimoto T., Lies D., Kato T. The improvement of riboflavin production in <i>Ashbya gossypii</i> via disparity mutagenesis and DNA microarray analysis. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i>. 2011, 91 (5): 1315 – 1326. doi: 10.1007/s00253-011-3325-0.</p>
--	---	--	------------	-------------	---	---

Закінчення табл. 2.1

<i>Candida famata</i> AF-4 генно-інженерний	Глюкоза	70	126	16,4	Культивування у ферментері об'ємом 7 л (n = 1200 об/хв, t° = 28 °С, рН = 5,5)	Dmytruk K., Lyzak O., Yatsyshyn V., Kluz M., Sibirny V., Puchalski C., Sibirny A. Construction and fed-batch cultivation of <i>Candida famata</i> with enhanced riboflavin production. <i>Journal of Biotechnology</i> . 2014, 172: 11 – 17. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.12.005.
	дріжджовий екстракт	4				
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	3				
	сечовина	3				
	аспарагін	2				
	гліцин	2				
	КН ₂ РО ₄	0,4				
	К ₂ НРО ₄	1,2				
	МgSO ₄ · 7Н ₂ О	0,6				
	СаСl ₂ · 6Н ₂ О	0,2				
	(NH ₄) ₆ Мо ₇ О ₂₄ · 4 Н ₂ О	0,2				
	МnСl ₂ · 4Н ₂ О	0,05				
	СuSO ₄ · 5Н ₂ О	0,025				
	Н ₃ ВО ₃	0,05				
	СоСl ₂ · 6Н ₂ О	0,005				
	К ₂ Сr ₂ О ₇	0,005				
біотин	0,0003					
тіамін	0,0004					

**Вартість поживних середовищ для вирощування продуцентів
рибофлавіну**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*	
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	
<i>Bacillus subtilis</i> КССМ 10445	Глюкоза	100	51	5,1	1	
	сухі дріжджі	20	180	3,6	2	
	кукурудзяний екстракт	5	65	0,325	3	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	19	0,0095	4	
	KH ₂ PO ₄	1,5	97	0,1455		
	K ₂ HPO ₄	3,5	120	0,42	3	
	сечовина	6	43,37	0,26	5	
	еритроміцин	0,01	10100	0,101	6	
	хлорамфенікол	0,01	2400	0,024	3	
	Вартість 1 л середовища – 9,985 грн					
<i>Candida famata</i> AF-4	Глюкоза	70	51	3,57	1	
	дріжджовий екстракт	4	1100	4,4	3	
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	3	22	0,066	4	
	сечовина	3	43,37	0,13	5	
	аспарагін	2	580	1,16	4	
	гліцин	2	700	1,4	3	
	KH ₂ PO ₄	0,4	97	0,0388	4	
	K ₂ HPO ₄	1,2	120	0,144	3	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,6	19	0,0114	4	
	CaCl ₂ · 6H ₂ O	0,2	26	0,0052	7	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,2	1440	0,288	4	
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,05	193	0,01	1	
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	160	0,004	3	
	H ₃ BO ₃	0,05	100	0,005	8	
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,005	2820	0,014	3	
	K ₂ Cr ₂ O ₇	0,005	500	0,0025		
	біотин	0,0003	49000	0,0147		
	тіамін	0,0004	3060	0,0012	2	
	Вартість 1 л середовища – 11,265 грн					

<i>Bacillus subtilis</i> RH44	Глюкоза	80	51	4,08	1
	дріжджовий екстракт	5	1100	5,5	3
	K ₂ HPO ₄	1	120	0,12	
	KH ₂ PO ₄	1	97	0,097	4
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	19	0,0019	
Вартість 1 л середовища – 9,7989 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2023 р. 1 – <https://www.chemsale.com.ua/>, 2 – <https://bigl.ua/ua/>, 3 – <https://prom.ua/ua/>, 4 – <https://flagma.ua/>, 5 – <https://7sotok.com.ua/ua/>, 6 – <https://tabletki.ua/uk/>, 7 – <https://ximindustry.com/ua/>, 8 – <https://him-component.com.ua/>.

Згідно зі значеннями, наведеними у табл. 2.2, найдешевшим виявилось середовище для культивування штаму *B. subtilis* RH44. А загальна вартість компонентів притаманна для середовища вирощування *C. famata* AF-4 є найвищою (приблизно у 1,2 рази). Тому у подальшому необхідним є визначення умовної вартості 1 г рибофлавіну (див. табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г рибофлавіну, одержаного при рості на середовищах різного складу

Біологічний агент	Концентрація рибофлавіну, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість синтезованого рибофлавіну за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г рибофлавіну, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus subtilis</i> КССМ 10445	26,8	90	0,298	9,985	0,373
<i>Candida famata</i> AF-4	16,4	126	0,13	11,265	0,687
<i>Bacillus subtilis</i> RH44	16,36	48	0,341	9,7989	0,599

Відповідно до даних, зазначених у табл. 2.3, остаточно обираємо для біосинтезу рибофлавіну бактеріальний штам *B. subtilis* КССМ 10445, оскільки умовна вартість одержаного цільового продукту буде найнижчою. Незважаючи на те, що кількість синтезованого рибофлавіну за годину

спорідненим штамом *Bacillus subtilis* RH44 є вищою, умовна вартість синтезованого ним вітаміну В₂ є більшою на 60%, що не є доцільним.

2.2. Морфолого-культуральні ознаки *Bacillus subtilis* КССМ 10445

Bacillus subtilis – це типовий грампозитивний мікроорганізм, який має паличкоподібну форму [30]. Такі палички здатні утворювати ендоспори, які можуть тривалий час виживати у надзвичайно суворих умовах. Це пояснюється тим, що під час стресу дані бактерії перетворюються на спори та переходять у стан спокою [31, 32].

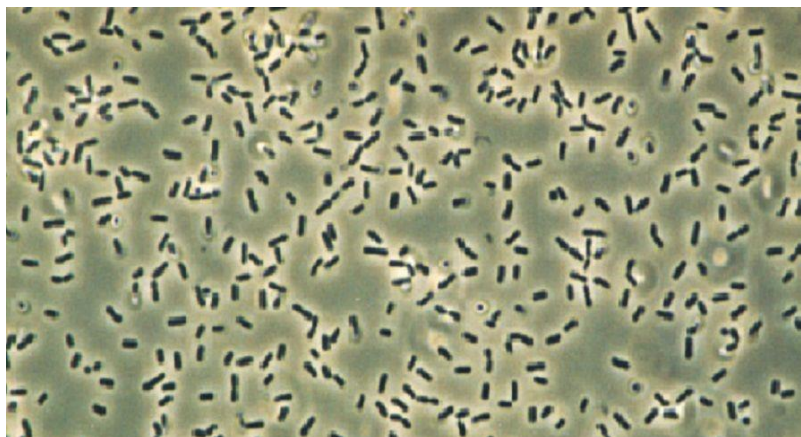


Рис. 2.1. Зображення *Bacillus subtilis* під мікроскопом [31]

Клітини *B. subtilis* характеризуються високою швидкістю росту. Зазвичай, бактерії мають довжину 2–6 мкм і діаметр менше 1 мкм [33].

Бактерії *Bacillus subtilis* під час росту на кролячому кров'яному агарі утворюють сіро-білі, круглі, непрозорі, плоскі, середнього розміру колонії, що висихають та утворюють зону гемолізу (див. рис. 3.2 (А)). За умов росту на TSA-агарі з 5% ембріональної телячої сироватки, можна побачити, що колонія також утворює сіро-білі, круглі, непрозорі, середнього розміру колонії, що також мають товсті та гладкі виступи (див. рис. 3.2 (В)) [34].

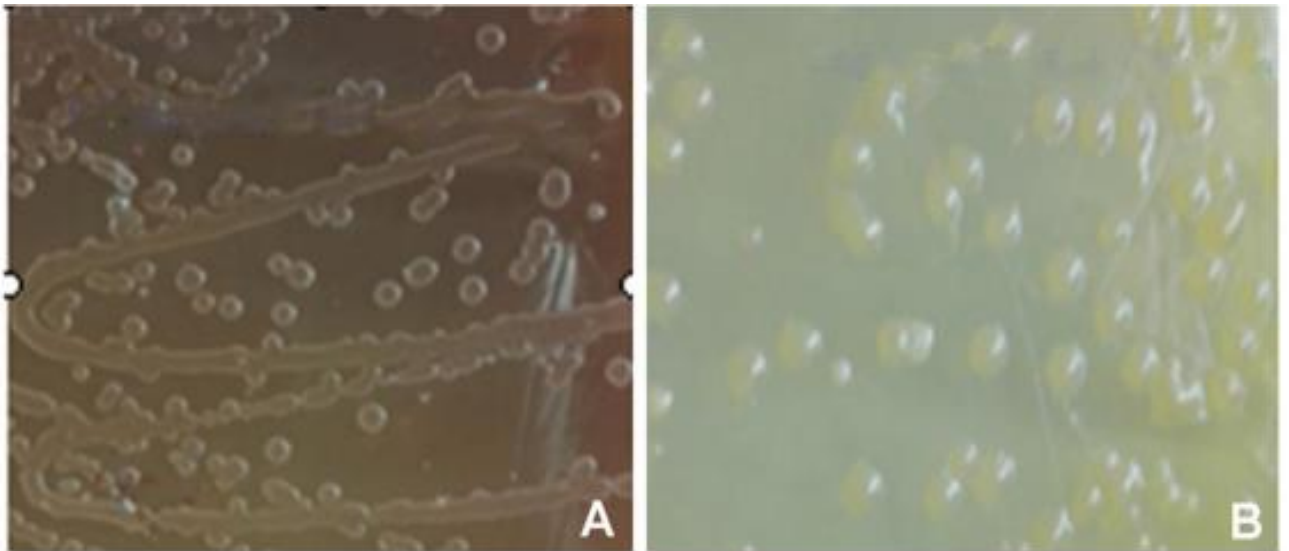


Рис. 2.2. Вигляд колоній *Bacillus subtilis* на курячому кров'яному агарі (А) і на ТАС-агарі, що містить 5% фетальної телячої сироватки (В) [34]

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки *Bacillus subtilis* КССМ 10445

Бактерія – мезофіл, оскільки оптимальною температурою для росту *B. subtilis* є 30 °С. По відношенню до кисню мікроорганізм є аеробом [35]. Крім того, значення рН мало впливає на стабільність або активність даного мікроорганізму. Тому бактерія має великий потенціал для використання як альтернативи протимікробним препаратам [34].

Як джерела вуглецю *Bacillus subtilis* здатна використовувати маніт, рибозу, глікоген, желатин, мальтозу, сахарозу та нітрати, але не асимілює ксилозу та лактозу. *B. subtilis* дає позитивну ферментативну активність на лужну фосфатазу, α -глюкозидазу, β -галактозидазу, каталазу і желатиназу [35]. *Bacillus subtilis* також може розкласти поліетилен (пластикові полімери). *B. subtilis* і кілька інших типів бактерій здатні використовувати поліетилен як єдине джерело вуглецю (енергії). Оскільки ці бактерії виділяють вуглець і виробляють тепло, пластикові полімери повільно розкладаються [31].

2.4. Таксономічний статус *Bacillus subtilis* КССМ 10445

Bacillus subtilis є «типовим штамом» ряду *Bacillales* і визначальним організмом усього типу *Firmicutes*, який вперше був детально описаний

Фердинандом Коном у 1872 році [33]. Сучасна (філогенетична) класифікація для *B. subtilis* КССМ 10445 наведена відповідно до [36]:

Царство: *Bacteria*

Тип: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Ряд: *Bacillales*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: *Bacillus*

Вид: *subtilis*

Штам: КССМ 10445

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ

3.1. Потреба у рибофлавіні

Вітаміни — це хімічні сполуки, похідні яких беруть участь у життєво важливих метаболічних шляхах усіх живих організмів. Повний ендогенний біосинтез вітамінів може здійснюватися багатьма бактеріями, дріжджами та рослинами, але люди повинні отримувати більшість цих необхідних поживних речовин з їжею [37].

Рибофлавін (вітамін В₂) є водорозчинним і термостабільним вітаміном, який організм використовує для перетворення жирів, білків і вуглеводів у глюкозу для отримання енергії. На додаток до підвищення енергії, рибофлавін діє як антиоксидант для належної роботи імунної системи, здорової шкіри та волосся. Без достатньої кількості рибофлавіну макроелементи, такі як вуглеводи, жири та білки, не можуть засвоюватися та підтримувати організм [38].

У людей існує два типи дефіциту рибофлавіну:

- первинний дефіцит рибофлавіну – виникає, коли дієта людини бідна на вітамін В₂;
- вторинний дефіцит рибофлавіну – виникає з іншої причини, можливо, через те, що кишечник не може належним чином засвоїти вітамін, або організм не може його використовувати, або тому, що він надто швидко виводиться [39].

Наслідки арибофлавінозу (нестачі вітаміну В₂) у людини включають біль у горлі, гіперемію, набряк порожнини рота і слизових оболонок, хейлоз і глосит, що в подальшому призводить до випадання волосся, запалення шкіри, розвитку катаракти, появи мігрені, зниження рівня гемоглобіну.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Рядишенко І. Ю.</i>						25	103
<i>Керівник</i>	<i>Удимович Ю. М.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. конто</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Симптоми погіршення включають набряк язика, себорейний дерматит, анемію та порушення функції нервів [15]. Для лікування вище зазначених проблем добова доза вітаміну В₂ складатиме від 1,8 до 25 мг в залежності від природи захворювання [40 – 42]. Потреба у рибофлавіні, зважаючи на кількість випадків таких захворювань представлена у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Загальна потреба у рибофлавіні

Профілактика/ лікування захворювання	Потрібна доза вітаміну на добу, мг	Термін прийому рибофлавіну	Доза препарату, необхідна на курс 1 людині, мг	Загальний обсяг хворих в Україні (станом на 2017 рік [43])	Потреба у рибофлавіні на усіх хворих, кг
Хвороби ока та придаткового апарату	20	20 діб [40]	400	1 365 415	546,2
Хвороби шкіри та підшкірної клітковини				1 564 434	625,8
Вагітність, пологи та післяпологовий період	1,8	10 місяців – 300 днів [41]	540	381 816	206,2
Хвороби нервової системи	25	30 днів [42]	750	636 282	477,2
Хвороби системи кровообігу				1 780 595	1335
Разом					2713,2

3.2. Розрахунок потужності виробництва водорозчинного вітаміну

У Державному реєстрі лікарських засобів України [44] представлено широкий асортимент препаратів рибофлавіну. Варто зазначити, що близько 60 % препаратів є вітчизняного виробництва (див табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Лікарські препарати, до складу яких входить рибофлавін, зареєстровані в Україні

Назва препарату	Доза вітаміну у препараті	Підприємство-виробник
Рибофлавін	97,0% сухої речовини (СР)	БАСФ Компані Лтд., Корея
Демотон-Б НЕО	2 мг	ДЕМО СА Фармасьютикал Індастрі, Греція

Продовження табл. 3.2

Рибофлавіну натрію фосфат	73,0 – 79,0% СР	ХАРМЕН ФІНОХЕМ ЛТД. (повний цикл виробництва), Індія БАСФ КАМПАНІ ЛТД. (виробництво інтермедіату), Корея
Рибофлавін (Вітамін В ₂)	97,0% сухої речовини (СР)	Хубей Гуанцзи Фармас'ютикал Ко., Лтд., Китай
Гепадиф	0,5 мг	ТОВ "ВАЛАРТІН ФАРМА", Україна
Ревіт	1 мг	ПрАТ "Технолог", Україна
		АТ "ВІТАМІНИ", Україна
		ПрАТ "Технолог", Україна
		АТ "КИЇВСЬКИЙ ВІТАМІННИЙ ЗАВОД", Україна
Супервіт	1,6 мг	
Юнівiт	0,3 мг	
Гексавіт	2 мг	ПрАТ "Технолог", Україна
		АТ "ВІТАМІНИ", Україна
		АТ "КИЇВСЬКИЙ ВІТАМІННИЙ ЗАВОД", Україна
Декамевіт	10 мг	
Синдрекс	0,8 мг	АТ "Фармак", Україна
Вазавітал	1 мг	ТОВ "АСТРАФАРМ", Україна ПрАТ "Біолік", Україна
Есслівер Форте	6 мг	Наброс Фарма Пвт. Лтд., Індія
Ліволін Форте	6 мг	Мега Лайфсайенсіз Паблік Компані Лімітед, Таїланд
Нейровітан	2,5 мг	Хікма Фармас'ютикалз Ко. Лтд., Йорданія
Ундевіт	2 мг	ПрАТ "Технолог", Україна АТ "ВІТАМІНИ", Україна
Солувіт Н	4,9 мг	Фрезеніус Кабі АБ (маркування, пакування, контроль якості, випуск серії), Швеція Фрезеніус Кабі ССПЦ (виробництво, маркування, пакування), Китай
Піковіт Форте	1,7 мг	КРКА, д.д., Ново место (відповідальний за виробництво "in bulk", первинну упаковку, вторинну упаковку, відповідальний за контроль серій, відповідальний за контроль та випуск серій), Словенія
Гінсомін	1,5 мг	Мега Лайфсайенсіз Паблік Компані Лімітед, Таїланд
Вітакап	5 мг	
Піковіт	0,3 мг	КРКА, д.д., Ново место (відповідальний за виробництво "in bulk", первинну упаковку, вторинну упаковку, відповідальний за контроль та випуск серії), Словенія НЛЗОХ (Національні лабораторія за здоров'я, околине ін храно) (відповідальний за контроль серії), Словенія
	1 мг	
Дуовіт	1,2 мг	
Ундетаб	2 мг	АТ "КИЇВСЬКИЙ ВІТАМІННИЙ ЗАВОД", Україна
Комплевiт	15 мг	

Враховуючи високу конкуренцію на фармацевтичному ринку України, прийmemo, що зможемо задовольнити потреби у рибофлавіні обсягом 10 %. Зважаючи на це, вітаміну необхідно буде виробити:

$$2713,2 \times 0,1 = 271,3 \text{ кг/рік.}$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для одержання річної потреби рибофлавіну та об'єму ферментера

Потужність проєктованого виробництва водорозчинного вітаміну рибофлавіну складає $G_{гп} = 271,3$ кг/рік. Частка сухих речовин у готовому продукті становитиме 0,9 – 0,95, оскільки такий продукт отримують у вигляді субстанції із залишковою вологою $w = 5 - 10\%$. На 1 л культуральної рідини синтезується 26,8 г рибофлавіну під час вирощування продуценту – *Bacillus subtilis* КССМ 10445 [26].

Планується, що така кількість продукту буде вироблятися протягом $T_{рд} = 40$ трудоднів. Отже, кількість виробничих циклів на рік становитиме:

$$N_{цк} = 24 \times T_{рд} / T_{цф} = 24 \times 40 / 98 = 9,8 \approx 10 \text{ циклів.}$$

Цикл роботи ферментера ($T_{цф}$) включає в себе термін виробничого біосинтезу вітаміну – 90 год [26] і тривалість підготовки ферментера до роботи (8 год). Підготовка ферментера складається із:

- 1) миття та огляду апарату (1,5 год),
- 2) перевірки його на герметичність (1 год),
- 3) підігріву (0,5 год),
- 4) його стерилізації (1 год),
- 5) охолодження (1 год),
- 6) завантаження в нього середовища (1,5 год),
- 7) засів (0,5 год),
- 8) вивантаження одержаної культуральної рідини (1 год).

За виробничий цикл утворюється рибофлавіну:

$$G_{цк} = G_{гп} / N_{цк} = 271,3 / 10 = 27,1 \text{ кг/цикл.}$$

Слід також врахувати і сумарні втрати рибофлавіну під час операцій виділення та очищення, які складатимуть 20%. Тому об'єм культуральної рідини, що зливатиметься за цикл становитиме:

$V_{кр} = K1 \times G_{цк} \times C_{гп} / R_{кр} (1 - E_{св}) = 1,1 \times 27,1 \times 0,92 / (26,8 \times (1 - 0,2)) = 1,28 \text{ м}^3$, де $K1$ – це коефіцієнт запасу, потрібний для врахування можливості нестерильних операцій ($K1 = 1,1 - 1,5$).

Отже, за виробничий цикл одержують $V_{кр} = 1,28 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Для отримання культуральної рідини постає необхідність у врахуванні втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 – 15 %).

Тому, ферментер, в якому можна одержати $1,28 \text{ м}^3$ культуральної рідини, матиме робочий об'єм:

$V_{г} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 1,28 / (1 - 0,1) = 1,42 \text{ м}^3$, де $E_{ф}$ – коефіцієнт, що відповідає за втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Можливий геометричний об'єм ферментера при $K_{з} = 0,6$ складає:

$$V_{мф} = V_{г} / K_{з} = 1,42 / 0,6 = 2,36 \text{ м}^3$$

Найближчим за об'ємом стандартний ферментер є $V_{ф} = 2,5 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення для обраного ферментера:

$$K_{зф} = V_{г} / V_{ф} = 1,42 / 2,5 = 0,57, \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Об'єм необхідного посівного матеріалу (доза) для ферментера зазвичай становить 10 % від заданого об'єму поживного середовища.

Отже, кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 1,42 / (1 + 0,1) = 1,29 \text{ м}^3,$$

де $X_{ф} = 0,1$ – доза поживного середовища для ферментера.

Об'єм посівного матеріалу буде: $V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 1,42 - 1,29 = 0,13 \text{ м}^3$.

У процесі отримання $0,13 \text{ м}^3$ інокуляту у посівному апараті також слід врахувати втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які складають 10 – 15%.

Враховуючи вище написане, кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 0,13 / (1 - 0,1) = 140 \text{ л.}$$

Як уже зазначалося попередньо, кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тому кількість поживного середовища у посівному апараті буде складати:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 140 / (1 + 0,1) = 127 \text{ л,}$$

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

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить $V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 140 - 127 = 13 \text{ л.}$

Такий об'єм інокуляту $V_{роб.2} = 140 \text{ л}$ можна одержати під час культивування бактеріального штаму КССМ 10445 у посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{ін2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 140 / 0,6 = 233 \text{ л.}$ Найближчим за об'ємом є посівний апарат стандартних розмірів $V_{сін} = 250 \text{ л.}$ Отже, уточнюємо заданий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап2} = V_{роб.2} / V_{сін} = 140 / 250 = 0,56.$$

Процес одержання 13 л посівного матеріалу проходить в інокуляторі із врахуванням втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (від 10 до 15%).

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

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 13 / (1 - 0,1) = 14,44 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза), як уже було попередньо зазначено, складає 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища, для вирощування бактерій в інокуляторі буде складати:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 14,44 / (1 + 0,1) = 13,13 \text{ л,}$$

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

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора становить $V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 14,44 - 13,13 = 1,31$ л.

Кількість посівного матеріалу $V_{роб.3} = 14,44$ л можна одержати під час культивування бактерій в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 14,44 / 0,6 = 24,1$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 30$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап3} = V_{роб.3} / V_{сін} = 14,44 / 30 = 0,48.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм3} = 1,31$ л можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Задля такого процесу використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм3} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 1310 / (750 \cdot 0,2) = 8,7.$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 9 качалочних колб.

Можна зробити висновок, що процес одержання посівного матеріалу для проведення виробничого біосинтезу рибофлавіну у ферментері об'ємом $2,5 \text{ м}^3$ із коефіцієнтом заповнення 0,6 буде здійснюватися у три етапи. Узагальнена інформація щодо стадій виробництва рибофлавіну наведена у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Розраховані кількість та об'єми апаратів для стадій підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу рибофлавіну

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{г}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{роб}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, л
1	2	3	4	5	6
1	2500	0,57	1420	1290	130
2	250	0,56	140	127	13
3	30	0,48	14,44	13,13	1,31
4	0,75×9 колб	0,2	–	1,2	0,11

Таким чином, за результатами вищепроведених розрахунків для біосинтезу вітаміну B₂ *B. subtilis* КССМ 10445 приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 2,5 м³, один посівний апарат об'ємом 250 л та один інокулятор об'ємом 30 л.

3.5. Схема біотрансформації глюкози у рибофлавін

Bacillus subtilis КССМ 10445 здатна до продукції рибофлавіну за умов росту на такому субстраті як глюкоза. Такий моносахарид у процесі його споживання бактерією розкладається за гліколітичним шляхом.

Відповідно до Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) катаболізм глюкози у *B. subtilis* [45] відбувається шляхом її попереднього розпаду із залученням глюकोкінази (КФ 2.7.1.2) на α -D-глюкозо-6-фосфат. Отримана таким чином речовина перетворюється за допомогою глюкозо-6-фосфат-ізомерази (КФ 5.3.1.9) на β -D-фруктозо-6-фосфат, який далі розкладається із залученням 6-фосфотруктокінази (КФ 2.7.1.11) у β -D-фруктозо-1,6-дифосфат. У свою чергу, з однієї такої сполуки утворюються діоксиацетонфосфат і гліцеральдегід-3-фосфат (фермент – фруктозо-дифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13)). На наступному етапі гліцеральдегід-3-фосфат за дії гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, з якого потім одержуємо 3-фосфогліцерат за допомогою ферменту фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3).

Катаболізм продовжується шляхом перетворення 3-фосфогліцерату за допомогою фосфогліцеромутази (КФ 5.4.2.11) на 2-фосфогліцерат, з якого потім утворюється фосфоенолпіруват (ФЕП) за дії енолази (КФ 4.2.1.11). ФЕП перетворюється із залученням піруваткінази (КФ 2.7.1.40) на піруват, який згодом під дією ферредоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.11) катаболізується в ацетил-КоА. Потім одержаний таким чином ацетил-КоА направляється до циклу трикарбонових кислот (ЦТК) [46].

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення інтермедіату ЦТК – оксалоацетату при рості на вуглеводному субстраті – глюкозі використовуються такі перетворення як карбоксилування

фосфоенолпірувату (фермент – фосфоенолпіруваткарбоксілаза КФ 4.1.1.31) і карбоксилювання пірувату (фермент – піруваткарбоксілаза КФ 6.4.1. 1).

Для біосинтезу рибофлавіну необхідним є функціонування пентозофосфатного циклу [47], у ході послідовних реакцій якого утворюється вихідна сполука для синтезу вітаміну – рибозо-5-фосфат. У такі перетворення на початку залучається рибозо-6-фосфат, з якого за дії глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49) синтезується глюконат-6-фосфат, з якого утворюється рибозо-5-фосфат за допомогою глюконат-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.44). Одержана сполука під дією ферменту транскетолази (КФ 2.2.1.1) перетворюється на фруктозо-5-фосфат, з якого утворюється глюкозо-фосфат за допомогою глюкозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.9).

Одержаний у ході реакцій пентозофосфатного циклу рибозо-5-фосфат за дії рибозо-фосфат-пірофосфокінази (КФ 2.7.6.1) перетворюється на 5-фосфо- α -D-рибозо-1-дифосфат [48], з якого далі синтезується рибозил-5-фосфат за допомогою амідофосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.14). З отриманої сполуки синтезується за допомогою фосфорибозиламін-гліциллігази (КФ 6.3.4.13) 5'-фосфорибозилгліцинамід, який потім перетворюється на 5'-фосфорибозил-N-формілгліцинамід за дії ферменту фосфорибозилгліцинамідформілтрансферази (КФ 2.1.2.2). За дії субодиниці фосфорибозилформілгліцинамідсинтетази (КФ 6.3.5.3) утворюється 2-(формамідо)-N1-(5'-фосфорибозил)ацетамідин, з якого далі за допомогою фосфорибозилформілгліцинамідинциклолігази (КФ 6.3.3.1) одержуємо аміноімідазолриботид, з якого синтезується 1-(5-фосфо-D-рибозил)-5-аміно-4-імідазолкарбоксилат за дії ферменту фосфорибозиламіноімідазолкарбоксілази (КФ 4.1.1.21). Попередньо одержана сполука за допомогою фосфорибозиламіноімідазол-сукцинокарбоксамідсинтази (КФ 6.3.2.6) перетворюється на 1-(5'-фосфорибозил)-5-аміно-4-(N-сукцинокарбоксамід)імідазол, з якого за дії аденілосукцинатліази (КФ 4.3.2.2) отримуємо 1-(5'-фосфорибозил)-5-аміно-4-

імідазолкарбоксамід, який далі перетворюється на 1-(5'-фосфорибозил)-5-формамідо-4-імідазолкарбоксамід за допомогою фосфорибозиламіноімідазолкарбоксамід формілтрансферази (КФ 2.1.2.3). Остання зазначена сполука перетворюється на інозин-монофосфат (ІМФ) за допомогою циклогідролази (КФ 3.5.4.10).

На сполуці ІМФ біосинтетичні шляхи розгалужуються. За дії ферменту аденілосукцинатсинтази (КФ 6.3.4.4) дана речовина перетворюється на аденілсукцинат, з якого далі утворюється аденозинмонофосфат за допомогою аденілосукцинатліази (КФ 4.3.2.2). Із попередньо синтезованої сполуки під дією аденілаткінази (КФ 2.7.4.3) утворюється аденозиндифосфат (АДФ), який за допомогою нуклеозиддифосфаткінази (КФ 2.7.4.6) перетворюється на аденозинтрифосфат (АТФ).

Під дією іншого ферменту – інозин-5'-монофосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.205) із раніше утвореного ІМФ синтезуємо ксантозин-5-фосфат (КМФ), який далі перетворюється на гуанозинмонофосфат (ГМФ) за дії ГМФ-синтази (КФ 6.3.5.2). Із одержаної сполуки за допомогою гуанілаткінази (КФ 2.7.4.8) утворюється ганозиндифосфат (ГДФ), з якого далі синтезується гуанозинтрифосфат (ГТФ) за дії ферменту нуклеозиддифосфаткінази (КФ 2.7.4.6). Утворений ГТФ піддається дії ГТФ-циклогідролази (КФ 3.5.4.25) із утворенням 2,5-діаміно-6-(5-фосфо-D-рибозиламіно)піримідин-4(3Н)-ону, що далі перетворюється на 5-аміно-6-(5'-фосфорибозиламіно)урацил за допомогою діаміногідроксифосфорибозиламінопіримідиндеамінази (КФ 3.5.4.26). Синтезована сполука згодом перетворюється під дією 5-аміно-6-(5-фосфорибозиламіно)урацилредуктази (КФ 1.1.1.193) на 5-аміно-6-(5'-фосфо-D-рібітіламіно)урацил, з якого за дії 5-аміно-6-(5-фосфо-D-рібітіламіно)урацилфосфатази (КФ 3.1.3104) синтезується 5-аміно-6-(1-D-рібітіламіно)урацил. Далі під дією 6,7-диметил-8-рібітіллумазинсинтази (КФ 2.5.1.78) така сполука перетворюється на 6,7-диметил-8-(D-рібітіл)лумазин, з якого далі синтезується цільовий продукт – рибофлавін за допомогою ферменту рибофлавінсинтази (КФ 2.5.1.9) [49].

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ

4.1. Обґрунтування вибору способу культивування *Bacillus subtilis* КССМ 10445 та типу ферментера

Будь-який біотехнологічний процес завжди залежить від способу та умов культивування біологічного агента. Підбір оптимальних показників вирощування бактеріального продуцента є одним із ключових моментів щодо забезпечення ефективності такого процесу.

Оскільки процес вирощування бактеріального продуцента здійснюється переважно в аеробних умовах [50], тому необхідним є підготовка та безперервна подача стерильного аераційного повітря. Ферментаційне обладнання обов'язково повинне містити барботер для ефективного забезпечення кисневих умов, а також газоаналізатор, необхідний для контролю вуглекислоти, що виділяється протягом біосинтезу. Також потрібно передбачити встановлення фільтрів над ферментером і посівними апаратами. Для інтенсивного розчинення кисню у середовищі, у ферментаційному обладнанні повинні бути встановлені мішалки із частотою перемішування 200 об/хв.

Необхідною умовою проведення процесу біосинтезу рибофлавіну, є підтримання температурного режиму на належному рівні (37 °С) [26]. Даний показник контролюється шляхом встановлення датчику температури на посівних апаратах і ферментері. Також обов'язково є наявність на даних апаратах рН-датчика, оскільки продукція вітаміну В₂ відбувається за нейтральної кислотності (7,2 – 7,4) [26].

За умов росту *Bacillus subtilis* КССМ 10445 при 37 °С, постає необхідність у забезпеченні стерильних умов, оскільки достатньо велика кількість мезофільних бактерій здатна рости за даного температурного режиму.

					НУХТ БТЕК 05.01.13 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ	Літера	Аркш	Архів
Розробник	Рябишенко І. Ю.						36	7/13
Керівник	Удимович Ю. М.							
Н. контр								
Консульт								
Зав. каф.	Стадніков В.П.					Кафедра БТМ		

Аби уникнути сторонньої контамінації, підготовку посівного матеріалу, а також виробничий біосинтез необхідно проводити із дотриманням правил асептики.

Виробничий біосинтез рибофлавіну може здійснюватися як періодичним, так і безперервним способом. Але, оскільки концентрація субстрату у середовищі культивування складає 100 г/л [26], постає потреба у підготовці підживлювального розчину глюкози. Початкова концентрація глюкози у середовищі складає 40 г/л. Тривалість культивування складає 90 год, приймаємо, що розчин підживлення додається кожні 10 год, отже, кількість порцій підживлення складе $(90 - 10) / 10 = 8$. Тому із кожною порцією підживлення у середовище вносимо $60 / 8 = 7,5$ г/л. Забезпечення правильності такого процесу можна досягти за використання періодичного способу культивування. Зважаючи на те, що наш продуцент – це не грибні клітини, та недоліки, що можуть вплинути на вихід цільового продукту, замість поверхневого способу культивування, обираємо саме глибинний.

Підсумувавши усе вище написане, можна зробити висновок, що біосинтез рибофлавіну буде здійснюватися за таких умов:

- стерильність;
- безперервна аерація;
- температура 37°C;
- рН 7,2 – 7,4;
- періодичне культивування із підживленням;
- глибинне вирощування.

З метою забезпечення річної потреби у рибофлавіні, для культивування бактеріального штаму потрібен ферментер об'ємом 2,5 м³. Для цього ми можемо використати ферментер Mobius®. Біореактори Mobius® є масштабованим портфоліо резервуарних біореакторів із перемішуванням, які забезпечують гнучкість, налаштовуючи програмне забезпечення, апаратне забезпечення та одноразові вузли для використання в системах періодичної

підживлення та перфузії [51]. Переваги щодо використання таких біореакторів:

- наявність одноразових вузлів, розроблених для безпечної та повторюваної роботи;
- розмірне співвідношення 5:1 забезпечує найбільш гнучку стратегію засіву та вирощування мікроорганізмів;
- працює як окрема система або інтегрована як частина платформи автоматизації підприємства;
- продемонстрована масштабованість ключових інженерних параметрів дає впевненість у збільшенні масштабу процесу [51].

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Продуцент водорозчинного вітаміну рибофлавіну – *B. subtilis* КССМ 10445 є факультативно аеробною бактерією [50], але синтез вітаміну повинен обов'язково відбуватись за постійної аерації [26]. Тому необхідною є безперервна подача стерильного аераційного повітря впродовж усього процесу біосинтезу. Задля цього у технологічній схемі буде передбачено відповідну послідовність етапів.

Підготовка стерильного повітря буде здійснюватися шляхом стерилізуючої фільтрації. Особливість такого методу у біотехнологічних виробництвах полягає в необхідності повного утримання бактерій, які є дуже дрібними частинками (найдрібніші бактерії мають розмір 0,3 мкм). Це створює потребу у використанні багатоступінчастих систем очищення, які включають в себе використання різних видів фільтрів на різних етапах процесу [53]. Такі етапи включають в себе:

1. *Забір атмосферного повітря*, що здійснюється за використання турбокомпресора. Такий прилад встановлюють на висоті приблизно 2-3 м від найвищої точки будівлі, а саме – 10 м. Таке значення обране із врахуванням висоти поверху – 6 м, кількості поверхів – 1, косоного даху будівлі – 1,5 м.

2. *Грубе очищення повітря*. Повітря спочатку піддається процесам попереднього очищення, щоб вилучити частки пилу, бруду та інших

забруднень, які можуть наявні у початковому повітрі. Зазвичай використовуються грубі фільтри, що можуть видаляти великі частки.

3. *Стиснення повітря* у турбокомпресорі до значень тиску в межах 0,35-0,5 Мпа, що призводить до підвищення температури повітря від 120 до 250 °С і збільшення вмісту вологи на одиницю об'єму [53].

4. *Охолодження повітря*. Стиснення повітря супроводжується його сильним нагріванням, тому після компресорів повітря надходить у холодильник [54].

5. *Підігрів повітря*. Відповідний процес проходить у теплообміннику-нагрівачі.

6. *Видалення вологи*. Щоб видалити з повітря зайву вологу, його необхідно прохолоджувати до температури нижче крапки роси. Перед фільтрами встановлюють одну більшу ємність (ресивер) або систему невеликих посудин, які служать для вирівнювання тиску в системі й забезпечення рівномірної подачі повітря на фільтри [53, 54].

7. *Проходження повітря через головний фільтр*. На даній стадії можна досягти видалення приблизно 98% можливих мікроорганізмів.

8. *Очищення за використання індивідуальних фільтрів*. Для очищення повітря на даному етапі використовуються індивідуальні фільтри, які встановлюються перед кожним ферментатором і повинні забезпечувати очищення повітря від часток діаметром 0,3 мкм на 99,999 %. Специфічною вимогою, пропонованою до фільтруючих матеріалів, застосовуваних на даній стадії очищення, є необхідність їхньої періодичної стерилізації гострою парою разом з усім устаткуванням технологічної лінії [54].

Також необхідно пам'ятати, що у мікробіологічних боксах та лабораторіях, де проводиться підготовка посівних культур та інокуляту, повітря стерилізують, використовуючи ультрафіолетове опромінення (за допомогою УФ-ламп) [53].

4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва рибофлавіну

Необхідною складовою створення асептичних умов на біотехнологічних підприємствах є проведення санітарно-гігієнічних заходів. Основною метою санітарної підготовки виробництва є забезпечення мінімізації рівня забруднення всіх складових виробничого процесу: персоналу, поверхонь обладнання, яке має контакт з культуральною рідиною, збереження чистоти на виробничих ділянках, де чистота та асептика впливають на якість продукції. Роботи санітарно-гігієнічного призначення відіграють значущу роль у створенні безпечних умов праці та захисту здоров'я працівників підприємства. Санітарна підготовка виробництва здійснюється через проведення регулярного прибирання виробничих приміщень, щоденного та позмінного прибирання та централізовану підготовку обладнання [52].

Мийні засоби являють собою індивідуальні хімічні речовини або складні суміші хімічних речовин, що підсилюють дію одна одної, з поверхнево-активними речовинами й речовинами, що викликають піногасіння. Як правило, для миття доцільно застосовувати складні суміші, оскільки вони мають ширший спектр дії та кращий миючий ефект [52].

Миючі засоби повинні відповідати наступним критеріям:

- бути безпечними для здоров'я людини і не мати токсичного, алергічного та шкірно-резорбтивного впливу. Компоненти, які входять в склад миючих засобів, не повинні мати мутагенного, тератогенного, канцерогенного або ембріотоксичного впливу на організм;
- легко розчинятися у воді;
- мати високу мийну активність;
- легко і швидко змиватися з посуду, інвентарю тощо;
- розкладатися біологічно у воді (понад 80%), оскільки вони можуть негативно впливати на природний процес самоочищення води і водні організми.

Миючі засоби не повинні:

- акумулюватися (накопичуватися) в організмі людини;
- мати виражений і стійкий запах;
- впливати на якість продуктів;
- завдавати шкідливої дії на очищувані об'єкти [55].

З метою миття обладнання, підлоги та ін. складових виробництва рибофлавіну будемо використовувати такі засоби як «Taski Sani 4 in 1 Plus» і «Supra».

«*Taski Sani 4 in 1 Plus*» – миючий, дезінфікуючий, дезодоруючий засіб, що видаляє відкладення солей жорсткості води. Засіб для миття, очищення від накипу, дезінфекції та дезодорації для всіх твердих та кислотостійких поверхонь у санітарних кімнатах.

Особливі характеристики:

- препарат на основі молочної кислоти;
- очищує, видаляє накип, дезінфікує та дезодорує за один крок;
- ефективний проти широкого спектру мікроорганізмів, включаючи кишкову паличку, сальмонелу та вірус грипу;
- унікальна запатентована технологія нейтралізації запаху (O.N.T.).

Переваги:

- відмінний миючий засіб, працює у жорсткій воді;
- зменшує кількість миючих засобів, що використовуються для прибирання;
- відмінна гігієна, що зменшує ризик перехресного забруднення;
- залишає приємний, свіжий аромат [56].

Безпінний лужний миючий засіб «*Supra*» – використовується для видалення білкових, жирових забруднень с варильних котлів, накопичувачів, трубопроводів, танків, пастеризатори, сепараторів, охолоджувачів, шлангів та ін. Рекомендовано для роботи в СІП системах. Володіє підвищеним дезінфікуючим ефектом. Миття проводять механізованим (автоматична, СІП

мийка) або ручним способом за допомогою аерозольного розпилення, щіток, губок або дрантя. Концентрація: від 0,01% до 2%.

Даний миючий засіб може замінити каустичну соду на підприємстві. У випадку великих і стійких забруднень допускається збільшення концентрації робочого розчину або тривалості впливу (не допускайте повного висихання розчину). При роботі з цим засобом необхідно використовувати захисне обладнання, включаючи окуляри, рукавички та респіратор. У разі потрапляння на шкіру розчин потрібно мити водою, а забруднений одяг відразу знімати. Не вдихайте аерозольний туман. При попаданні в очі - промивайте холодною водою. Завжди дотримуйтесь внутрішніх інструкцій щодо проведення робіт і правил охорони праці на підприємстві [57, 58].

На біотехнологічних виробництвах задля обробки великої кількості обладнання та поверхонь, надають перевагу дешевим і водночас ефективним засобам для дезінфекції. Головна мета цього процесу – зменшити кількість забруднюючої мікрофлори на поверхнях виробничих приміщень та обладнання. Дезінфекція, як правило, призводить до зниження рівня мікробної забрудненості на 40-60% від початкового рівня. Під час вибору дезінфікуючого засобу, важливо враховувати не лише його біоцидні властивості та спектр дії, але й можливу токсичність для організму людини [52].

Для дезінфекції виробництва водорозчинного вітаміну планується використання таких засобів: «Грін лайн ультра», «Дескоцид преміум клінік», «Септофан».

«Грін лайн ультра» – це готовий засіб для екстреної дезінфекції невеликих за площею поверхонь, інструментів. Використовується для видалення бактерій (в тому числі туберкульоз), вірусів (в тому числі гепатит В, С і ВІЛ) і грибків. Склад: спирти – 70 % (спирт етиловий – 60 %, спирт н-пропіловий – 5 %, спирт ізопропіловий – 5 %), феноксіетанол – 0,1 % [59, 60].

Властивості:

- готовий до використання спиртовмісний безальдегідний засіб;

- має бактерицидну, туберкульозоцидну, віруліцидну, фунгіцидну дію;
- не вимагає змивання;
- не впливає на дихальну систему персоналу та пацієнтів, використовується методом протирання або зрошення [60].

«Дескоцид преміум клінік» – концентрований засіб для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації. Склад: бензалконіум хлорид 10,0-15,0%; спирт ізопропіловий 5,0- 10,0%; дидецилдиметаламаніум хлорид 5,0- 10,0%(діючі речовини); кислота мурашина 1,0-5,0% (активуюча добавка); сурфактант 5,0-10,0%; вода. Знаходить широке використання у підприємствах фармацевтичної, хімічної, біотехнологічної, мікробіологічної, харчової та переробної промисловості. Властивості:

- низький рівень токсичності дозволяє використовувати засіб на найбільш чутливих об'єктах дезінфекції;

- унікальний багатокомпонентний склад для запобігання резистентності мікроорганізмів;

- уніфіковані режими для усіх об'єктів дезінфекції [61].

«Септофан» представляє собою опалесцентну рідину, яка може бути прозорою або мати легкий жовтуватий відтінок, або бути забарвленою, і має слабкий запах активних речовин або ароматизатора. Може відбуватися випадання осаду, яке не впливає на дезінфікуючі властивості цього засобу. Цей засіб може бути змішаним з водою у будь-якому співвідношенні. Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: алкілдиметилбензиламоній хлорид (ЧАС) – 10,0 %, дидецилдиметиламоній хлорид (ЧАС) – 7,5%, діоктилдиметиламоній хлорид – 7,5%, полігексаметиленгуанідин гідрохлорид (ПГМГ ГХ) - 0,25%, 2-пропанол - 5%, вода демінералізована - до 100%.

Засіб «Септофан» та його робочі розчини не спричиняють корозійної або будь-якої іншої пошкоджувальної дії на матеріали, що обробляються, такі як метали, полімери, скло, гума, дерево, кахель, фаянс і т. д. Вони не викликають висвітлення або зменшення міцності тканин, не фіксують

білкових забруднень на поверхні об'єктів обробки, легко змиваються та не залишають залишків [62].

4.4. Особливості підготовки та стерилізації середовища для виробництва рибофлавіну

Згідно з вище наведеними розрахунками виробничий біосинтез рибофлавіну здійснюється у ферментері об'ємом $2,5 \text{ м}^3$ із коефіцієнтом заповнення 0,6. Вирощування посівного матеріалу проводять у 3 етапи:

- 1) вирощування у колбах на качалках;
- 2) культивування бактерій у посівному апараті об'ємом 30 л;
- 3) вирощування бактеріального штаму в інокуляторі об'ємом 250 л.

Відповідно до досліджень, наведених у статті [26], поживне середовище для біосинтезу рибофлавіну включає в себе (г/л):

- глюкоза – 100;
- сухі дріжджі – 20;
- кукурудзяний екстракт – 5;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5;
- KH_2PO_4 – 1,5;
- K_2HPO_4 – 3,5;
- сечовина – 6;
- еритроміцин – 0,01;
- хлорамфенікол – 0,01.

Необхідною умовою проведення ефективного процесу біосинтезу є забезпечення стерильності поживного середовища для культивування його бактеріального продуцента. Отже, на наступному етапі здійснюємо розподіл компонентів середовища на відповідні композиції.

Середовище для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках через його невеликий об'єм плануємо стерилізувати в автоклаві. Стерилізацію поживного середовища для культивування в інокуляторах і виробничого біосинтезу будемо проводити безпосередньо у відповідних апаратах за рН 4,0 – 4,5. Аби забезпечити такі умови, необхідною є

попередня підготовка титрувальних агентів (6%-ий розчин соляної кислоти і 6%-ий розчин натрію гідроксиду).

У складі поживного середовища субстратом виступає глюкоза, що вноситься у вигляді 40%-ого розчину. Такий компонент є термолабільною речовиною, тому його стерилізація буде проходити за менш жорсткого режиму. Кукурудзяний екстракт та сухі дріжджі також не слід піддавати впливу високої температури, через те, що це універсальне джерело поживних компонентів, деякі з яких піддаються розпаду при суттєвому нагріванні (наприклад, деякі амінокислоти).

Солі стерилізуємо в дуже жорстких умовах, оскільки зазвичай, в промислових умовах їх зберігають у мішках на підлозі. Антибіотики (еритроміцин і хлорамфенікол) не стерилізуємо, оскільки такі компоненти, зазвичай, поступають на виробництво у стерильному вигляді.

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

Для отримання потрібного об'єму інокуляту потрібно підготувати 1,2 л поживного середовища, що згодом розливаємо у 9 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл. Враховуючи температурні режими стерилізації та можливе утворення фосфатних осадів, поділ на композиції здійснюємо таким чином:

Композиція А: глюкоза, сухі дріжджі, кукурудзяний екстракт. Режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа протягом 20 – 30 хв.

Композиція Б: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , сечовина. Режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа протягом 40 хв.

Композиція В: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа протягом 40 хв.

4.4.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для отримання інокуляту у посівних апаратах об'ємом 30 і 250 л

Щоб одержати необхідну кількість посівного матеріалу, потрібно здійснити підготовку 13,13 і 127 л поживного середовища. Оскільки солі плануємо стерилізувати у самих апаратах, змінюється композиційний поділ:

Композиція А: глюкоза, сухі дріжджі, кукурудзяний екстракт. Режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа протягом 20 – 30 хв.

Композиція Б: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , сечовина, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа протягом 40 хв.

4.4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2,5 м³

Аби отримати бажаний цільовий продукт, необхідною є підготовка 1,29 м³ поживного середовища. Склад композицій та умови їх стерилізації зберігаються із попередніх 2 стадій:

Композиція А: глюкоза, сухі дріжджі, кукурудзяний екстракт. Режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа протягом 20 – 30 хв.

Композиція Б: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , сечовина, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа протягом 40 хв.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ

Характеристика обладнання, використовуваного у виробництві вітаміну В₂ наведена у табл. 5.1, представлена у графічній частині проекту (апаратурна схема).

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу рибофлавіну

Позиція	Назва обладнання	Кількість	Характеристика апарату
1	2	3	4
РЗ-1	Реактор для приготування розчину «Taski Sani 4 in 1 Plus»	1	Одношаровий скляний реактор KORI DF-100L. Максимальна температура нагрівання до +200 °С. Мінімальна температура охолодження -120 °С. Швидкість обертання: 60-600 об/хв. Матеріал насадка заважки: нержавіюча сталь із покриттям з PTFE 12 мм. Потужність двигуна: 250 Вт. Розміри: 1000x930x2800 мм [63].
РЗ-2	Реактор для приготування розчину «Supra»		
РЗ-3	Реактор для приготування розчину «Септофану»		
ПЗ-4	Забірник повітря	1	Повітрязабірник. Виробник: «MAS SYSTEMS» (Україна). Робочий тиск: 8 – 1,6 МПа. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304 [64].
Ф-5	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр грубого очищення у сталевому корпусі GL-9. Ступінь фільтрації: 120 мікронів. Пропускна спроможність: 400 л/хв. Виробник: Україна [65].
К-6	Компресор	1	Турбокомпресор ID TURBO COMPRESSOR TRA-ТМ. Потужність двигуна: 210 – 600 кВт. Робочий надлишковий тиск: 2 – 11 бар. Продуктивність: 2470 – 6000 м ³ /год [66].

<i>НУХТ БТЕК 05.01.13 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>	<i>Рядищенко І. Ю.</i>			
<i>Керівник</i>	<i>Удимович Ю. М.</i>			
<i>Н. конто</i>				
<i>Консильт</i>				
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>			
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ				
		<i>Літера</i>	<i>Аркиш</i>	<i>Аркиші</i>
			47	1/3
<i>Кафедра БТМ</i>				

Продовження табл. 5.1

T-7	Теплообмінник-охолоджувач	1	Кожухотрубний охолоджувач. Виробник: ОПЭКС (TRANTER). Робочі температури (°C): -60...+400. Умовний тиск (МПа): 0.6; 1.0; 1.6; 2.5; 4.0. Матеріал труб і кожуха: нержавіюча сталь AISI 304 [67].
P-8	Ресивер	1	Ресивер Лідер РВ1900.1000.01. Виробник: «ЗЕО Лідер» (Україна). Максимальний робочий тиск: 10 бар. Робоча температура +5...+40 °C. Матеріал: нержавіюча сталь [68].
T-9	Теплообмінник-нагрівач	1	Кожухотрубний підігрівач. Виробник: ОПЭКС (TRANTER). Робочі температури (°C): -60...+400. Умовний тиск (МПа): 0.6; 1.0; 1.6; 2.5; 4.0. Матеріал труб і кожуха: нержавіюча сталь AISI 304 [69].
Ф-10	Фільтр головної очистки	1	Самоочисний фільтр F450. Робочий тиск: від 0,3 бар. Налаштований перепад тиску на сітці: 0,11 бар. Діаметр впускного патрубку: 80 Ду [70].
ІФ-11, ІФ-19, ІФ-29	Індивідуальні фільтри	3	Кишеньковий фільтр 592x490x600-8 клас очищення F9. Матеріал: високоякісні синтетичні волокна з 100% поліестеру. Розміри: 592x490x600 мм. Виробник: «АС ФІЛЬТР» (Україна) [71].
P3-12	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач СЕон 0,025. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою із 50 об/хв. Температура середовища від -20 до +250°C. Потужність двигуна: 0,75 кВт. Розміри: 520x450x600 мм [72].
P3-13	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Одношаровий скляний реактор JGR-5 л. Максимальна температура нагрівання до +200 °C. Мінімальна температура охолодження -120 °C. Швидкість обертання, об/хв 60-600. Матеріал насадка заважки: нержавіюча сталь із покриттям з PTFE 12 мм. Потужність двигуна: 90 Вт. Розміри: 420x350x450 мм [73].

Продовження табл. 5.1

I-14	Інокулятор	1	Інокулятор VLBIO 30SJ. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L. Потужність: 220Вт. Обладнаний сорочкою, датчиками температури, кислотності, кисню, мішалкою до 200 об/хв. Розміри: 1300x790x1700 мм [74].
Д-15, Д-21, Д-24, Д-27	Ваговий дозатор для подачі сипких компонентів	4	Ваговий дозатор ВДСВ-4. Точність дозування: 0,4%. Швидкість дозування: 20 кг за 10 сек. Потужність: 0,6 кВт. Межа дозування: 60 кг [75].
P3-16	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач SEon 0,16. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою із 50 об/хв. Температура середовища від -20 до +250°C. Потужність двигуна: 0,75 кВт. Розміри: 1040x930x2900 мм [72].
Н-17, Н-23, Н-26	Відцентровий насос для перекачування композиції компонентів поживного середовища	3	Насос Emaux ST020. Продуктивність: 3,5 м ³ /год, при 4 м. Вхідна потужність: 0,28 кВт. З'єднання: 1.5" (50мм). Напруга: 220 В (1 фаза) [76].
P3-18	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач SEon 0,04. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою із 50 об/хв. Температура середовища від -20 до +250°C. Потужність двигуна: 0,75 кВт. Розміри: 600x500x680 мм [72].
ПА-20	Посівний апарат	1	Посівний апарат VLBIO 250SC. Матеріал корпусу: нерж. сталь AISI 316L. Потужність: 380Вт. Обладнаний сорочкою, датчиками температури, кислотності, кисню, мішалкою до 200 об/хв. Розміри: 2000x1500x2800 мм [74].
P3-22	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 1,6 м ³ . Подвійна сорочка з нержавіючої сталі 2/3. Робочий тиск: 3 бар. Потужність: 1,1 кВт. Розміри: 1000x2200 мм [77].

Закінчення табл. 5.1

РЗ-25	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач СЕон 0,4. Обладнаний сорочкою, якірною мішалкою із 50 об/хв. Температура середовища від -20 до +250°C. Потужність двигуна: 0,75 кВт. Розміри: 1380x1380x2530 мм [72].
РЗ-28	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації підживлювального розчину	1	Реактор-змішувач об'ємом 400 л. Виробник: «Промвіт». Діапазон робочих температур: +99 - +133,5 °С. Частота обертів якірно-лопатевої мішалки: 250-500 об/хв. Матеріал: нерж. сталь AISI 304. Розміри: 1180x900x1780 мм [78].
ФР-30	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 2,5 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь 304; оснащений барботером, сорочкою, датчиками рН, рО ₂ , температури; пробовідбірником, манометром; турбінною мішалкою із частотою обертів до 320 об/хв; максимальний допустимий тиск: 6 бар; Розміри: 1910x2240x3500 мм. Виробник: «Mobius» [79].
Н-31	Відцентровий насос для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Насос Кс 32-150-2-С УХЛ4. Продуктивність: 32 м ³ /год. Частота обертів: 2900 об/хв [80].

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ

Загальна технологічна схема виробництва рибофлавіну *B. subtilis* КССМ 10445 містить допоміжні (ДР) та основні роботи (ТП). Стадії допоміжних робіт включають в себе: санітарну підготовку виробництва, підготовку стерильного аераційного повітря, підготовку титрувальних розчинів HCl та NaOH, приготування і стерилізацію підживлювального розчину глюкози, а також приготування та стерилізацію поживних середовищ. Підготовка посівного матеріалу і виробничий біосинтез належать до стадій власне технологічного процесу.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1 Приготування робочого розчину «Taski Sani 4 in 1 Plus»

Кількість робочого розчину «Taski Sani 4 in 1 Plus» концентрацією 2% становить 75 л. Даний об'єм розчину готують у реакторі-змішувачі (РЗ-1) об'ємом 100 л шляхом подавання відповідного концентрату у кількості 1500 мл та питної води об'ємом 73,5 л. Приготований робочий розчин далі охолоджують та використовують на наступних стадіях (Кх 1.1.1).

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину «Supra»

Об'єм робочого розчину «Supra» концентрацією 0,3% становить 60 л. Відповідну кількість розчину готують у реакторі-змішувачі (РЗ-2) об'ємом 100 л шляхом подавання відповідного концентрату у кількості 180 мл та питної води об'ємом 59,82 л. Отриманий розчин далі охолоджують та використовують на наступних стадіях (Кх 1.1.2).

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Рядишенко І. Ю.</i>						51	131
<i>Керівник</i>	<i>Удимавич Ю. М.</i>							
<i>Н. контр</i>						Кафедра БТМ		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

ДР 1.1.3. Приготування робочого розчину «Септофану»

Об'єм робочого розчину «Септофану» концентрацією 0,5% становить 80 л. Відповідну кількість розчину готують у реакторі-змішувачі (РЗ-3) об'ємом 100 л шляхом подавання відповідного концентрату у кількості 400 мл та питної води об'ємом 59,6 л. Одержаний таким чином розчин далі охолоджують та використовують на наступних стадіях допоміжних робіт (Кх 1.1.3).

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень

Такий тип прибирань, включаючи миття підлоги, здійснюється щодня за допомогою вологої техніки. Під час цього процесу із виробничих ділянок, лабораторних, побутових і службових приміщень видаляють готову продукцію, напівфабрикати, виробничі відходи і невикористані матеріали.

Крім того, проводиться мікробіологічний аналіз приміщення для контролю за чистотою. Метою цього аналізу є перевірка наявності мікроорганізмів в приміщенні, і вимога полягає в тому, щоб кількість мікроорганізмів не перевищувала 800 на кожному квадратному сантиметрі поверхні ($KУО < 800/см^2$). Ця процедура спрямована на забезпечення високого стандарту чистоти в приміщенні (Км 1.2.1).

ДР 1.2.2. Проведення генеральних прибирань виробничих приміщень

Відповідний тип прибирань проводять раз на місяць, включаючи миття стін, вікон і дверей, та використовуючи при цьому 0,5% робочий розчин «Септофану» (від ДР 1.1.3). Так само як і на попередній стадії, проводиться мікробіологічний аналіз приміщення для контролю чистоти. На такому етапі вимога полягає в тому, щоб кількість мікроорганізмів не перевищувала 300 на кожному квадратному сантиметрі поверхні ($KУО < 300/см^2$). Ця процедура спрямована на забезпечення високого стандарту чистоти в приміщенні і на підтримання безпеки (Км 1.2.2).

ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття технологічного обладнання

Для миття обладнання використовується робочі «Taski Sani 4 in 1 Plus» з концентрацією 2% (від ДР 1.1.1) та «Supra» концентрацією 0,3% (від ДР 1.1.2), яке попередньо підігрівають до температури 55°C. Миття обладнання проводиться автоматизовано за використання системи СІР-мийки, за використання мийних засобів у кількості 20% від геометричного об'єму обладнання. Обробка здійснюється протягом 15-20 хвилин, після чого обладнання промивають питною водою тим же автоматизованим способом (Кт 1.3.1).

ДР 1.3.2. Технічний огляд обладнання

Після завершення процедури миття та ополіскування обладнання здійснюють технічний огляд з метою виявлення можливих нещільностей в комунікаціях або запірній арматурі на обладнанні. У разі виявлення неущільнених ділянок, проводять підтягування різьбових з'єднань, щоб забезпечити їх правильне функціонування і запобігти витокам або іншим проблемам (Кт 1.3.2).

ДР 1.3.3. Перевірка обладнання на герметичність

Для перевірки герметичності ємнісного обладнання, спершу закривають всю запірну арматуру. Після цього подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Наступною дією є закриття вентиля подачі повітря. Показання манометра на кришці апарата та тривалість витримки (30-60 хвилин) фіксують у спеціальному операційному журналі. Апарат вважається герметичним, якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа. У випадку, якщо спостерігається більше падіння тиску, застосовують галогенові течієпошукачі для пошуку нещільностей та визначення місця їх розташування.

Для цього летку галогенвмісну речовину (шестифтористий сульфур (SF_6)) у невеликій кількості вносять до апарату, а після – закривають усю запірну арматуру. Згодом апарат нагрівають до температури 80°C, при цьому

одночасно збільшуючи тиск до 0,2 МПа. Пари галогеновмісної речовини проникають через можливі неущільнення та можуть бути виявлені при наближенні щупа течієпошукача до них. Тривалість операції становить 1,5-2 години. У разі виявлення нещільностей проводять підтягування різьбових з'єднань або здійснюють заміну ущільнюючої прокладки для усунення проблеми (Кт 1.3.3).

ДР 1.3.4. Стерилізація

Відповідну процедуру здійснюють протягом 1,5 годин, використовуючи гостру пару із температурою 110°C та тиском 0,2 МПа. Пару подають безпосередньо в апарат, а також до прилеглих комунікацій і сорочки. Для охолодження обладнання вода подається в сорочку. З метою компенсації падіння тиску в апарат подається стерильне повітря. Процес охолодження триває до досягнення температури 30-40°C та надлишкового тиску $P=0,003-0,005$ МПа і займає 0,5 години (Кт 1.3.4).

ДР 1.4. Підготовка персоналу

ДР 1.4.1 Навчання персоналу

Важливо, щоб весь персонал, включаючи людей, зайнятих складанням і технічним обслуговуванням, проходив систематичне навчання щодо правильного виробництва продукції в асептичних умовах, збереження гігієни та основ мікробіології. Це необхідно для забезпечення безпеки продукції і уникнення можливих забруднень та небажаної контамінації.

ДР 1.4.2. Санітарна підготовка персоналу

Персонал також проходить етапи миття та дезінфекції. Для миття рук персонал використовує господарське чи туалетне мило, а для дезінфекції – розчин етилового спирту з концентрацією 76%. Важливо дотримуватися правил гігієни і дезінфекції, щоб забезпечити безпеку виробництва та уникнути ризику контамінації продукції.

ДР 2. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 2.1 Забір аераційного повітря

Такий етап проводиться за використання вертикальної труби із повітрозабірником (ПЗ-4) на висоті 10 м, що є найвищою точкою у проектованому виробництві, і де розташовують обладнання для стиснення та очистки повітря (Кт 2.1).

ДР 2.2. Проходження повітря через фільтри грубої очистки

Далі повітря проходить через тканинні фільтри грубого очищення (Ф-5) задля його очистки від великих пилових частинок діаметром 50 мкм (Кт 2.2).

ДР 2.3. Компресування

У компресорі (К-6) проводять стиснення повітря до 0,4 МПа, при цьому підігрівуючи його до температури від 120 до 200 °С (Кт 2.3).

ДР 2.4. Подача повітря у теплообмінник-охолоджувач та видалення вологи

Далі повітря охолоджують до температури $20 \pm 1^\circ\text{C}$ у теплообміннику (Т-7), через що утворюється зайва волога, яку видаляють за допомогою ресивера (Р-8). Кінцева частка вологи повинна становити до 60 % (Кт 2.4).

ДР 2.5. Подача повітря на підігрів

З метою стабілізації показників повітря, а також зниження ризиків конденсації вологи на наступних стадіях, повітря нагрівають у теплообміннику (Т-9) до 30 – 35 °С (Кт 2.5).

ДР 2.6. Пропускання через головні фільтри очистки

Підігріте повітря направляють до набивних фільтрів головного очищення (Ф-10). Ступінь очищення на даному етапі досягає 95% (Кт 2.6).

ДР 2.7. Очищення шляхом проходження через індивідуальні фільтри

Далі повітря проходить кінцевий етап очищення шляхом його пропускання через індивідуальні фільтри (ІФ-11, ІФ-16, ІФ-29), які встановлені безпосередньо перед інокулятором (І-14), посівним апаратом (ПА-20) та ферментером (ФР-30). Ступінь очищення на відповідній стадії складає 99,999% (Кт, Км 2.7).

ДР 3. Підготовка титрувальних агентів

ДР 3.1. Підготовка 6%-го розчину HCl

ДР 3.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторах об'ємом 30 і 250 л

Для того, аби приготувати 280,3 мл 6%-го розчину HCl потрібно у колбу об'ємом 500 мл внести 234,8 мл води дистильованої за допомогою мірного циліндра на 500 мл і додати за допомогою мірного циліндра на 100 мл при постійному перемішуванні 45,5 мл 37%-го розчину соляної кислоти (Кх 3.1.1).

ДР 3.1.2. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у ферментері об'ємом 2,5 м³

Аби приготувати 2,58 л 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 5 л подають 2,16 л води дистильованої і додають за допомогою мірного циліндра на 500 мл при постійному перемішуванні 0,42 л 37%-го розчину соляної кислоти (Кх 3.1.2).

ДР 3.2. Підготовка 6%-го розчину NaOH

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в інокуляторах об'ємом 30 і 250 л

Для підготовки 280,3 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 16,84 г кристалічного їдкого натру. Отриману наважку вносять у колбу об'ємом 500 мл і за допомогою мірного циліндра на 500 мл подають 280,3 мл води дистильованої, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевим корком. Одержаний розчин стерилізують в автоклаві за 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Кх, Км 3.2.1).

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у ферментері об'ємом 2,5 м³

Для підготовки 2,58 л 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 155 г кристалічного їдкого натру. Отриману наважку вносять у колбу об'ємом 5 л і при постійному перемішуванні подають 2,58 л води

дистильованої. Одержаний розчин стерилізують у даному реакторі за 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Кх, Км 3.2.2).

ДР 4. Приготування і стерилізація підживлювального розчину

ДР 4.1. Приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози для виробничого біосинтезу

На ваговому дозаторі (Д-27) зважують 90 кг глюкози. Дану наважку переносять у реактор-змішувач об'ємом 400 л (РЗ-28), подають за допомогою лічильника 225 л питної води та вмикають перемішуючий пристрій. У сорочку реактора для кращого розчинення компонента, подають пару. Отриманий розчин стерилізують у реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Кх, Км 4.1).

ДР 5. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Узагальнені дані щодо розрахунку необхідних кількостей компонентів для приготування середовища з метою вирощування інокуляту у колбах на качалках наведено у *табл. 6.1*.

**Характеристика композицій для вирощування інокуляту у колбах
на качалках**

Складова поживного середовища	Концентрація, г/л	Маса для приготування 1200 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, мл
Глюкоза	40	48	А	800
Сухі дріжджі	20	24		
Кукурудзяний екстракт	5	6		
Вода		800		
Сечовина	6	7,2	Б	250
$\text{KН}_2\text{PО}_4$	1,5	1,8		
$\text{K}_2\text{НPО}_4$	3,5	4,2		
Вода		250		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,6	В	150
Вода		150		
Усього				1200

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 48 г глюкози, 24 г сухих дріжджів і 6 г кукурудзяного екстракту. Отримані наважки переносять у колбу об'ємом 2 л, додають за використання мірного циліндра на 1 л дистильовану воду об'ємом 800 мл, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 5.1.1).

ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 7,2 г сечовини, 1,8 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$ і 4,2 г K_2HPO_4 . Отримані наважки переносять у колбу об'ємом 500 мл, додають за використання мірного циліндра на 500 мл дистильовану воду об'ємом 250 мл, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км 5.1.2).

ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,6 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Одержану таким чином наважку переносять у колбу об'ємом 250 мл, додають за використання мірного циліндра на 250 мл дистильовану воду об'ємом 150 мл,

перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км 5.1.3).

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 30 л

Необхідно врахувати, що 10% (3 л) припадає на інокулят, а також 10 % складає конденсат, що утворюється при стерилізації поживного середовища у посівному апараті або реакторі-змішувачі.

Розраховані дані щодо необхідних кількостей компонентів для приготування середовища з метою вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 30 л наведено у *табл. 6.2*.

Таблиця 6.2

Характеристика композицій для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 30 л

Складова поживного середовища	Концентрація, г/л	Маса для приготування 13,13 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	40	525,2	А	10
Сухі дріжджі	20	262,6		
Кукурудзяний екстракт	5	65,65		
Вода		8,1		
Конденсат		1		
Сечовина	6	78,8	Б	3,13
KH ₂ PO ₄	1,5	19,7		
K ₂ HPO ₄	3,5	46		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	6,6		
Вода		2,7		
Конденсат		0,3		
Усього				13,13

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 525,2 г глюкози, 262,6 г сухих дріжджів і 65,65 г кукурудзяного екстракту. Отримані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 25 л (РЗ-12), додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 8,1 л та вмикають мішалку. Аби компоненти краще розчинилися, потрібно досягти температури у реакторі на рівні 40 °С, що досягається

шляхом подачі пари у сорочку. Одержаний розчин стерилізують у такому реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 5.2.1).

ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 78,8 г сечовини, 19,7 г KH_2PO_4 і 46 г K_2HPO_4 , 6,6 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Отримані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 5 л (РЗ-13), додають за допомогою лічильника воду питну об'ємом 2,7 л і вмикають мішалку. Аби компоненти краще розчинилися, потрібно досягти температури у реакторі на рівні 40 °С, що досягається шляхом подачі пари у сорочку. Одержаний розчин подають самоплином в інокулятор на 30 л (І-14), додають 6%-ий розчин HCl (від ДР 3.1.1) до рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км 5.2.2).

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 250 л

Необхідно врахувати, що 10% (25 л) припадає на інокулят, а також 10 % складає конденсат, що утворюється при стерилізації поживного середовища у посівному апараті або реакторі-змішувачі.

Розраховані дані щодо необхідних кількостей компонентів для приготування середовища з метою вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 250 л наведено у *табл. 6.3*.

Характеристика композицій для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 250 л

Складова поживного середовища	Концентрація, г/л	Маса для приготування 127 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	40	5,1	А	100
Сухі дріжджі	20	2,54		
Кукурудзяний екстракт	5	0,64		
Вода		82		
Конденсат		10		
Сечовина	6	0,76	Б	27
$\text{KН}_2\text{PО}_4$	1,5	0,19		
$\text{K}_2\text{НPО}_4$	3,5	0,44		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,064		
Вода		22,85		
Конденсат		2,7		
Усього				

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-15) зважують 5,1 кг глюкози, 2,54 кг сухих дріжджів і 640 г кукурудзяного екстракту. Отримані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 160 л (РЗ-16), додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 82 л та вмикають мішалку. Аби компоненти краще розчинилися, потрібно досягти температури у реакторі на рівні 40 °С, що досягається шляхом подачі пари у сорочку. Одержаний розчин стерилізують у такому реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв і після охолодження перекачують відцентровим насосом (Н-17) у посівний апарат (ПА-20) (Кт, Км 5.3.1).

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 760 г сечовини, 190 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$ і 440 г $\text{K}_2\text{НPО}_4$, а на технічних терезах 64 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Отримані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 40 л (РЗ-18), додають за допомогою лічильника воду питну об'ємом 22,85 л і вмикають мішалку. Аби компоненти краще розчинилися, потрібно досягти температури у реакторі на рівні 40 °С, що досягається шляхом подачі пари у сорочку. Одержаний

розчин подають самоплином у посівний апарат на 250 л (ПА-20), додають 6%-ий розчин HCl (від ДР 3.1.1) до рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км 5.3.2).

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2,5 м³

Необхідно врахувати, що 10% (250 л) припадає на інокулят, а також 10 % складає конденсат, що утворюється при стерилізації поживного середовища у ферментері або реакторі-змішувачі.

Розраховані дані щодо необхідних кількостей компонентів для приготування середовища з метою одержання рибофлавіну шляхом виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2,5 м³ наведено у табл. 6.4.

Таблиця 6.4

Характеристика композицій для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2,5 м³

Складова поживного середовища	Концентрація, г/л	Маса для приготування 1,29 м ³ середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції V, м ³
Глюкоза	40	51,6	А	1
Сухі дріжджі	20	25,8		
Кукурудзяний екстракт	5	6,45		
Вода		0,8		
Конденсат		0,1		
Сечовина	6	7,74	Б	0,29
КН ₂ РО ₄	1,5	1,94		
К ₂ НРО ₄	3,5	4,52		
МgSO ₄ · 7Н ₂ О	0,5	0,65		
Вода		0,25		
Конденсат		0,029		
Усього				1,29

ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-21) зважують 51,6 кг глюкози, 25,8 кг сухих дріжджів і 6,45 кг кукурудзяного екстракту. Отримані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 1,6 м³ (РЗ-22), додають за допомогою лічильника питну воду об'ємом 800 л та вмикають мішалку. Аби компоненти краще розчинилися, потрібно досягти температури у реакторі на рівні 40 °С, що

досягається шляхом подачі пари у сорочку. Одержаний розчин стерилізують у такому реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв і після охолодження перекачують віцентровим насосом (Н-23) до ферментера (ФР-30) (Кт, Км 5.4.1).

ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі (Д-24) зважують 7,74 кг сечовини, 1,94 кг $\text{KН}_2\text{PО}_4$ і 4,52 кг $\text{K}_2\text{НPО}_4$, 650 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Отримані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 0,4 м³ (РЗ-25), додають за допомогою лічильника воду питну об'ємом 250 л і вмикають мішалку. Аби компоненти краще розчинилися, потрібно досягти температури у реакторі на рівні 40 °С, що досягається шляхом подачі пари у сорочку. Одержаний розчин перекачують відцентровим насосом (Н-26) у ферментер об'ємом 2,5 м³ (ФР-30), додають 6%-ий розчин HCl (від ДР 3.1.2) до рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км 5.4.2).

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Зберігання колекційної культури *B. subtilis* КССМ 10445 здійснюють у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (трипто-казеїновий соєвий агар [51]). Щомісяця або 2 рази на місяць проводять пересіви на свіжоприготоване середовище. Під час робіт із такою колекційною культурою дотримуються правил асептики (Кт, Км 6.1).

ТП 6.2. Одержання робочої культури

Розсів колекційної культури *B. subtilis* КССМ 10445 від ТП 6.1 здійснюють на чашки Петрі із трипто-казеїновим соєвим агаром з метою отримання ізольованих колоній. Робочу культуру вирощують у термостаті за температури 30 °С (48 год) (Кт, Км 6.2).

ТП 6.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Із чашок Петрі одержані ізольовані колонії бактеріального продуцента від ТП 6.3 здійснюють пересів за допомогою петлі у пробірки зі скошеним

трипто-казеїновим соєвим агаром (для засіву 1 пробірки використовують 1 ізольовану колонію). Час вирощування інокуляту складає 48 годин, а температура – 30 °С. Для здійснення мікробіологічного контролю проводять відбір проби із пробірок кожні 4 год (Кт, Км 6.3).

ТП 6.4. Вирощування інокуляту у колбах на качалках

У стерильних умовах у колбу об'ємом 2 л із стерильною композицією А (від ДР 5.1.1) вносять стерильні композиції Б (від ДР 5.1.2) і В (від ДР 5.1.3), вносять по 15 мл еритроміцину та хлорамфенікола, перемішують та розливають по 100 мл у 10 попередньо простерилізованих качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку із попередньо одержаною робочою культурою (від ТП 6.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають готову бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Аби засіяти 1 колбу відбирають бактеріальну суспензію з 1 пробірки.

Процес вирощування проводять на качалках (200 об/хв) за температури 30 °С протягом 48 год. Після завершення даного терміну визначають концентрацію біомаси, що повинна складати 2,5 – 2,6 г/л і проводять мікробіологічний контроль, після якого культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л (Кт, Км 6.4).

ТП 6.5. Вирощування інкуляту у посівному апараті об'ємом 30 л

В інокулятор об'ємом 30 л (І-14) із простерилізованою композицією Б (від ДР 5.2.2) самоплином подають стерильну композицію А (від ДР 5.2.1), вносять по 150 мл еритроміцину і хлорамфеніколу, вмикають перемішувальний пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 3.2.1) за показником датчика рН 7,2-7,4. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 6.4). Вирощують за температури 37 °С і концентрації розчиненого кисню (20 – 30 % від насичення повітря) протягом 48 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 2,5 – 2,6 г/л (Кт, Км 6.5).

ТП 6.6. Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 250 л

У посівний апарат об'ємом 250 л (ПА-20) із простерилізованою композицією Б (від ДР 5.3.2) самоплином подають стерильну композицію А (від ДР 5.3.1), вносять по 1,5 л еритроміцину і хлорамфеніколу, вмикають перемішувальний пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 3.2.1) за показником датчика рН 7,2-7,4. Через трубу перетискування подають із попередньої стадії посівний матеріал (від ТП 6.5). Вирощують за температури 37 °С і концентрації розчиненого кисню (20 – 30 % від насичення повітря) протягом 48 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 2,5 – 2,6 г/л (Кт, Км 6.6).

ТП 7. Виробничий біосинтез

ТП 7.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2,5 м³

У ферментер об'ємом 2,5 м³ (ФР-30) із простерилізованою композицією Б (від ДР 5.4.2) відцентровим насосом (Н-23) перекачують стерильну композицію А (від ДР 5.4.1), вносять по 15 л еритроміцину і хлорамфеніколу, вмикають перемішувальний пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 3.2.2) за показником датчика рН 7,2-7,4. Через трубу перетискування подають із попередньої стадії інокулят (від ТП 6.6). Вирощують за температури 37 °С і концентрації розчиненого кисню (20 – 30 % від насичення повітря) протягом 90 год. Через кожні 10 год вносимо порцію підживлювального розчину глюкози концентрацією 7,5 г/л (від ДР 4.1).

Кожні 4 год та по завершенню біосинтезу із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та

визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 5,0 – 5,2 г/л, та концентрації рибофлавіну (26,6 – 26,8 г/л) (Кт, Км 7.1).

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ

Для здійснення контролю виробництва рибофлавіну протягом усього терміну культивування періодично (кожні 4 год), а також наприкінці процесу проводять відбір проб поживних середовищ, посівного матеріалу та культуральної рідини. Із відібраними пробами здійснюють мікробіологічний контроль, а також контроль показників росту і біосинтезу, а саме біомаси та рибофлавіну, рівня джерел амінного азоту (сечовина, кукурудзяний екстракт) і джерела вуглецю (глюкоза) у середовищі.

7.1. Мікробіологічний контроль

Як зазначалося раніше (див. підрозділ 4.1), вирощування бактеріального продуценту *B. subtilis* КССМ 10445 для одержання рибофлавіну здійснюється в асептичних умовах, потрібним є проведення мікробіологічного контролю на усіх етапах виробництва даного цільового продукту.

Чистоту культур мікроорганізмів, стерильність поживних середовищ і посівного матеріалу обов'язково перевіряють висівом на поживні середовища. Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) або картопляно-глюкозним агаром (КГА) – для виявлення дріжджів і грибів. Інкують при 37 °С (МПА) та при 24 – 26 °С (СА або КГА), протягом 24 годин [81].

Після вирощуванні у термостаті чашки візуально оглядають, тим самим перевіряючи наявність сторонньої мікрофлори. На чашках із висівами посівного матеріалу культуральної рідини повинні бути виявлені лише колонії бактеріального штаму *B. subtilis* КССМ 10445, а також повна відсутність сторонньої контамінації.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Рябишенко І. Ю.</i>						67	103
<i>Керівник</i>	<i>Удимович Ю. М.</i>							87
<i>Н. кантв</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Після вирощування *B. subtilis* поверхневим методом на трипто-казеїновому соєвому агарі спостерігають круглі, гладкі колонії кремового кольору (рис. 7.1).



Рис. 7.1. Колонії *Bacillus subtilis* на чашці із трипто-казеїновим соєвим агаром при 30 °С [82]

Оскільки тривалість отримання результатів методом висіву на щільні поживні середовища є достатньо великою, то чистоту культури здебільшого контролюють мікроскопіюванням. Для цього готують препарат фіксованих забарвлених клітин і розглядають його з імерсією.

За допомогою стерильної бактеріологічної петлі чи піпетки наносять на знежирене предметне скло краплю суспензії мікроорганізму. Матеріал рівномірно тонким шаром розподіляють на площі 1–2 см². Підсушують та фіксують. Після фіксації на мазок наносять 2–3 краплі метиленового синього на 2–3 хв. Потім препарат висушують на повітрі і промокають фільтрувальним папером та мікроскопіюють з імерсією [83]. Клітини *Bacillus subtilis* є паличкоподібними синього кольору, що мають довжину 2–6 мкм і діаметр менше 1 мкм [33].

7.2. Визначення концентрації джерела амінного азоту та карбону

Джерелом азоту у поживному середовищі виступають сечовина і кукурудзяний екстракт, а джерелом вуглецю є глюкоза.

Концентрацію сечовини та кукурудзяного екстракту пропонується визначати за використання методу Бредфорда, який є швидким (10 хвилин) і досить чутливим, заснованим на зміні максимуму поглинання з 465 до 595 нм барвника Coomassie Brilliant Blue G-250 із наступним зв'язуванням з денатурованими білками в розчині. Метод є відносно чутливим, з лінійним діапазоном 1–20 мкг для аналізованої проби 1 мл [84].

Для побудови стандартної кривої готують кілька розведень білкового стандарту від 0 до 20 мкг (0–20 мкл 1 мг/мл IgG) в кінцевому об'ємі 20 мкл деіонізованої води. У кожне з розведень додають 10 мкл буфера. Паралельно із приготуванням розчинів для стандартної кривої розводять три різні об'єми дослідного розчину зразка білка (наприклад, 2, 5 і 10 мкл) до кінцевого об'єму 10 мкл у буфері. Додають 20 мкл деіонізованої води до кожного розведення. Згодом додають 1 мл робочого реагенту Бредфорда до стандартів і зразків і ретельно перемішують на вортексі. Забарвлений розчин залишають принаймні на 5 хвилин при кімнатній температурі. Дослідні та стандартні зразки поміщають у спектрофотометр та аналізують за довжини хвилі 595 нм. За отриманими значеннями будують стандартну криву та визначають концентрацію азоту у дослідних зразках [84].

Для визначення рівню глюкози пробу культуральної рідини центрифугують при 10000 об/хв протягом 20 хв. До 1 мл одержаного супернатанту додають 3 мл ензимо-хромогенного реактиву.

Приготування ензимо-хромогенного реактиву: у мірну колбу на 100 мл поміщають 80-90 мл ацетатного буфера (0,25 моль/л, рН=4,8), в якому розчиняють 2 мг глюкозооксидази, а потім 1 мг пероксидази; додають 1 мл 1% розчину о-толідину в абсолютному спирті і доводять об'єм розчину ацетатним буфером до мітки.

Після додавання реактиву до дослідного зразку, отриману суміш перемішують і через 20 хвилин вимірюють її оптичну густину за довжини хвилі 625 нм. Як розчин порівняння використовують стандартний розчин глюкози. Згодом концентрацію глюкози визначають за формулою:

$$C_{\text{досл.}} = \frac{D_{\text{досл.}} \cdot C}{D_{\text{ст}}}$$

де $D_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби; $D_{\text{ст.}}$ – оптична густина розчину стандартного зразка глюкози; C – концентрація глюкози в розчині стандартного зразка [85].

7.3. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси пропонується визначати за показником оптичної густини культуральної рідини. Після чого, отриманий показник перераховують на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком.

Методика визначення концентрації біомаси. У пробірки вноситься проба по 1 мл культуральної рідини, а також додається 9 мл стерильної водопровідної води. Суміш збовтують, після чого вимірюють оптичну густина при довжині хвилі, яка становить 540 нм. Одержаний результат перераховують за калібрувальним графіком [86].

7.4. Визначення концентрації рибофлавіну

Для визначення концентрації цільового вітаміну пробу культуральної рідини (10 мл) спочатку екстрагували шляхом змішування із 10 об'ємами (100 мл) 0,05 М натрію гідроксиду. Після цього одержану суміш центрифугують при 8000 об/хв протягом 4 хв для видалення клітин та інших завислих речовин. Отриманий таким чином супернатант розбавляють 0,01 М оцтовим натрієм. Концентрацію рибофлавіну у такому розчині визначають шляхом вимірювання оптичної густини при 444 нм (A_{444}) за використання спектрофотометра [27]. Після цього здійснюють перерахунок на суху масу за використання калібрувального графіка.

Дані щодо проведення постадійного контролю виробництва рибофлавіну *Bacillus subtilis* КССМ 10445 наведено у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю виробництва рибофлавіну

Номер позиції (контрольної точки) та її назва	Об'єкт, обраний для контролю та показник	Засоби та методики контролю	Періодичність здійснення контролю та відбору аналізованих проб	Нормоване значення показника контрольованого об'єкту
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1 <i>Приготування робочого розчину «Taski Sani 4 in 1 Plus»</i>	Робочий розчин «Taski Sani 4 in 1 Plus» Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після приготування	C = 2%
Кх 1.1.2 <i>Приготування робочого розчину «Supra»</i>	Робочий розчин «Supra» Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після завершення процесу приготування	C = 0,3%
Кх 1.1.3 <i>Приготування робочого розчину «Септофану»</i>	Робочий розчин «Септофану» Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після приготування	C = 0,5%
Км 1.2.1 <i>Щоденне прибирання виробничих приміщень</i>	Підлога, апаратура Чистота	Огляд візуальний	Після закінчення прибирання	Відсутність пилу та бруду
Км 1.2.2 <i>Проведення генеральних прибирань виробничих приміщень</i>	Підлога, вікна, двері, стіни, апаратура Чистота	Огляд візуальний, мікробіологічний контроль	Після закінчення прибирання	Відсутність пилу, бруду, КУО < 500/см ²

Продовження табл. 7.1

Кт 1.3.1 <i>Миття технологічного обладнання</i>	Концентрація робочих розчинів Час та температура миття, чистота	Годинник, термометр, візуальний огляд	Час і температура безперервно під час процесу, чистота – після закінчення	$C = 2\%$, $C = 0,3\%$, $t = 55\text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 15 - 20$ хв, відсутність бруду
Кт 1.3.2 <i>Технічний огляд обладнання</i>	Апаратурні з'єднання Міцність	Візуальна перевірка	Перед початком перевірки на герметичність	Відсутність послаблень та ущільнень
Кт 1.3.3 <i>Перевірка обладнання на герметичність</i>	Обладнання Герметичність, час проведення процесу	Манометр, годинник	Тиск і час визначаються протягом процесу	$P = 0,1 - 0,2$ МПа, $\tau = 30 - 60$ хв
Кт 1.3.4 <i>Стерилізація</i>	Обладнання Температура, тиск і час	Манометр, термометр, годинник	Усі параметри під час процесу	$t = 110\text{ }^\circ\text{C}$, $P = 0,2$ МПа, $\tau = 30 - 60$ хв
Кт 2.1 <i>Забір аераційного повітря</i>	Повітрязабірник Висота забору	-	Під час процесу	$H = 10$ м
Кт 2.2 <i>Проходження повітря через фільтри грубої очистки</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після завершення етапу	$E = 90\%$
Кт 2.3 <i>Компресування</i>	Стиснене повітря Тиск, температура	Манометр, термометр	Після закінчення стиснення	$P = 0,35-0,5$ МПа, $t = 120-250\text{ }^\circ\text{C}$
Кт 2.4 <i>Подача повітря у теплообмінник-охолоджувач та видалення вологи</i>	Охолоджене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	$t = 25-35\text{ }^\circ\text{C}$, $W = 60\%$
Кт 2.5 <i>Подача повітря на підігрів</i>	Підігріте повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після підігріву	$t = 40-50\text{ }^\circ\text{C}$, $W = 50\%$
Кт 2.6 <i>Пропускання через головні фільтри очистки</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	$E = 95\%$

Продовження табл. 7.1

<p>Кт, Км 2.7 <i>Очищення шляхом проходження через індивідуальні фільтри</i></p>	<p>Очищене повітря Ступінь очищення, мікробіологічна чистота</p>	<p>Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль</p>	<p>Після проходження через індивідуальний фільтр</p>	<p>E = 99,999%, КУО < 1</p>
<p>Кх 3.1.1, 3.1.2 <i>Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення середовища в інокуляторах об'ємом 30 і 250 л та ферментері на 2,5 м³</i></p>	<p>Розчин соляної кислоти Концентрація</p>	<p>Фізико-хімічний метод</p>	<p>Після завершення приготування розчину</p>	<p>C = 6%</p>
<p>Кт, Кх, Км 3.2.1, 3.2.2 <i>Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлужнення середовища в інокуляторах об'ємом 30 і 250 л та ферментері об'ємом 2,5 м³</i></p>	<p>Розчин натрію гідроксиду Тиск, час, концентрація, асептичність</p>	<p>Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, C = 6%, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Кх, Км 4.1.1 <i>Приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози для виробничого біосинтезу</i></p>	<p>Підживлювальний розчин глюкози Тиск, температура, час, концентрація, стерильність</p>	<p>Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °C τ = 30 хв, C = 40%, відсутність мікробіоти</p>

Продовження табл. 7.1

<p>Кт, Км 5.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i></p>	<p>Композиція В Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.2.1, 5.3.2 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для вирощування у посівних апаратах об'ємом 30 і 250 л</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °C τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>

Продовження табл. 7.1

<p>Кт, Км 5.2.2, 5.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °C τ = 40 хв, рН = 4,0 – 4,5, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для виробничого біосинтезу об'ємом 2,5 м³</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °C τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.4.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, датчик температури, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначають безперервно, а визначення концентрації та здійснення мікробіологічного контролю після завершення стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °C τ = 40 хв, рН = 4,0 – 4,5, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 6.1 <i>Підтримання колекційної культури</i></p>	<p>Колекційна культура <i>Bacillus subtilis</i> КССМ 10445 температура, час, мікробіологічна чистота</p>	<p>Холодильник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці</p>	<p>t = 2 – 4 °C, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Продовження табл. 7.1

Кт, Км 6.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>Bacillus subtilis</i> КССМ 10445 на чашках Петрі температура, час, мікробіологічна чистота	Термостат, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль	t = 30 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 <i>Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах</i>	Робоча культура <i>Bacillus subtilis</i> КССМ 10445 у пробірках температура, час, мікробіологічна чистота	Термостат, мікробіологічний контроль	Температура контролюється під час вирощування безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль	t = 30 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4 <i>Вирощування інокуляту у колбах на качалках</i>	Посівний матеріал температура, час, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, спектрофотометр, мікробіологічний контроль	Температура і частота обертів контролюється під час вирощування продуцента безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль та визначення концентрації біомаси	t = 30 °С, τ = 48 год, w = 200 об/хв, Сб = 2,5 – 2,6 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.5, 6.6 <i>Вирощування інокуляту у посівних апаратах об'ємом 30 і 250 л</i>	Посівний матеріал температура, час, рН, частота обертів мішалки, частота розчиненого кисню, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Датчик температури, рО ₂ і рН, годинник, тахометр, ротаметр, спектрофотометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, концентрація кисню і частота обертів мішалки контролюється під час вирощування продуцента безперервно, а після вирощування – мікробіологічний контроль (також кожні 4 год) та визначення концентрації біомаси	t = 37 °С, τ = 48 год, рН = 7,2 – 7,4, рО ₂ = 20 – 30%, w = 200 об/хв, Сб = 2,5 – 2,6 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 7.1

<p>Кт, Км 7.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2,5 м³</i></p>	<p>Культуральна рідина температура, час, рН, частота обертів мішалки, частота розчиненого кисню, концентрація біомаси і рибофлавіну, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури, рО₂ і рН, годинник, тахометр, ротаметр, центрифуга, спектрофотометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, концентрація кисню і частота обертів мішалки контролюється під час вирощування продуцента безперервно, а після вирощування і кожні 4 год – мікробіологічний контроль та визначення концентрації біомаси та рибофлавіну</p>	<p>t = 37 °С, τ = 90 год, рН = 7,2 – 7,4, рО₂ = 20 – 30%, w = 200 об/хв, Сб = 5,0 – 5,2 г/л, Ср = 26,6 – 26,8 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
---	---	---	---	---

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва рибофлавіну щодо можливих місць емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Виробничий процес рибофлавіну за використання бактерій *Bacillus subtilis* КССМ 10445 включає в себе такі доферментаційні етапи:

- 1) санітарна підготовка виробництва;
- 2) приготування і стерилізація розчинів кислотного і лужного титрувальних агентів;
- 3) приготування і стерилізація складових поживних середовищ з метою вирощування посівного матеріалу;
- 4) підготовка компонентів поживного середовища для виробничого біосинтезу рибофлавіну.

Також технологія передбачає наявність етапів ферментаційних робіт, а саме:

- 1) підготовку посівного матеріалу;
- 2) виробничий біосинтез рибофлавіну.

Узагальнені дані щодо місць утворення різних видів відходів на даних етапах представлено у табл. 8.1.

Таблиця 8.1

Загальні місця емісії відходів протягом виробництва рибофлавіну

Етап та процеси, на яких можливе утворення відходів		Характеристика утворюваних відходів в залежності від їх типу	
<i>Доферментаційні процеси</i>	санітарна підготовка виробництва	Під час регулярного та загального прибирання приміщень використовують різні засоби для миття та дезінфекції, такі як «Септофан», «Taski Sani 4 in 1 Plus», «Supra». Миття резервуарів обладнання здійснюється за допомогою системи СІР-мийки з використанням мийного засобу «Taski Sani 4 in 1 Plus». Використані мийні та дезінфекційні розчини, а також промивна вода, відводяться у каналізаційну систему. Також на відповідному етапі утворюються тверді відходи – пластикові тари з-під таких засобів, що відправляються на сортування та вторинну переробку.	

<i>НУХТ БТЕК 05.01.13 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>	<i>Рядищенко І. Ю.</i>			
<i>Керівник</i>	<i>Удимонович Ю. М.</i>			
<i>Н. контр.</i>				
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>			
<i>РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</i>				
		<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
			78	118
<i>Кафедра БТМ</i>				

	приготування і стерилізація розчинів кислотного і лужного титрувальних агентів	На цьому етапі передбачено приготування 6%-го розчину соляної кислоти та приготування та стерилізацію 6%-го розчину натрію гідроксиду. Розчин соляної кислоти використовується для підкислення середовища (з показником рН 4,0-4,5) у посівних апаратах перед його стерилізацією, в той час як розчин натрію гідроксиду використовується для підлужнення середовища (з показником рН 6,8-7,0) під час отримання посівного матеріалу в інокуляторах. Це необхідно для того, щоб забезпечити нейтральне значення рН (7,0) під час проходження процесу ферментації [26]. У даному етапі виробництва рідкі відходи утворюються лише у випадку, якщо титрувальні розчини не відповідають нормативним показникам і рівню асептики. Тому відходи від титрувальних агентів не враховуються у загальному об'ємі рідких відходів.
	приготування і стерилізація складових поживних середовищ з метою вирощування посівного матеріалу	На даному етапі можлива невідповідність сировини нормативним показникам. У такому випадку виконується відбракування цієї сировини. У результаті відбракування відходи можуть включати різні види пакувальних матеріалів та сировини, які не відповідають встановленим стандартам для приготування поживних середовищ (твердий тип відходів).
	підготовка компонентів поживного середовища для виробничого біосинтезу рибофлавіну	
Ферментаційні процеси	підготовка посівного матеріалу	Оскільки продуцент рибофлавіну – <i>B. subtilis</i> КССМ 10445, є факультативно аеробною бактерією [50], виникає необхідність у постійному подачі стерильного повітря під час процесу біосинтезу. Таким чином, при культивуванні цього мікроорганізму утворюються значні обсяги відпрацьованого повітря. Цей етап представляє собою місце викидів газоповітряних відходів. Відходи від посівного матеріалу не враховуються, оскільки при отриманні інокуляту в посівних апаратах він безпосередньо направляється до виробничого ферментера. Основна мета виробничого біосинтезу полягає в отриманні культуральної рідини, в якій головним компонентом є водорозчинний вітамін рибофлавін. Після ферментера культуральна рідина подається до спеціального збірника, тому рідкі відходи на цьому етапі не враховуються.
	виробничий біосинтез рибофлавіну	

8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Процес виробництва рибофлавіну проходить протягом 40 трудоднів. Задля здійснення санітарної підготовки такого виробництва, щодня проводять миття підлоги, а саме 40 разів. Також необхідно врахувати генеральні прибирання, що здійснюються 1 раз на місяць, тобто близько 2 разів. Обладнання обробляють розчинами Taski Sani 4 in 1 Plus (2%) та Supra (0,3%), кількості робочих розчинів за весь період виробництва яких складають 75 та 60 л відповідно. Для обробки стін, підлоги, вікон та дверей використовують робочі розчини Септофану (0,5%), кількість за весь період виробництва якого складає 80 л.

Таблиця 8.2

Характеристика утворюваних рідких відходів виробництва рибофлавіну

Рідкі відходи	Складові відповідного типу відходів	Приблизний об'єм утворюваних відходів за 1 цикл, л	Клас небезпеки
2% розчин Taski Sani 4 in 1 Plus	Поверхнево-активні речовини (ПАР)	75	IV
0,3% розчин Supra	ПАР і комплексоутворюючі речовини	60	IV
0,5% розчин Септофану	алкілдиметилбензиламоній хлорид (ЧАС), дидецилдиметиламоній хлорид (ЧАС), діоктилдиметиламоній хлорид, полігексаметиленгуанідин гідрохлорид (ПГМГ ГХ), 2-пропанол, вода демінералізована	80	II
	Усього:	215	

Для очищення такого об'єму відходів пропонується використання біофільтру установки «Каскад» - 1, що розміщено у верхній частині кожної окремої споруди на решітці (настилу) - 2, на якій встановлені блоки - 3 біологічної очистки води, яка надходить по трубопроводу - 4. Скид очищеної води здійснюється через сифони - 5, подача стисненого повітря при промивці (регенерації) заповнення біофільтра - 1 по трубопроводу - 6. Відстоювання

води відбувається у відстійній зоні - 7 під біофільтром - 1, збір осаду в конусних зонах - 8, періодичний скид мулу і спорожнення біофільтра - 1 від води по трубопроводах - 9.

Біофільтр - 1 працює так: стічна вода в споруду надходить по трубопроводу - 4, затоплюючи зону біофільтрування - 1, заповнену блоками - 3. При досягненні рівнем води верху сифона - 5, він автоматично починає скид води із зони відстоювання - 7, через що рівень води в зоні біофільтра - 1 знижується у всіх блоках - 3 через вертикальні пустоти. Замість води у пустоти заповнення - 3 втягується повітря зверху над біофільтром - 1. При досягненні рівня води кінця сифона - 5, його робота зупиняється через гідравлічний розрив потоку води в ньому [87].

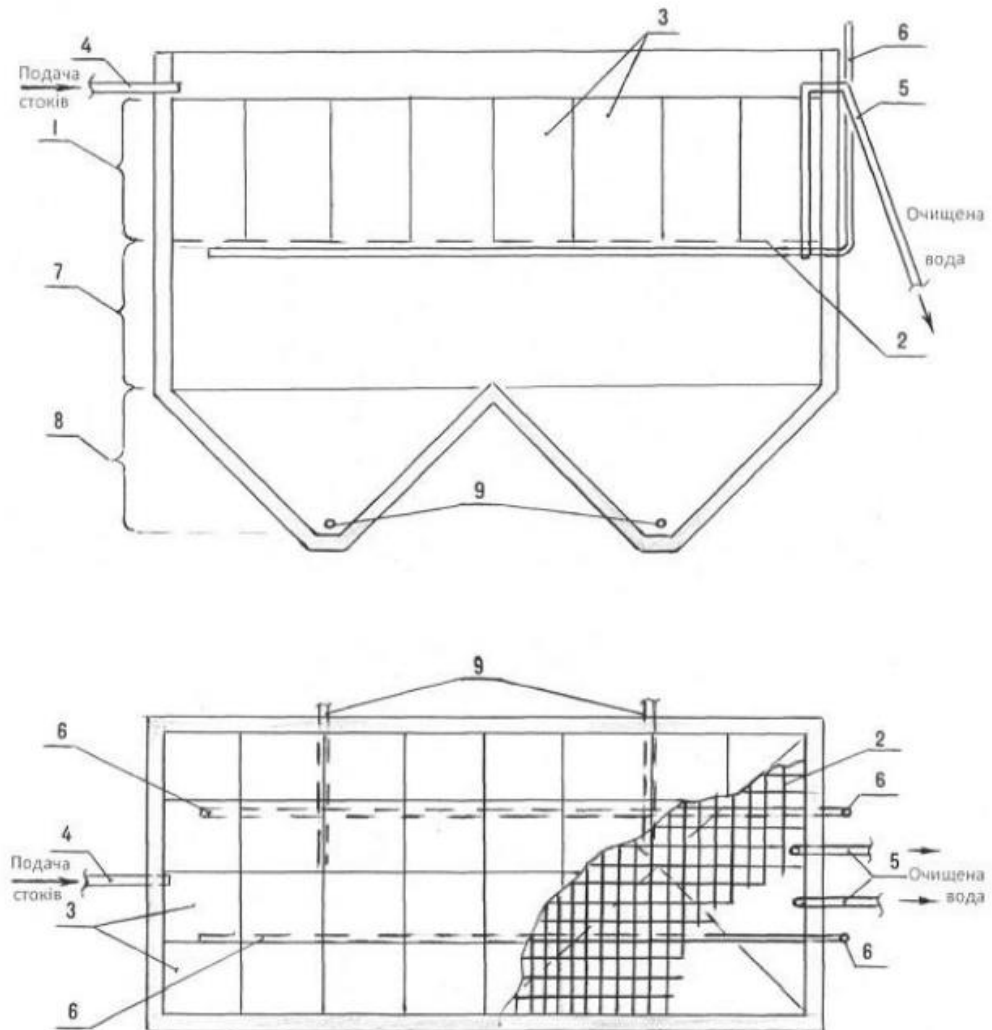


Рис. 8.1. Зображення установки «Каскад» [87]

Оскільки вода в споруду продовжуватиме надходити по трубопроводу - 4, рівень води в біофільтрі - 1 почне знов підніматись і, досягнувши верху сифона - 5, знову його запусить. Таким чином, конструкція споруди забезпечує режим циклічного наповнення - спорожнення біофільтрувальної зони в залежності від надходження води по трубопроводу - 4. Через це, на великій поверхні заповнення біофільтра - 1 виростає біоплівка, яка вбирає з води розчинені забруднення, чим зменшує концентрацію їх у воді, тобто її очищає. Відмерла біоплівка у вигляді згустків мулу розміром у кілька мм водою виноситься у відстійну частину - 7, осідає і накопичується в конусній частині - 8. Осілий мул один раз на добу персонал скидатиме по трубопроводу - 9 на мулові майданчики або в мулонакопичувачі установки "Каскад".

Для покращення промивки (регенерації) заповнення - 3, персонал періодично (1 раз на місяць) продуватиме біофільтр - 1 стисним повітрям через дірчаті трубопроводи - 6 від стаціонарного або пересувного компресора. Бульбашки повітря, проходячи через вертикальні пустоти блоків - 3 заповнення прочищатимуть їх, чим збільшуватиметься ефект очищення води. Після тривалої експлуатації Біофільтра виникатиме необхідність капітальної регенерації його через суцільне забивання пустот в блоках - 3. У верхніх частинах блоків - 3 накопичується дрібне сміття, склеєне біоплівкою. Тому потрібно виконувати періодично радикальну промивку блоків - 3 всього біофільтра - 1 (1-2 рази на рік). Для цього споруду через муловий трубопровід - 9 потрібно спорожнювати від води нижче решіток - 2, а заповнення біофільтра - 1 висушувати з 2 причин:

- для зменшення в кілька разів ваги блоків – 3;
- висохла біоплівка в кілька разів зменшується в об'ємі і при наступному розмоканні легко відстає від поверхні пластика і змивається водою з пустот блоків - 3.

Сухі легкі блоки - 3 персонал перевертатиме на 180° відносно горизонтальної решітки - 2 і споруда знов вмикатиметься в роботу. При

цьому забруднення, які були зверху блоків - 3, опиняться внизу і змиватимуться в мулову зону - 8. Осілий мул з конусів мулової зони - 8 періодично (1 раз на добу) персонал скидатиме на переробку по трубопроводу – 9 [87].

8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

У процесі виробництва рибофлавіну також утворюється частина і твердих відходів. Це відбувається на етапах приготування робочих розчинів мийно-дезінфікуючих засобів, підготовки поживних середовищ, шляхом утворення деякої кількості пакувальних тар. Миючі та дезінфікувальні засоби зберігаються зазвичай у тарах, що являють собою каністри із поліпропілену, який можна далі піддавати вторинній переробці. До складу пакувальних матеріалів компонентів поживних середовищ зазвичай, окрім поліпропілену, входять поліетилен, полівінілхлорид, які неможливо переробляти у купі з іншими типами пластикових матеріалів.

Таблиця 8.3

Характеристика твердих відходів виробництва рибофлавіну

Тверді відходи	Компоненти пакувальних матеріалів	Приблизний об'єм утворених відходів за 1 цикл, кг	Клас безпеки
Тара із пластикових матеріалів для зберігання мийних засобів	Поліпропілен	0,8	IV
Пакування компонентів поживного середовища	Поліпропілен, полівінілхлорид, поліетилен	0,3	IV
	Усього:	1,1	

Для відновлення матеріальних ресурсів, пов'язаних із пакувальними тарами мийних і дезінфікуючих засобів, а також компонентами поживного середовища, вони піддаються попередньому сортуванню. Після цього ці матеріали відправляються до спеціалізованих пунктів прийому вторинної сировини для подальшої утилізації та використання у вторинних процесах.

8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Оскільки біотехнологічне виробництво рибофлавіну потребує підготовки стерильного аераційного повітря, то у процесі біосинтезу буде утворюватися деякий об'єм газоподібних відходів, до складу яких входять вуглекислий газ та аерозольні частки. Така частина відходів утворюється протягом етапів підготовки посівного матеріалу та власне біосинтезу водорозчинного вітаміну. Час вирощування посівного матеріалу становить 96 год (5760 хв), а тривалість виробничого біосинтезу – 90 год (5400 хв). Подача стерильного повітря здійснюється безперервним шляхом зі швидкістю 1 л / л КР · хв. Виробниче приміщення оснащено 1 інокулятором об'ємом 30 л, 1 посівним апаратом на 250 л та 1 ферментером об'ємом 2,5 м³. Отже, у процесі виробництва рибофлавіну утворюється близько: $30 \cdot 2880 + 250 \cdot 2880 + 2500 \cdot 5400 = 86\,400 + 625\,000 + 13\,500\,000 = 14\,211\,400$ л (14 211,4 м³) відпрацьованого повітря.

Очищення такого об'єму відпрацьованого повітря пропонується проводити за використання U-подібного очищувача-зволожувача повітря. Повітряний потік нагнітається в один кінець вертикально розташованої повітропровідної U-подібної труби (1), уздовж вертикальних стінок якої вбудовані водяні форсунки (2), форсунки створюють всередині труби плоскі і широкі водяні струмені поперек потоку повітря, таким чином створюючи водяну завісу, форсунки розташовані уздовж вертикальних стінок U-труби один навпроти одного зі зміщенням, таким чином, щоб потік водяного струменя однієї форсунки був направлений в область між двома розташованими навпроти форсунками (але таке розташування форсунок не є принциповим).

Повітряний потік, проходячи через щільну водяну завісу ефективно очищається і зволожується, перед вихідною частиною U-труби в середині розташована решітка з хвилеподібних пластин (3), на яких затримується краплеподібна волога і стікає в нижню точку U-труби, так само як вода, розбризкана форсунками, стікає в нижню точку U-труби, в якій

розташований зливний отвір з патрубком (4), який веде в буферний бачок (5), з бачка вода забирається насосом (6) і подається у водяний самопромивний фільтр (7), далі вода через патрубки і колектори (8) надходить знову в форсунки, по мірі випаровування води відбувається автоматичний долив за допомогою поплавкового клапана (9), який вбудований у буферному бачку і живиться від водопроводу (10), так само у верхній частині буферного бачка розташований переливний отвір з патрубком (11), який веде в каналізацію, і в нижній частині бачка розташований зливний отвір з патрубком (12), який також веде в каналізацію і оснащений клапаном (13), до зливного патрубка приєднаний всмоктувач водяного насоса, а зливний клапан призначений для примусового зливу води з буферного бачка під час обслуговування пристрою [88].

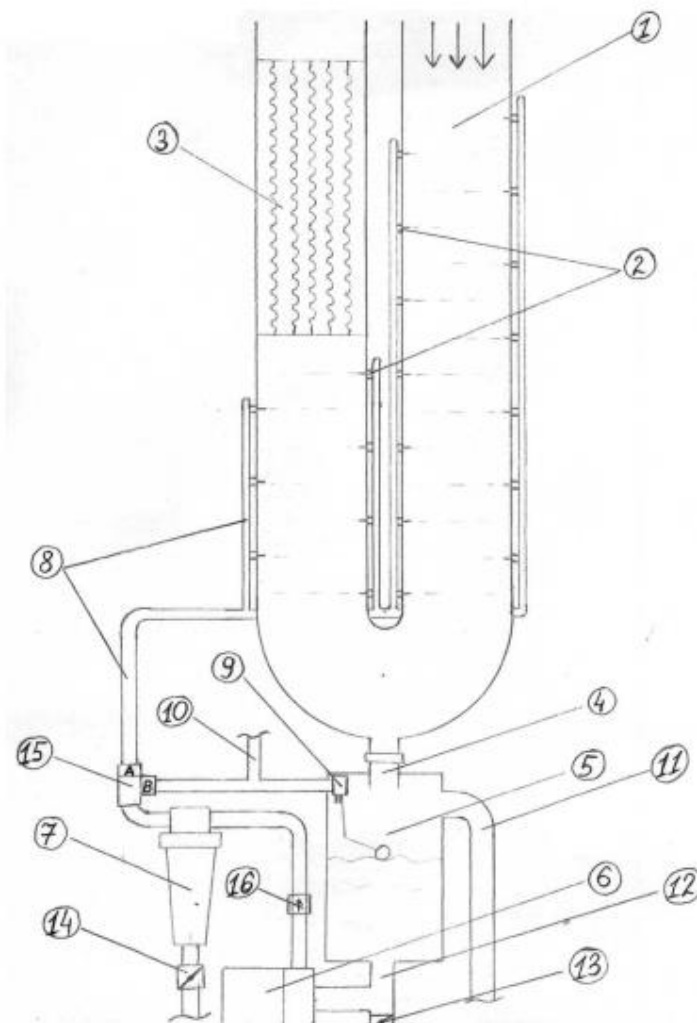


Рис. 8.2. Зображення U-подібного очищувача-зволожувача повітря [88]

Для періодичного автоматичного промивання водяного фільтра (7) в процесі роботи пристрою, він оснащений електроклапаном (14), підключеним до каналізації, і підведенням водопровідної води (10) з 3-и зонним електроклапаном (15), в патрубку між насосом і водяним фільтром вбудований зворотний клапан (16). Клапани призначені для забезпечення промивання водяного фільтра і поновлення води в пристрої, клапани спрацьовують або автоматично, або ручним перемиканням за допомогою панелі управління і електроніки (умовно не показані). Промивання фільтра і оновлення води в пристрої відбувається наступним чином; клапан (14) відкривається, насос кілька секунд продовжує працювати, далі насос зупиняється і клапан (15) одночасно відкриває канал (B) і закриває канал (A), відбувається промивка фільтра проточною водою, через деякий час клапани переключаються в початкове положення, тобто клапан (14) закритий, клапан (15) перекриває канал (B) і відкриває канал (A) [88].

Список використаної літератури

1. Mikkelsen K., Apostolopoulos V. B Vitamins and Ageing. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science*. 2018, 451 – 470. doi: 10.1007/978-981-13-2835-0_15.
2. Auclair O., Han Y., Burgos S. A. Consumption of Milk and Alternatives and Their Contribution to Nutrient Intakes among Canadian Adults: Evidence from the 2015 Canadian Community Health Survey—Nutrition. *Nutrients*. 2019, 11 (8): 1948. doi: 10.3390/nu11081948.
3. Mosegaard S., Dipace G., Bross P., Carlsen J., Gregersen N., Olsen R. K. J. Riboflavin Deficiency — Implications for General Human Health and Inborn Errors of Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21 (11): 3847. doi: 10.3390/ijms21113847.
4. Riboflavin Deficiency. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.msmanuals.com/home/disorders-of-nutrition/vitamins/riboflavin-deficiency>.

РОЗДІЛ 1

5. Schwechheimer S. K., Park E. Y., Revuelta J. L., Becker J., Wittmann C. Biotechnology of riboflavin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100 (5): 2107 – 2119. doi: 10.1007/s00253-015-7256-z.
6. Suwannasom N., Kao I., Pruß A., Georgieva R., Bäuml H. Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(3): 950. doi: 10.3390/ijms21030950.
7. Revuelta J. L., Ledesma-Amaro R., Lozano-Martinez P., Díaz-Fernández D., Buey R. M., Jiménez A. Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2016, 44 (4-5): 659 – 665. doi: 10.1007/s10295-016-1842-7.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.13 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркиш</i>	<i>Аркушів</i>	
<i>Розробник</i>	<i>Рядишенко І. Ю.</i>						<i>87</i>	<i>187</i>	
<i>Керівник</i>	<i>Удимович Ю. М.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>			
<i>Н. контр</i>									
<i>Консульт</i>									
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>								

8. You J., Pan X., Yang C., Du Y., Osire T., Yang T., Rao, Z. Microbial production of riboflavin: Biotechnological advances and perspectives. *Metabolic Engineering*. 2021, 68: 46 – 58. doi: 10.1016/j.ymben.2021.08.009.
9. Thakur K., Tomar S. K., De S. Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microbial Biotechnology*. 2015, 9 (4): 441 – 451. doi: 10.1111/1751-7915.12335.
10. Levit R., Savoy de Giori G., Moreno de LeBlanc A., LeBlanc J. G. Recent update on lactic acid bacteria producing riboflavin and folates: application for food fortification and treatment of intestinal inflammation. *Journal of Applied Microbiology*. 2020, 130 (5): 1412 – 1424. doi: 10.1111/jam.14854.
11. Riboflavin. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/493570>.
12. Ionita G., Matei I. Application of Riboflavin Photochemical Properties in Hydrogel Synthesis. *Biophysical Chemistry - Advance Applications*. 2019, 1 – 14. doi: 10.5772/intechopen.88855.
13. Вітамін В2 (Vitamin B2). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/273578/>.
14. Riboflavin. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Riboflavin-HealthProfessional/#en3>.
15. Thakur K., Tomar S. K., Singh A. K., Mandal S., Arora, S. Riboflavin and health: A review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016, 57(17): 3650 – 3660. doi: 10.1080/10408398.2016.1145104.
16. Udhayabanu T., Manole A., Rajeshwari M., Varalakshmi P., Houlden H., Ashokkumar B. Riboflavin Responsive Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Clinical Medicine*. 2017, 6 (5): 52. doi: 10.3390/jcm6050052.
17. Riboflavin – Vitamin B2. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/riboflavin-vitamin-b2/>.
18. Farah N., Chin V. K., Chong P. P., Lim W. F., Lim C. W., Basir R., Lee T. Y. Riboflavin as a promising antimicrobial agent? A multi-perspective review.

- Current Research in Microbial Sciences*. 2022, 3: 100111. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100111.
19. Seiler T. G., Fischinger I., Senfft T., Schmidinger G., Seiler T. Intrastromal Application of Riboflavin for Corneal Crosslinking. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014, 55 (7): 4261. doi: 10.1167/iovs.14-14021.
20. Von Martels J. Z. H., Bourgonje A. R., Klaassen M. A. Y., Alkhalifah H. A. A., Sadaghian Sadabad M., Vich Vila A., Dijkstra G. Riboflavin supplementation in patients with Crohn's disease (RISE-UP study). *Journal of Crohn's and Colitis*. 2019, 14 (5): 595 – 607.. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz208.
21. Yin Y., Wang J., Xu X., Zhou B., Chen S., Qin T., Peng D. Riboflavin as a mucosal adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccines*. 2021, 9 (11): 1296. doi: 10.3390/vaccines9111296.
22. Riboflavins. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://iacmcolor.org/color-profile/riboflavin/>.
23. Wang Y., Liu L., Jin Z., Zhang D. Microbial cell factories for green production of vitamins. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021, 9: 661562. doi: 10.3389/fbioe.2021.661562.
24. Taniguchi H., Wendisch V. F. Exploring the role of sigma factor gene expression on production by *Corynebacterium glutamicum*: sigma factor H and FMN as example. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00740.
25. Wang X., Wang Q., Qi, Q. Identification of riboflavin: revealing different metabolic characteristics between *Escherichia coli* BL21(DE3) and MG1655. *FEMS Microbiology Letters*. 2015, 362 (11). doi: 10.1093/femsle/fnv071.
26. Lee K. H., Park Y. H., Han J. K., Park J. H., Lee K. H., Choi H. (2007). U.S. Patent No. 7,166,456. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
27. Wu Q.-L., Chen T., Gan Y., Chen X., Zhao X.-M. Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 76 (4): 783 – 794. doi: 10.1007/s00253-007-1049-y.

28. Park E. Y., Ito Y., Nariyama M., Sugimoto T., Lies D., Kato T. The improvement of riboflavin production in *Ashbya gossypii* via disparity mutagenesis and DNA microarray analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 91 (5): 1315 – 1326. doi: 10.1007/s00253-011-3325-0.
29. Dmytruk K., Lyzak O., Yatsyshyn V., Kluz M., Sibirny V., Puchalski C., Sibirny A. Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production. *Journal of Biotechnology*. 2014, 172: 11 – 17. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.12.005.
30. Bai Y. Q., Xin X. L., Lai Y. Z., Zhang X. C., Zhang G. J., Liu J. F., Xin Y. P. Isolation and screening of *Bacillus subtilis*. *J. Anim. Sci. & Vet. Med.* 2013, 32: 24 – 31.
31. *Bacillus Subtilis*. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://biologydictionary.net/bacillus-subtilis/>.
32. Härtig E., Jahn D. Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus subtilis*. *Advances in Bacterial Respiratory Physiology*. 2012, 195 – 216. doi: 10.1016/B978-0-12-394423-8.00005-6.
33. Errington J., van der Aart L. T. Microbe profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*. 2020, 166 (5): 425. doi: 10.1099/mic.0.000922.
34. Lu Z., Guo W., Liu C. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2018, 80 (3): 427 – 433. doi: 10.1292/jvms.16-0572.
35. *Bacillus subtilis*. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://bacdive.dsmz.de/strain/1172>.
36. *Bacillus subtilis*. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1423&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
37. Wolak N., Zawrotniak M., Gogol M., Kozik A., Rapala-Kozik M. Vitamins B1, B2, B3 and B9–occurrence, biosynthesis pathways and functions in human

nutrition. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2017, 17 (12): 1075-1111. doi: 10.2174/1389557516666160725095729.

38. Riboflavin Deficiency. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470460/>.

39. Benefits and sources of vitamin B2. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/219561>.

40. Декамевіт таблетки, в/плів. обол. №20 (10x2). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%94%D0%B5%D0%BA%D0%B0%D0%BC%D0%B5%D0%B2%D0%B8%D1%82/6879/>.

41. Елевіт пронаталь таблетки, в/плів. обол. №100 (10x10). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%B2%D0%B8%D1%82>

=

[%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D1%82%D0%B0%D0%BB%D1%8C/3073/](https://tabletki.ua/uk/%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D1%82%D0%B0%D0%BB%D1%8C/3073/).

42. Неуробекс нео капсули №60 (10x6). [Електронний ресурс] – режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%9D%D0%B5%D1%83%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%B5%D0%BA%D1%81-%D0%BD%D0%B5%D0%BE/6368/>.

43. Заклади охорони здоров'я та захворюваність населення України у 2017 році. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf.

44. Державний реєстр лікарських засобів України. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%F0%E8%E1EE%F4%EB%E0%E2%B3%ED>.

45. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Bacillus subtilis subsp. subtilis* 168. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00010.

46. Citrate cycle (TCA cycle) - *Bacillus subtilis subsp. subtilis* 168. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/bsu00020>.
47. Pentose phosphate pathway - *Bacillus subtilis subsp. subtilis* 168. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/bsu00030>.
48. Purine metabolism - *Bacillus subtilis subsp. subtilis* 168. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/bsu00230>.
49. Riboflavin metabolism - *Bacillus subtilis subsp. subtilis* 168. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/bsu00740>.
50. *Bacillus subtilis* Marburg is a mesophilic human pathogen that produces antibiotic compounds. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bacdive.dsmz.de/strain/1172>.
51. Mobius® Bioreactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.merckmillipore.com/INTL/en/Mobius-Single-Use-Manufacturing/Mobius-Single-Use-Bioreactors/N76b.qB.fW0AAAFZmkxiYtcY.nav>.
52. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
53. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.
54. Головей О. П. , Гуляев В. М. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О. П., Гуляев В. М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.
55. Гігієнічні вимоги до мийних засобів. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://medbib.in.ua/gigienicheskie-trebovaniya-moyuschim.html>.
56. Taski Sani 4 in 1 Plus. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://lysoform.ua/products/taski-sani-4-in-1-plus/>.

57. ЛУЖНИЙ БЕЗПІННИЙ МІЮЧИЙ ЗАСІБ, SUPRA Б/П, 12 КГ. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://primaterra.ua/ua/p222467489-schelochnoe-bespennoe-moyuschee.html>.
58. Засіб миючий, лужний, безпінний 12 л SUPRA Б/П PRIMATERRA. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://cicada.in.ua/zasib-miyuchij,-luzhnyj,-bezpinnij-12-l-supra-b-p-primaterra?gad=1&gclid=CjwKCAjw7c2pBhAZEiwA88pOF99efbU7QkngUWrSNE-dvr7zX1-Xf-V iXWRphB0cvk9vu23LD6G1RoC2eAQA vD BwE>.
59. Засіб для швидкої дезінфекції ГРІН ЛАЙН УЛЬТРА. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://solnex.com.ua/products/zasib-dlya-shvidkoi-dezinfektsii-grin-lajn-ultra-5-l>.
60. Грінлайн ультра. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://ukrsandez.com.ua/product/hrynlajn-ultra/#:~:text=%E2%80%9C%D0%93%D1%80%D1%96%D0%BD%20%D0%9B%D0%B0%D0%B9%D0%BD%20%D0%A3%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D0%B0%E2%80%9D%20%E2%80%93%20%D1%86%D0%B5,C%20%D1%96%20%D0%92%D0%86%D0%9B\)%20%D1%96%20%D0%B3%D1%80%D0%B8%D0%B1%D0%BA%D1%96%D0%B2](https://ukrsandez.com.ua/product/hrynlajn-ultra/#:~:text=%E2%80%9C%D0%93%D1%80%D1%96%D0%BD%20%D0%9B%D0%B0%D0%B9%D0%BD%20%D0%A3%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D0%B0%E2%80%9D%20%E2%80%93%20%D1%86%D0%B5,C%20%D1%96%20%D0%92%D0%86%D0%9B)%20%D1%96%20%D0%B3%D1%80%D0%B8%D0%B1%D0%BA%D1%96%D0%B2).
61. Дескоцид преміум клінік. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://lysoform.ua/products/deskocid-premium-klinik-1l/#:~:text=%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B9%20%D0%B7%D0%B0%D1%81%D1%96%D0%B1%20%D0%B4%D0%BB%D1%8F%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%97%2C%20%D0%B4%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D1%96%D0%B7%D0%B0%D1%86%D1%96%D0%B9%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE,%2D10%2C0%25%3B%20%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%B0>.
62. Інструкція із застосування засобу "СЕПТОФАН (SEPTOFAN®)" з метою дезінфекції та достерилізаційного очищення. Київ, 2015.

63. Одношаровий скляний реактор KORİ DF-100L, з підігрівом. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ukrchemgroup.com/ua/p1459170553-odnoslojnyj-steklyannyj-reaktor.html>.
64. Повітрозбірник вертикальний для стисненого повітря та промислових газів. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kyiv.prom.ua/p1907900268-vozduhosbornik-resiver-vertikalnyj.html?&primelead=NC4z>.
65. Фільтр грубого очищення у сталевому корпусі, 120 мікронів. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://petroline.ua/filtr-hruboho-ochyshchennia-u-stalevomu-korpusi-120-mikroniv/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=iw / pmax / ua / feed asset filtr chechik rashodometr 0704&utm_term=&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw4vKpBhCZARIsAOKHoWSFjqHrIWSmy3rNKYTHj1TtzrbxuAsuYSay7UCmWThylbVsSKEGsosaAoz7EALw_wcB.
66. Турбокомпресори ID TURBO COMPRESSOR серії TRA-ТМ (2-11 бар, 41-82 м³/хв). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-tra-tm/>.
67. Кожухотрубні охолоджувачі. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-oxolodzhuвачi/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cpc&utm_campaign=Sales_Performance_Max&gclid=Cj0KCQjw4vKpBhCZARIsAOKHoWSQvfVKPWNuA6KnqvbRxB1UZgNYmzrHSdnT3c8L2WmdlIR8-15nv70aAvr9EALw_wcB.
68. Ресивер Повітряний Лідер 10 бар 1900 к. с. РВ1900.1000.01 для компресора. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyj-lider-10-bar-1900-l-rv1900100001-dlya-kompressora/?utm_source=cpc_tusk&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw4vKpBhC

ZARIsAOKHoWS_F_taqQCZKZfZRuJyIRVdbkss9yaxvrs5WtIGRoO-RWVwwXgdiZIaAhj8EALw_wcB.

69. Кожухотрубні підігрівачі. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-pidigrivachi/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cpc&utm_campaign=Sales_Performance_Max&gclid=Cj0KCQjw4vKpBhCZARIsAOKHoWSx52rZNzcQbP6zuPkralmjfPqO6OH6i-k6Y5wp24DJrZAN0akjceQaAq-pEALw_wcB.](https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-pidigrivachi/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cpc&utm_campaign=Sales_Performance_Max&gclid=Cj0KCQjw4vKpBhCZARIsAOKHoWSx52rZNzcQbP6zuPkralmjfPqO6OH6i-k6Y5wp24DJrZAN0akjceQaAq-pEALw_wcB)

70. Самоочистний фільтр F450. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://opeks.ua/ua/samoochistnij-filtr-f450/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cpc&utm_campaign=Sales_Performance_Max&gclid=Cj0KCQjw4vKpBhCZARIsAOKHoWTnlFBA15ZwdZC9e8upDoW9qUsVsSCwmVZ-MoBL0YZHw-VtEQImn6kaAqrHEALw_wcB.](https://opeks.ua/ua/samoochistnij-filtr-f450/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cpc&utm_campaign=Sales_Performance_Max&gclid=Cj0KCQjw4vKpBhCZARIsAOKHoWTnlFBA15ZwdZC9e8upDoW9qUsVsSCwmVZ-MoBL0YZHw-VtEQImn6kaAqrHEALw_wcB)

71. Кишеньковий фільтр ФЯК F9 592x490x600-8. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://asfilter.com.ua/ua/catalog/karmannye-filtry/karmannyy-filtr-592kh490kh600-8-f9/.](https://asfilter.com.ua/ua/catalog/karmannye-filtry/karmannyy-filtr-592kh490kh600-8-f9/)

72. Апарати сталі емальовані з механічним змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php.](https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php)

73. СКЛЯНИЙ ХІМІЧНИЙ РЕАКТОР НА 5 Л С СОРОЧКОЮ. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://ukrchemgroup.com/ua/p1387839012-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html.](https://ukrchemgroup.com/ua/p1387839012-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html)

74. CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf.](https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf)

75. Ваговий дозатор 1-60 кг ВДСВ-4. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://kyiv.prom.ua/ua/p1160563245-vesovoj-dozator-dlya.html?&primelead=My42.](https://kyiv.prom.ua/ua/p1160563245-vesovoj-dozator-dlya.html?&primelead=My42)

76. Насос Emaux ST020. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://aquapolis.ua/ua/nasos-emaux-st020.html?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw4vKpBhCZARIsAOKHoWQekg3_o wo9Keig28pz8x91jAW22cH_GZHKlvYdOmbvXp5TlxGiHOwaAnbBEALw_wc B.
77. CICS – РЕАКТОР 1600L. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.osertech.eu/en/product/cics-1600l-reactor/>.
78. Реактор 400 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://promvit.com.ua/rekonstrukciya-bu-reaktora-400-l/>.
79. Mobius® Single-Use Bioreactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.merckmillipore.com/INTL/en/Mobius-Single-Use-Manufacturing/Mobius-Single-Use-Bioreactors/N76b.qB.fW0AAAFZmkxiYtcY.nav>.
80. Конденсатні насоси Кс, КсП. [Електронний ресурс] – режим доступу: http://www.cmz.sumy.ua/03_ua.html.
81. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
82. PP0282 – Tryptone Soya Agar (Irradiated). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.eolabs.com/product/pp0282-tryptone-soya-agar-irradiated/>.
83. Пирог Т. П., Антонюк М. М., Ігнатенко С. В. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т. П. Пирог, М. М. Антонюк, С. В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.
84. Kielkopf C. L., Bauer W., Urbatsch I. L. Methods for Measuring the Concentrations of Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020 (4): pdb.top102277. doi: 10.1101/pdb.top102277.

85. Gonchar M. V. Sensitive method for quantitative determination of hydrogen peroxide and oxidase substrates in biological samples. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*. 1998, 70: 157 – 163.
86. Пляцук Л. Д., Черниш Є. Ю. Екологічна біотехнологія: принципи створення біотехнологічних виробництв : навчальний посібник / Л. Д. Пляцук, Є. Ю. Черниш. – Суми : Сумський державний університет, 2018. – 293 с.
87. Патент України на корисну модель № 86309. Біофільтр установки "Каскад" / Бражник В. І., Бражник І. В., Бражник Ю. В. Опубл. 25.12.2013, Бюл. № 24.
88. Патент України на корисну модель 119673. U-подібний очищувач-зволожувач повітря / Сапуга Р. О., Мікітась В. В. Опубл. 10.10.2017, Бюл. № 19.

ДОДАТКИ

Додаток 1

66456

5 / 6

125%

phase was 1 ml/min. The injection amount of samples was 15 µl, and distilled water for sample dilution were used. In addition, UV detector (TSP UV2000, UV 260 nm) was used as a detector.

According to the test results, mutants which grew on 70 mg/l of thiaproline-containing media exhibited excellent riboflavin productivity. Among them, one mutant with the

culture was inoculated onto a fermentation medium in a flask and shaking culture was performed at 200 rpm and 37° C. for 90 hours. The fermentation medium was prepared by sterilizing a medium FA and a medium FS under pressure in the same manner as in the preparation of the seed medium and distributing 15 ml of the medium FA and 5 ml of the medium FS into a 250 ml shaking culture flask that was

US 7,166,456 B2

7

pre-sterilized under pressure. When the fermentation was completed, the concentration of riboflavin accumulated in the fermentation culture was measured in the same manner as in Example 1. Each composition of the seed medium and fermentation medium as used in this example are presented in Table 3.

TABLE 3

Compositions of media for fermentation in flask	
Medium	Composition
Seed medium	5 g/l of yeast extract, 10 g/l of tryptone, 10 g/l of sodium chloride, No adjustment to pH
Fermentation medium	Medium FA: 100 g/l of glucose, 20 g/l of dry yeast, 0.5 g/l of magnesium sulfate 7-hydrate medium FS: 1.5 g/l of monopotassium phosphate, 3.5 g/l of dipotassium phosphate, 6 g/l of urea, 10 mg/l of erythromycin, 10 mg/l of chloramphenicol pH: 7.2 to 7.4

8

TABLE 4

Compositions of media for culture in 5-liter fermenter	
Medium	Composition
Seed medium	30 g/l of molasses (50%, based on glucose), 15 g/l of corn steep liquor, 0.5 g/l of magnesium sulfate 7-hydrate, 5 g/l of ammonium sulfate, 1.5 g/l of monopotassium phosphate, 3.5 g/l of dipotassium phosphate, 10 mg/l of erythromycin, 10 mg/l of chloramphenicol, pH 7.4
Fermentation medium	Medium FA: 20 g/l of dry yeast, 5 g/l of corn steep liquor, 2 g/l of ammonium sulfate, 0.5 g/l of magnesium sulfate 7-hydrate, 17.5 g/l of monopotassium phosphate, 7.5 g/l of dipotassium phosphate, 5 mg/l of erythromycin, 10 mg/l of chloramphenicol, pH 7.2-7.4 Supplement medium: 620 g/l of glucose, 26.7 g/l of dry yeast, 26.7 g/l of corn steep liquor

According to the test results, the *Bacillus subtilis* AS5 as the parent strain produced 22.4 g/l of riboflavin. On the other

Активация Windows
Чтобы активировать Windows, зайдите в меню «Параметры».

