

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «УДОСКОНАЛЕННЯ ВИРОБНИЦТВА ДІЄТИЧНОЇ
ДОБАВКИ НА ОСНОВІ РИБОФЛАВІНУ»**

Виконав : здобувачка вищої освіти групи 162БТ620(3,10з)-01а
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
Анастасія МИХАЙЛОВСЬКА

Керівник: Завідувачка кафедри біотехнології, д.фарм.н,
професор Наталя ХОХЛЕНКОВА

Рецензент: Професор кафедри промислової технології ліків та
косметичних засобів, д.фарм.н, професор Інна КОВАЛЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота присвячена вдосконаленню виробництва дієтичної добавки на основі рибофлавіну. У дослідженні розроблено ефективну технологію біосинтезу рибофлавіну з використанням штаму *Bacillus subtilis* IFBG NTG2. Проведено аналіз ринку рибофлавіну, вивчено біохімічні та технологічні особливості процесу його виробництва, а також розроблено біологічну, технологічну, апаратурну схеми, придатні для впровадження у виробничих умовах. Результати роботи дозволяють підвищити вихід рибофлавіну, мінімізувати виробничі витрати та зменшити екологічний вплив процесу. Загальний обсяг роботи становить 63 сторінки, містить 10 рисунків, 9 таблиць та 2 креслення формату А1.

Ключові слова: рибофлавін, *Bacillus subtilis*, дієтична добавка, біотехнологія, ферментація.

ANNOTATION

The qualification work is devoted to improving the production of a dietary supplement based on riboflavin. The study developed an effective technology for the biosynthesis of riboflavin using the *Bacillus subtilis* IFBG NTG2 strain. The analysis of the riboflavin market was conducted, the biochemical and technological features of its production process were studied, and a biological, technological, and hardware scheme suitable for implementation in production conditions was developed. The results of the work allow to increase the yield of riboflavin, minimize production costs and reduce the environmental impact of the process. The total volume of the work is 63 pages, contains 10 figures, 9 tables and 2 A1 format drawings.

Keywords: riboflavin, *Bacillus subtilis*, dietary supplement, biotechnology, fermentation.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Аналітичний огляд.....	5
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	20
2.1 Характеристика готового продукту.....	20
2.2 Характеристика біологічного об'єкту.....	21
2.3 Біосинтез цільового продукту.....	26
3 Технологічна частина.....	32
3.1 Розрахунок матеріального балансу.....	32
3.2 Розрахунок і вибір обладнання	38
3.3 Опис технологічного процесу.....	45
3.4 Схеми виробництва (зі специфікацією обладнання).....	50
3.5 Критичні параметри виробництва.....	56
3.6 Екологічні аспекти виробництва.....	58
Висновок.....	62
Список використаної літератури.....	64
Додатки.....	68

					162.01.12.00 000 ПЗ							
Змн..	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата								
Розробив	Михайловська				Удосконалення виробництва дієтичної добавки на основі рибофлавіну Пояснювальна записка			Літ.	Арк.	Аркушів		
Перевірив	Хохленкова									2	64	
.								НФаУ Кафедра біотехнології				
Н. контр.												
Затвердив	Хохленкова Н.В.											

ВСТУП

Актуальність теми. Рибофлавін є незамінним вітаміном групи В, що відіграє ключову роль у багатьох метаболічних процесах. Зростаючий попит на дієтичні добавки на його основі, особливо в фармацевтичній, харчовій та ветеринарній галузях, обумовлює необхідність розробки ефективних технологій його виробництва. На сьогодні промисловість орієнтується на біотехнологічні методи синтезу, які є екологічно безпечними та економічно вигідними. Удосконалення процесу біосинтезу рибофлавіну в умовах українського виробництва сприятиме зниженню імпортозалежності та забезпеченню потреб у високоякісній продукції.

Мета роботи полягає в удосконаленні виробництва комплексної дієтичної добавки на основі рибофлавіну за рахунок впровадження у виробництво мікробного синтезу на основі вітчизняного мутантного штаму *Bacillus subtilis*, з подальшим виробництвом лінійки вітамінних препаратів на його основі та постачанні іншим підприємствам.

Для досягнення мети були визначені завдання:

Провести аналіз ринку дієтичних добавок на основі рибофлавіну.

Вивчити біохімічні особливості синтезу рибофлавіну мікроорганізмами.

На основі оптимальних умов культивування штаму *Bacillus subtilis IFBG NTG2* для підвищення виходу рибофлавіну розробити технологію виробництва рибофлавіну.

Розрахувати та підібрати обладнання для проведення стадій вирощування продуцента.

Охарактеризувати критичні точки виробництва рибовлавіна за розробленою технологією на стадіях вирощування продуцента.

Розробити схеми виробництва дієтичної добавки.

Проаналізувати потенційні екологічні ризики виробництва рибофлавіну

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						3
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

мікробним синтезом та запропонувати заходи по їх мінімізації.

Об'єктом роботи є субстанція рибофлавіну, отримана мікробним синтезом, для виробництва дієтичних добавок вітчизняним підприємством.

Предметом роботи є біотехнології виробництва рибофлавіну на основі продуценту штаму *Bacillus subtilis IFBG NTG2*.

Методи – аналітичні, порівняльні, розрахункові, графічні.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблена технологія біосинтезу рибофлавіну дозволяє ефективно впровадити виробництво дієтичних добавок на його основі у промислових умовах вітчизняного виробника. Оптимізований процес забезпечує: зниження виробничих витрат за рахунок раціонального використання сировини та енергії, екологічну безпеку через зменшення кількості шкідливих відходів, задоволення попиту українських споживачів у високоякісних дієтичних добавках за доступною ціною.

Результати роботи можуть бути використані на фармацевтичних підприємствах для організації повного циклу виробництва рибофлавіну як субстанції та готової продукції.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						4
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

1.1 Характеристика галузей застосування рибофлавіну

Рибофлавін, або вітамін В2, відіграє вирішальну роль у підтримці здоров'я організму, оскільки він є єдиним попередником для генерації біологічних коферментів флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) і флавінмононуклеотиду (ФМН) (рис. 1.1), а ФАД і ФМН беруть участь у численних ферментативних реакціях і відіграють ключову метаболічну роль у біологічних окисно-відновних реакціях, опосередковуючи перенесення електронів (рис. 1.2). Ці коферменти відіграють важливу роль у виробництві енергії; клітинній функції, росту і розвитку, метаболізм жирів, перетворенні лікарських речовин і стероїдів. Перетворення амінокислоти триптофану в ніацин (іноді його називають вітаміном В3) вимагає ФАД. Подібним чином перетворення вітаміну В6 на коензим піридоксаль 5'-фосфат потребує ФМН. Крім того, рибофлавін допомагає підтримувати нормальний рівень гомоцистеїну, амінокислоти в крові.

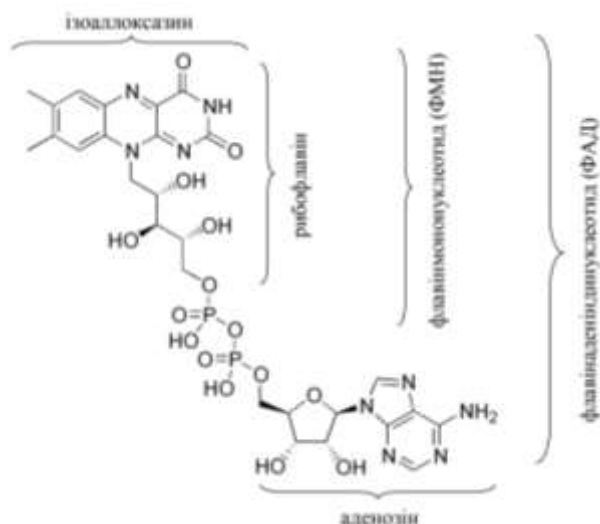


Рис. 1.1 – Хімічні структури рибофлавіну та коферментів флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) і флавінмононуклеотиду (ФМН)
(Джерело: Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill, Поліщук В. Ю., 2018)

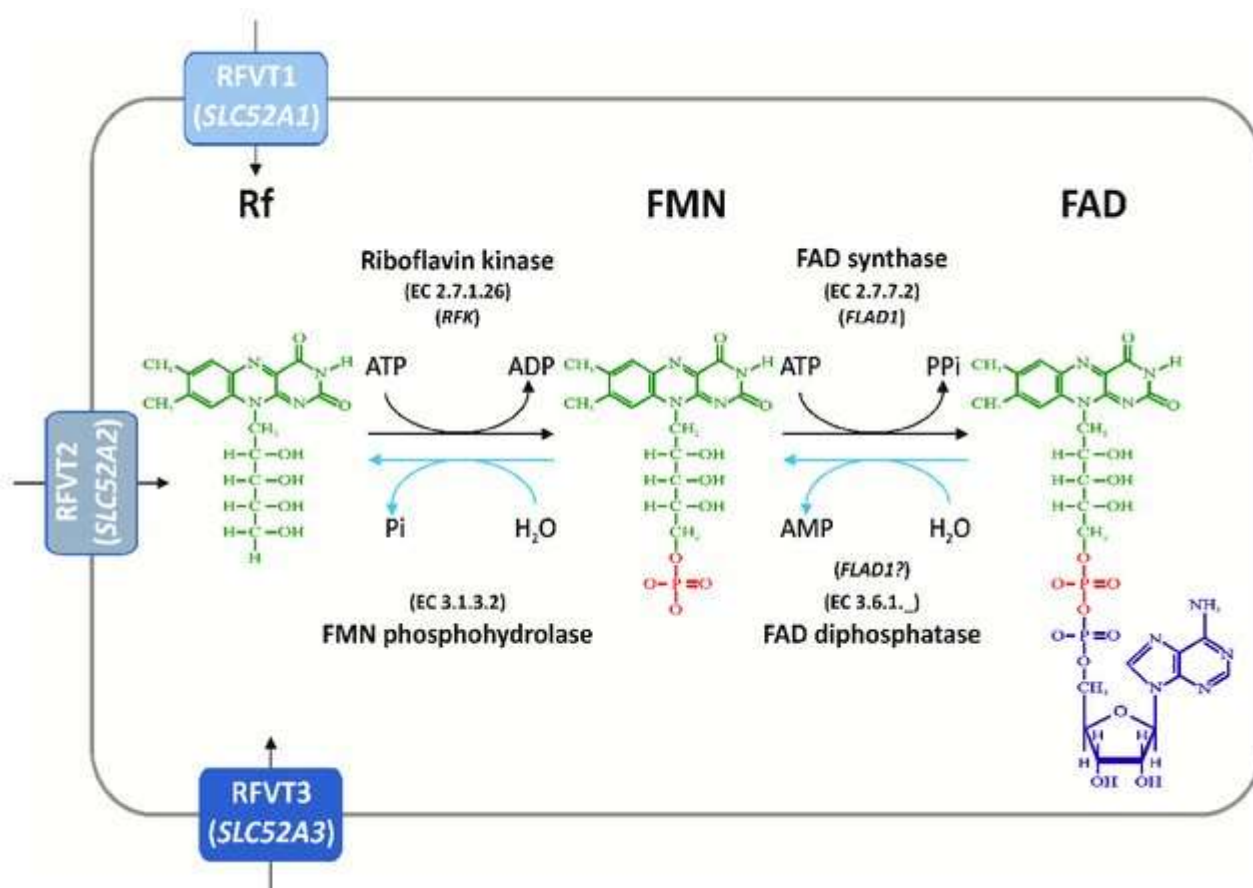


Рис. 1.2 - Хімічні структури та метаболічне перетворення рибофлавіну (Rf) і флавінових кофакторів у людини (FMN та FAD)

(Джерело: Development of Novel Experimental Models to Study Flavoproteome Alterations in Human Neuromuscular Diseases: The Effect of Rf Therapy, M. Tolomeo et al., 2020)

Рибофлавін не синтезується організмом людини, і його зберігання обмежене *in vivo*. Рибофлавін природним чином присутній у деяких харчових продуктах, і людина отримує його саме з їжі. Більше 90% харчового рибофлавіну знаходиться у формі ФАД або ФМН; решта 10% складається з вільної форми та глікозидів або складних ефірів. Більшість рибофлавіну всмоктується в проксимальному відділі тонкої кишки. Організм поглинає мало рибофлавіну з разових доз біля 27 мг і зберігає лише невелику кількість рибофлавіну в печінці, серці та нирках. При споживанні надмірних кількостей вони або не засвоюються, або невелика кількість, інша - виводиться з сечею.

Метаболізм рибофлавіну в організмі людини наведено на рис. 1.3.

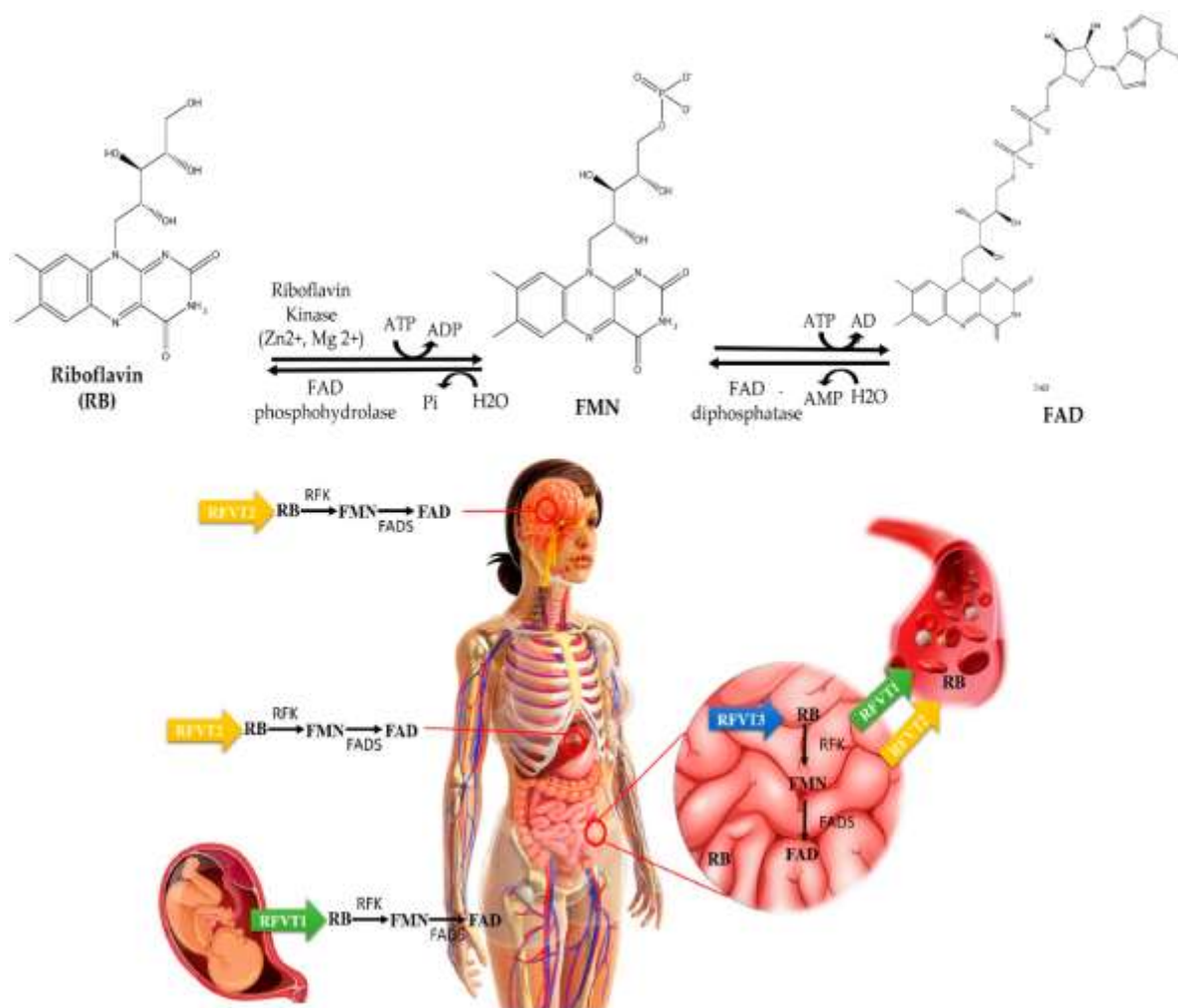


Рис. 1.3 - Метаболізм і поглинання рибофлавіну

Шлунково-кишкова система в першу чергу поглинає рибофлавін (RB) за допомогою транспортера рибофлавіну 3 (RFVT3). Після всмоктування клітини ШКТ можуть метаболізувати рибофлавін двома шляхами. Рибофлавінкіназа (RFK) може перетворювати його у флавінмононуклеотид (FMN), а FAD-синтаза (FADS) може перетворювати його у флавінаденіндинуклеотид (FAD). Крім того, рибофлавін може надходити в кров через білок-переносник рибофлавіну-1 (RCP1), транспортер 1 (RFVT1) і транспортер рибофлавіну 2 (RFVT2). Кровоносна система транспортує рибофлавін до клітин-мішеней. Кровообіг матері транспортує рибофлавін до кровотоку плода за допомогою RFVT1, який експресується в шлунково-кишковій системі та плаценті. RFVT2 повсюдно експресується по всьому тілу і має значну експресію в мозку та ендокринних органах, включаючи підшлункову залозу. Він також присутній у печінці та м'язовій тканині. Рибофлавін використовується в клітинах-мішенях безпосередньо або шляхом перетворення в кофактори FMN або FAD для кількох біологічних процесів (Джерело: Revitalising Riboflavin: Unveiling Its Timeless Significance in Human Physiology and Health, M. Ângela Aragão et al, 2024)

Бактерії в товстому кишечнику виробляють вільний рибофлавін, який може засвоюватися товстим кишечником у кількостях, які залежать від

раціону харчування. Більше рибофлавіну виробляється після споживання рослинної їжі, ніж м'ясної. Завдяки фізіологічній значимості та функціональності рибофлавін має широкий спектр застосування у харчовій, фармацевтичній, косметичній, сільськогосподарській та інших галузях.

У фармацевтичній промисловості використовується при виробництві вітамінних комплексів (входить до складу полівітамінних препаратів для профілактики та лікування авітамінозу, зокрема В2-дефіциту), використовується при терапії дерматологічних проблем, захворювань очей (катаракта, глаукома), анемії, мігрені, та хронічної втоми, як складова дієтичних добавок додається для підтримки метаболізму, здоров'я шкіри, волосся і нігтів. У фармацевтичній сфері, з поглибленням досліджень і розробкою фармакологічних ефектів рибофлавіну в останні роки, він розглядається як потенційний препарат для знищення пухлинних тканин у фотодинамічній терапії, лікуванні серцево-судинних/цереброваскулярних захворювань і опору бактеріям.

У харчовій промисловості використовується як харчова добавка (E101) - як природний жовтий або оранжевий барвник у виробництві напоїв, кондитерських виробів, молочних продуктів, випічки; для збагачення продуктів харчування - додається до злакових сніданків, борошна, молока, дитячого харчування та інших продуктів для запобігання дефіциту вітаміну В2; для спеціального харчування, наприклад, у складі спортивних добавок для підтримки метаболізму енергії, покращення витривалості та відновлення після фізичних навантажень. У моніторингу якості харчових продуктів зниження вмісту рибофлавіну вважається ознакою деякого погіршення харчових продуктів через світлочутливість рибофлавіну, наприклад, оцінка вмісту рибофлавіну може зробити висновок про якість обробки та зберігання молока.

У косметології застосовується у засобах по догляду за шкірою - у кремах, масках та лосьйонах для покращення стану шкіри, боротьби із

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						8
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

запаленнями, зморшками та сухістю, для зміцнення волосся і нігтів додається до косметичних засобів, сприяючи їхньому здоровому вигляду та росту.

У ветеринарії використовують для збагачення кормів та як дієтичні добавки - входить до складу преміксів для годівлі сільськогосподарських тварин, птиці та риби, сприяючи покращенню продуктивності, росту і здоров'я; також використовується у ветеринарних препаратах для лікування дерматитів, інфекційних захворювань і метаболічних порушень у тварин. У сільському господарстві використовується для покращення якості кормів, так як підвищує засвоюваність поживних речовин у тварин та птиці, що сприяє підвищенню продуктивності фермерських господарств.

У біотехнології перспективним є використання як індикатора завдяки здатності до флуоресценції (використовується в аналітичній хімії для виявлення деяких сполук); у виробництві пробіотиків додається до складу живильних середовищ для вирощування бактерій у біотехнологічних процесах.

Завдяки флуоресцентним властивостям застосовується у дослідженнях клітинного метаболізму та візуалізації біохімічних процесів. Також у наукових дослідженнях використовується для вивчення вітамінного метаболізму, для вивчення ролі коферментів у метаболічних процесах.

Дефіцит рибофлавіну може призвести до порушення метаболізму, затримки росту дітей, ураження шкіри та слизових оболонок, навіть раку та інших захворювань, тоді як надмірне споживання рибофлавіну може спричинити пошкодження відкритих тканин внаслідок світлового окислення, деградацію ДНК та збільшення утворення перекисів ліпідів через fotocутливість рибофлавіну.

Рибофлавін жовтий і природно флуоресцентний під дією ультрафіолетового світла. Крім того, ультрафіолетове та видиме світло можуть швидко інактивувати рибофлавін та його похідні. Через таку чутливість тривала світлова терапія для лікування жовтяниці у

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						9
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

новонароджених або шкірних захворювань може призвести до дефіциту рибофлавіну. Ризик втрати рибофлавіну під впливом світла є причиною, чому молоко зазвичай не зберігається в скляних контейнерах.

Рівень рибофлавіну у здорових людей зазвичай не оцінюється. Надійним і чутливим методом визначення дефіциту є коефіцієнт активності глутатіонредуктази еритроцитів (EGRAC), який базується на співвідношенні активності ферменту *in vitro* в присутності ФАД і без нього. Хоча точні порогові значення цього показника не встановлені, значення $\leq 1,2$ свідчить про достатній рівень рибофлавіну, 1,2–1,4 – про граничний дефіцит, а $> 1,4$ – про виражений дефіцит.

Ще одним широко застосовуваним методом є флуорометричний аналіз рівня рибофлавіну в сечі протягом 24 годин. Оскільки організм здатний зберігати лише невелику кількість цього вітаміну, виділення із сечею демонструє поточне споживання, поки тканини не наситяться. У здорових людей загальний рівень екскреції рибофлавіну має становити не менше 120 мкг/добу; значення менше 40 мкг/добу вказує на дефіцит. На рівень виділення можуть впливати вік, стресові фактори та медикаменти, а також останній раціон.

Рекомендації щодо споживання рибофлавіну визначені в рамках Дієтичних стандартів споживання (Dietary Reference Intakes), розроблених Радою з харчування (Food and Nutrition Board) Інституту медицини Національних академій США. Ці стандарти містять набори показників, які використовуються для планування та оцінки рівня поживних речовин у раціоні здорових людей.

У таблиці 1.1 наведено поточні рекомендовані дієтичні норми для рибофлавіну згідно цього стандарту.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						10
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 1.1 - Рекомендовані дієтичні норми рибофлавіну

Вік	Чоловіки	Жінки
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 років	0,6 мг	0,6 мг
9–13 років	0,9 мг	0,9 мг
14–18 років	1,3 мг	1,0 мг
19-50 років	1,3 мг	1,1 мг
51+ років	1,3 мг	1,1 мг

Подібні значення встановлює і Група експертів Європейської комісії з дієтичних продуктів, харчування та алергії (Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies): для дорослих середні потреби і популяційні референтні норми споживання встановлені на рівні 1,3 і 1,6 мг/добу.

1.2 Світовий ринок виробництва рибофлавіну

Серед закордонних виробників станом на 2020 р. основними виробниками рибофлавіну були BASF (Німеччина), DSM (Нідерланди), Hubei Guangji Pharmaceuticals (Китай) і Shanghai Acebright Pharmaceuticals (раніше Desano, Китай). Згідно зі звітом Служби сільськогосподарського маркетингу Міністерства сільського господарства США (United States Department of Agriculture Agricultural Marketing Service) за 2024 р. щодо світового виробництва вітамінів серед існуючих методів отримання рибофлавіну – виділення з природних джерел, хімічний синтез та мікробний синтез, на сьогоднішній день промисловістю випускається лише вітамін B2, отриманий біотехнологічним методом шляхом ферментації генно-модифікованих штамів продуцентів.

Рибофлавін вперше був синтезований у лабораторних масштабах у 1935 р. При оригінальному процесі синтезу Куна і Каррера використовували D-

рибозу, 3,4-метиланілін і барбітурову кислоту з виходом близько 48% вітаміну. Повний хімічний синтез, заснований на конденсації ксилілових і урацилових кілець, був основним процесом виробництва з середини 1930-х до кінця 1980-х рр. Максимальний вихід для загального хімічного синтезу становив близько 60% у порівнянні із виходом близько 80% для методу мікробного синтезу з використанням генетично модифікованого штаму *B. subtilis*. Використання мікробного синтезу D-рибози продуцентом *B. subtilis* стало ключовим у заміні загального хімічного синтезу біотехнологічним методом. Спочатку використовувася саме цей комбінований хіміко-мікробний синтез заснований на мікробному синтезі D-рибози штамом *B. subtilis* - мутантом по транскеталазі, який поступово був витіснений повним мікробним синтезом. Також, незважаючи на те, що завдяки хімічному синтезу можливо отримати чисті форми вітаміну, біотехнологічний метод отримання рибофлавіну є більш економічно ефективним завдяки можливості використовувати відходи інших галузей промисловості як живильні середовища для продуцентів та проведення процесу синтезу вітаміну в мікробній клітині в одну стадію на противагу багатостадійності хімічного синтезу (рис. 1.4).

Таким чином, враховуючи накопичення знань щодо шляхів реалізації мікробного синтезу для різних продуцентів, економічну ефективність та поширення світових тенденцій у напрямку екологічності виробництв (загальний хімічний синтез утворює більше промислових відходів, ніж ферментація), до середини 1990-х рр. загальний хімічний синтез перестав бути конкурентоспроможним за ціною з виробництвом рибофлавіну на основі генетично модифікованих мікроорганізмів. Компанія BASF припинила виробництво синтетичної речовини у 1996 р. після запуску ферментаційного заводу, який використовував генетично модифіковані організми для виробництва рибофлавіну.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						12
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

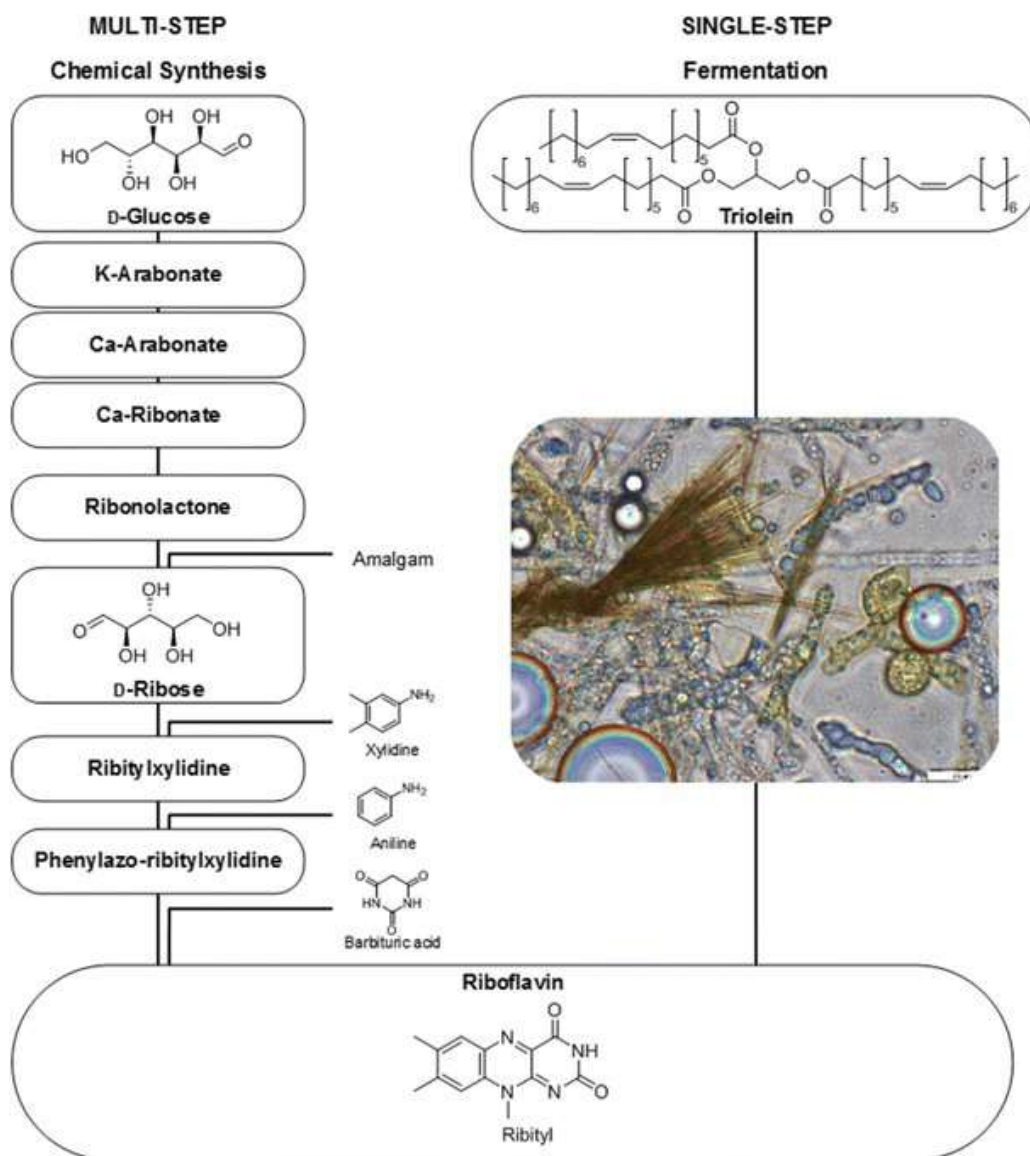


Рис. 1.4 – Стадії хімічного і мікробного синтезу рибофлавіну

Мікроскопічне зображення - *A. gossypii* дикого типу в середовищі рослинної олії. Міцелій, краплі олії та кристали рибофлавіну показані в 600-кратному збільшенні (Джерело: Biotechnology of riboflavin, José Luis Revuelta et al., 2016)

Першим мікроорганізмом, використаним для виробництва комерційного рибофлавіну шляхом бродіння, був *Clostridium acetobutylicum*. Через низький вихід вітаміну цей продуцент був замінений більш продуктивними штамми *Eremothecium ashbyi* та *Ashbya gossypii*. Але слід відмітити, що ацетобутилова бактерія *C. acetobutylicum* залишається перспективним продуцентом через можливість отримання кормового рибофлавіну у якості відходу при виробництві ацетону.

Через генетичну нестабільність *E. ashbyi* у промисловості закріпився як основний продуцент *A. gossypii*. Таким чином, у період між 1946 і 1968 роками промисловий мікробний синтез рибофлавіну на основі селекційно відібраного штаму *A. gossypii* став конкурувати з хімічним синтезом. У 1974 р. компанія Merck почала виробництво рибофлавіну зі штамів *A. gossypii*, отриманих шляхом мутагенезу, а у 2004 р. було завершено геномне секвенування цього продуценту. Цей факт і загалом розвиток молекулярних інструментів, включно з електротрансформацією, рециркуляцією селекційних маркерів, регуляторними промоторами та інсерційним мутагенезом, дозволило до 2006 р. дослідницьким групам і виробникам покращити виробництво за допомогою генної інженерії з десятикратним збільшенням виходу продукту. Таким чином, починаючи з цього року кількість генно-модифікованих штамів збільшувалось і поступово виробництво на їх основі повністю витіснило виробництво на основі мікроорганізмів, відібраних класичною селекцією та індукованим мутагенезом. Ферментація за допомогою класично відібраних мікроорганізмів технічно можлива, але в даний час неконкурентоспроможна якщо порівнювати із виробництвами на основі генно-інженерних штамів, хоча у науковій літературі зустрічаються відомості про роботу із штамми дикого типу.

Отже, на сьогоднішній день у промислових масштабах використовуються відібрані мутанти з послідуною модифікацією технологіями рекомбінантної ДНК штами наступних видів бактерій *Bacillus subtilis*, дріжджоподібних грибів *Ermothecium ashbyi*, *Ashbya gossypii* та *Candida famata*, хоча в наукових роботах можна зустріти і інші види мікроорганізмів, наприклад *Escherichia coli*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Lactobacillus plantarum*. Приблизний вихід рибофлавіну для основних промислових штамів, що використовуються закордонними компаніями - виробниками: *E. ashbyii* росту накопичує 17 г/л рибофлавіну за 96 год, *C.*

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

famata - 20 г/л за 200 год, *A. gossypii* - 13,7 г/л за 144 год, *B. subtilis* - 30 г/л за 37 год.

1.3 Український ринок виробництва рибофлавіну

Об'єктом роботи є рибофлавін, який випускається у вигляді дієтичної добавки. Рибофлавін доступний у багатьох дієтичних добавках. Полівітамінні/мінеральні добавки з рибофлавіном зазвичай забезпечують 1,3 мг рибофлавіну (100% від середньої рекомендованої дози). Також доступні добавки, що містять лише рибофлавін або вітаміни В-комплексу (що включають рибофлавін). У більшості добавок рибофлавін знаходиться у вільній формі, але деякі добавки містять 5'-фосфат рибофлавіну.

Зокрема, АТ «Київський вітамінний завод» серед групи вітаміни випускає наступні дієтичні добавки, що містять рибофлавін у вигляді полівітамінних комплексів:

- Гексавіт-КВ, драже (вітаміни А, В1, В2, В6, С, РР);
- Декамевіт, таблетки (вітаміну А у вигляді сухого вітаміну А ацетату 500 (ретинолу ацетату) 6 600 МО, вітаміну Е (α-токоферолу ацетату) або сухого вітаміну Е 50 % 10 мг, вітаміну В1 (тіаміну гідрохлориду) 20 мг, вітаміну В2 (рибофлавіну) 10 мг, вітаміну В6 (піридоксину гідрохлориду) 20 мг, вітаміну С (кислоти аскорбінової) 200 мг, фолієвої кислоти (вітаміну Вс) 2 мг, нікотинаміду (вітаміну РР) 50 мг, рутину (вітаміну Р) 20 мг, метіоніну 200 мг, вітаміну В12 (ціанокобаламіну) 0,1 мг);
- Ревіт-КВ, драже (вітаміни А, В1, В2 та С);
- Ундевіт-КВ, драже (вітаміни А, В1 В2, В6, В12, С, Е, РР, рутин, кальцію D-пантотенат, фолієва кислота).

Слід зазначити, що рибофлавін випускається і у вигляді лікарського засобу у комплексах з різних фармакологічних груп. У Державному реєстрі

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

лікарських засобів вказані наступні лікарські засоби, що містять як один з активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) рибофлавін:

- Синдрекс, концентрат для розчину для інфузій, АТ "Фармак", Україна;
- Демотон-Б НЕО, розчин для ін'єкцій, ДЕМО СА Фармасьютікал Індастрі, Греція;
- Гепадиф, капсули, ТОВ "ВАЛАРТІН ФАРМА", Україна;
- Ревіт, драже in bulk та драже в упаковці, ПрАТ "Технолог", Україна;
- Ревіт, драже, АТ "Київський вітамінний завод", Україна;
- Ревіт, драже, АТ "Вітаміни", Україна;
- Гексавіт, драже in bulk, ПрАТ "Технолог", Україна;
- Есслівер форте, капсули Наброс Фарма Пвт. Лтд., Індія
- Вазавітал, капсули ТОВ "Астрафарм", Україна
- Гексавіт, драже АТ "Вітаміни", Україна
- Ліволін форте, капсули Мега Лайфсайенсіз Паблік Компані Лімітед, Таїланд
- Ундевіт, драже, in bulk: ПрАТ "Технолог", Україна
- Супервіт, таблетки жувальні АТ "Київський вітамінний завод", Україна
- Нейровітан, таблетки Хікма Фармасьютікалз Ко. Лтд., Йорданія
- Юнівіт, таблетки АТ "Київський вітамінний завод", Україна
- Гексавіт, драже АТ "Київський вітамінний завод", Україна
- Ундевіт, драже АТ "Вітаміни", Україна
- Солувіт Н, ліофілізат для розчину для інфузій Фрезеніус Кабі АБ (маркування, пакування, контроль якості, випуск серії), Швеція, Фрезеніус Кабі ССПЦ (виробництво, маркування, пакування), Китай
- Декамевіт, таблетки АТ "Київський вітамінний завод", Україна
- Гексавіт, драже ПрАТ "Технолог", Україна
- Піковіт форте, таблетки КРКА, д.д., Ново место (відповідальний за виробництво "in bulk", первинну упаковку, вторинну упаковку) / КРКА, д.д.,

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

Ново место (відповідальний за контроль серій) / КРКА, д.д., Ново место КРКА, д.д., Ново место (відповідальний за контроль та випуск серій), Словенія/Словенія/Словенія

- Піковіт, сироп КРКА, д.д., Ново место (виробництво, первинне та вторинне пакування, контроль та випуск серії) / КРКА, д.д., Ново место (виробництво, первинне та вторинне пакування, контроль серії), Словенія/Словенія

- Ундетаб, таблетки АТ "Київський вітамінний завод", Україна

- Ундевіт, драже, ПрАТ "Технолог", Україна

- Комплевіт, капсули АТ "Київський вітамінний завод", Україна

- Дуовіт, таблетки КРКА, д.д., Ново место (контроль та випуск серій) / КРКА, д.д., Ново место (виробництво "in bulk", первинне пакування, вторинне АТ «Київський вітамінний завод» випускає наступні полівітамінні комплекси як лікарські засоби:

- Комплевіт (аскорбінова кислота (вітаміну С) 100 мг, тіаміну гідрохлорид (вітаміну В1) 15 мг, рибофлавін (вітаміну В2) 15 мг, піридоксину гідрохлорид (вітаміну В6) 10 мг, ціанокобаламін (вітаміну В12) 0,002 мг, фолієва кислота 0,25 мг, нікотинамід 50 мг; кальцію пантотенат 25 мг);

- Супервіт, таблетки (вітаміну А (у вигляді ретинолу ацетату) 2 666 МО, вітаміну D3 (у вигляді холекальциферолу) 200 МО (5 мкг), вітаміну Е (у вигляді а-токоферолу ацетату) 14,9 МО, вітаміну В1 (у вигляді тіаміну мононітрату) 1,4 мг, вітаміну В2 (рибофлавіну) 1,6 мг, вітаміну В6 (піридоксину гідрохлориду) 2 мг, вітаміну В12 (ціанокобаламіну) 1 мкг, вітаміну РР (нікотинамиду) 18 мг, вітаміну В5 (кальцію D-пантотенату) 6 мг, кислоти фолієвої 100 мкг, вітаміну С (кислоти аскорбінової) 60 мг та мінералів);

- Юнівіт, таблетки (вітаміну А (ретинолу ацетату) 600 МО, вітаміну В1 (тіаміну гідрохлориду) 0,203 мг, вітаміну В2 (рибофлавіну) 0,3 мг, вітаміну В5 (кальцію D-пантотенату) 1,2 мг, вітаміну В6 (піридоксину гідрохлориду) 0,3

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

мг, вітаміну В12 (ціанокобаламіну) 0,0002 мг, вітаміну С (кислоти аскорбінової) 10 мг, вітаміну D3 (холекальциферолу) 80 МО, вітаміну РР (нікотинаміду) 3 мг, кислоти фолієвої 0,04 мг, мінерали).

Також в Україні продається рибофлавін як субстанція для фармацевтична застосування. У Державному реєстрі лікарських засобів вказані наступні компанії:

- ТОВ "ТК "АВРОРА", Україна, виробник субстанції БАСФ Компані Лтд., Корея;

- АТ "Фармак", Україна, виробник субстанції ХАРМЕН ФІНОХЕМ ЛТД. (повний цикл виробництва), Індія, БАСФ КАМПАНИ ЛТД. (виробництво інтермедіату), Корея;

- АТ "Київський вітамінний завод", Україна, виробник субстанції Хубей Гуанцзи Фармас'ютікал Ко., Лтд., Китай.

Таким чином, бачимо, що рибофлавін випускається у складі багатьох дієтичних добавок та лікарських засобів різних фармакологічних груп. Але в Україні не налагоджено власне виробництво рибофлавіну, українські компанії імпортують рибофлавін або його субстанції для подальшого використання у виробництві лікарських засобів та дієтичних добавок. Тому удосконалення виробництва рибофлавіна за рахунок впровадження стадій його синтезу є актуальним для вітчизняної галузі, зокрема для АТ «Київський вітамінний завод», який у своєму портфелі має багато дієтичних добавок та лікарських засобів на основі рибофлавіну та зможе покривати власні потреби у цьому АФІ та продавати вітамін як субстанцію для виробників фармацевтичної, харчової, косметичної та ветеринарної галузей як вітчизняним, так і на експорт.

Вищенаведена інформація показала, що основними штамми надсинтетиками рибофлавіну, які використовують закордонні компанії, є *Bacillus subtilis*, *Eremothecium ashbyi*, *Ashbya gossypii* та *Candida famata*. Але конкретна інформація про вихідний організм-хазяїн, організм-донор, процес генетичної модифікації, процес виробництва та середовище для росту для

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

багатьох промислових надсинтетиків залишаються комерційною таємницею компаній та не міститься у загальнодоступних документах, тому перспективними є дослідження вітчизняних науковців.

У роботах українських науковців зустрічається інформація про вивчення штамів продуцентів рибофлавіну. Перспективними є роботи дослідників з Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна, які вивчали трансформацію флавіногенних мутантних штамів дріжджів *Pichia guilliermondii* щодо регуляції біосинтезу рибофлавіну, та вчених із Інституту біології клітин НАН України, які займались створенням генно-інженерних штамів іншого виду флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази. Дослідники із Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» вивчали *E. ashbyi* F-340, який здійснює надсинтез рибофлавіну, ФАД та ефірної олії, визначили умови його вирощування, оптимізували живильне середовище, обґрунтували стадії біотехнологічного процесу. Вчені з Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», використовуючи методи класичної селекції, індукованого мутагенезу та технологій рекомбінантної ДНК розробили штами *B. subtilis* IMB B-7797, IFBG МК-1А і IFBG NTG2, перспективні для використання у промисловості.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						19
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

2.1 Характеристика готового продукту

Характеристика дієтичних добавок на основі рибофлавіну виробництва АТ «Київський вітамінний завод» наведено вище, у цьому розділі надаємо характеристику рибофлавіну як субстанції, виробництво якої пропонується впровадити на підприємстві.

Виробництво субстанції рибофлавіну на фармацевтичному підприємстві здійснюється згідно з вимогами чинного законодавства, субстанція повинна відповідати вимогам ДФУ 2.2, Т. 2.

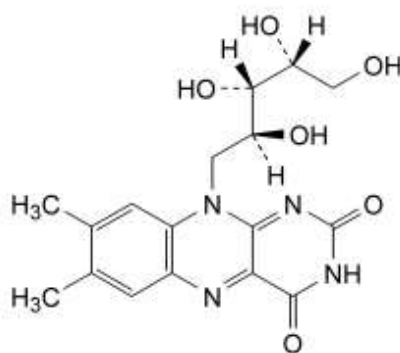


Рис. 2.1 – Хімічна формула рибофлавіну
(Джерело: EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0)

Молекулярна формула - $C_{17}H_{20}N_4O_6$, молекулярна маса - 376,4.

7,8-Диметил-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-тетрагідроксипентил]бензо[g]птеридин-2,4-(3H,10H)-діон

Монографії як ДФУ 2.2, Т. 2, так і EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0 регламентують вимоги саме до рибофлавіну, отриманого шляхом ферментації.

Властивості:

Опис. Кристалічний порошок жовтого або оранже-жовтого кольору.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

Розчинність. Дуже мало розчинний у воді Р, практично не розчинний в етанолі (96 %) Р

Розчини розкладаються під впливом світла, особливо у присутності гідроксидів лужних металів.

Виявляє поліморфізм.

Ідентифікація базується на специфічному оптичному обертанні (субстанція має відповідати вимогам щодо питомого оптичного від -115 до -135, у перерахунку на суху речовину), тонкошаровій хроматографії та ультрафіолетової/видимої спектрофотометрії (розчин у світлі, що проходить, має блідо-зеленувато-жовте забарвлення, у відбитому світлі розчин виявляє інтенсивну жовтаво-зелену флуоресценцію, що зникає при додаванні мінеральних кислот або гідроксидів лужних металів), кількісна оцінка - на спектрофотометрії при 444 нм (Вміст $C_{17}H_{20}N_4O_6$ обчислюють, використовуючи питомий показник поглинання, що дорівнює 328).

Також проводять випробовування на оптичну густина (абсорбційні максимуми: за довжин хвиль 223 нм, 267 нм, 373 нм і 444 нм), супровідні домішки визначають рідинною хроматографією), визначають втрату в масі при висушуванні та сульфатну золу.

2.2 Характеристика біологічного об'єкту

Як продуцентом у роботі обрано штам *Bacillus subtilis* IFBG NTG2, отриманий в Інституті харчової біотехнології та геноміки НАН України в результаті спочатку виділення природнього штаму, потім отримання на його основі індукованим мутагенезом надсинтетиків. Вибір як модельного організму *B. subtilis* для створення промислових штамів, що мають здатність продукувати рибофлавін, обумовлено широкою поширеністю в природі, генетичною стабільністю, невибагливістю до умов вирощування, швидкістю росту бактерії (68-72 год) у порівнянні із штамми дріжджоподібних грибів та

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

можливістю накопичувати вітамін безпосередньо у середовищі, а не всередині клітини. Це забезпечить технологічні переваги у промисловому масштабі, так як технологія не буде включати стадії руйнування клітин і час культивування, витрати енергоресурсів і харчових джерел будуть меншими.

Слід зазначити, що природний штам також самостійно виділено дослідниками із зовнішніх джерел (поверхня бульб картоплі), відбираючи максимально морфологічно подібні колонії (колонії амебоподібної форми, що мають світло-жовтий та жовтокоричневий колір) при пересівах та проводячи їхню ідентифікацію загальноприйнятними мікробіологічними методами (цитологічні, біохімічні, фізіологічні властивості), за допомогою Визначника Бердже та проводячи молекулярну видову ідентифікацію секвенуванням гена 16S рРНК. Відібрані культури перевіряли на здатність утворювати рибофлавін. Природний штам із найбільшою здатністю до продукування рибофлавіну (4,3 г/л за 72 год) було депоновано в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України як *B. subtilis* IMB B-7797 та обрано як вихідний для створення надсинтетика. За рахунок оптимізації умов культивування (джерела вуглецю та її кількості, рН, температури, кількість внесеного посівного матеріалу) продукування рибофлавіну цим штамом збільшується до 8,9 г/л.

На основі природного штаму за допомогою УФ-опромінення (метод індукованого мутагенезу) дослідники створили штам *B. subtilis* IFBG МК-1А. Цей мутантний штам був здатний до синтезу 13,98 г/л вітаміну В2. Надалі вже цей штам обробляли хімічним мутагеном N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідином та серед утворених клонів знову ж таки відбирали штам із найбільшою здатністю до накопичення рибофлавіну. В результаті було отримано штам *B. subtilis* IFBG NTG2 із виходом цільового продукту 14,8 г/л, але оптимізацією умов культивування (використання методу підживлення) було досягнуто синтез рибофлавіну на рівні 19,1 г/л.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

Морфологія колоній *B. subtilis* IFBG NTG2 – жовто-коричневий колір неправильної амебоподібної форми, поверхня гладенька та матова, структура колоній дрібноморшкувати, консистенція колоній пастоподібна. На рис. 2.2 наведений морфологія клонів отриманих послідовним мутагенезом УФ та хімічною речовиною, фото Г відповідає морфології штаму надсинтетика.

За мікроскопічними властивостями клітини бактерій паличкоподібні, витягнутої форми, мають тупі закруглені кінці, безбарвні, діаметр клітин – 0,6 мкм, довжина – 3-8 мкм. Забарвлення за Грамом – грампозитивні клітини (рис. 2.3).

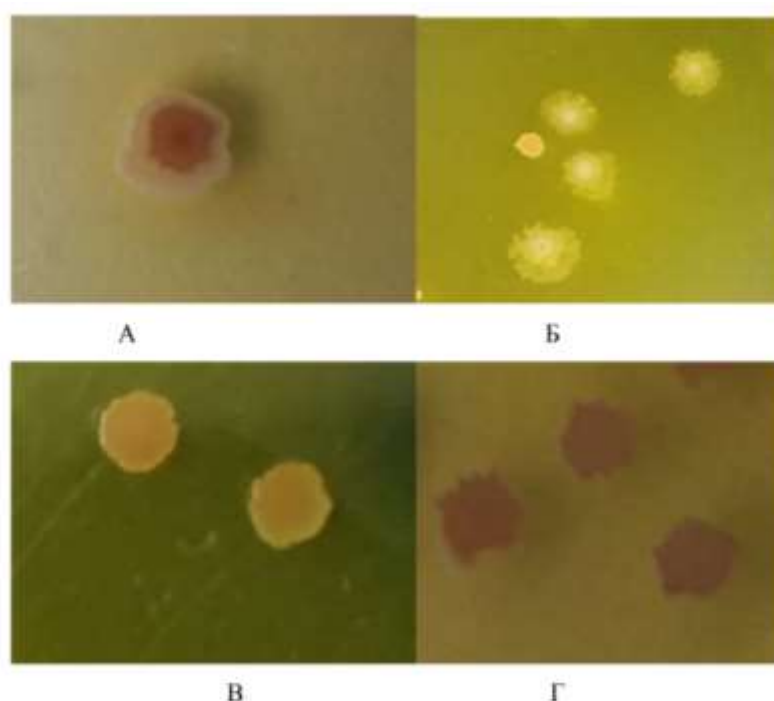


Рис. 2.2 – Морфологія клонів отриманих послідовним мутагенезом УФ та хімічною речовиною штаму природнього штаму *B. subtilis* IMB B-7797

(Джерело (тут і далі): Отримання штаму-продуцента *Bacillus subtilis* з підвищеним накопиченням рибофлавіну, Радченко М. М., 2023)



Рис. 2.3 – Мікроскопія (препарати фіксованих клітин, забарвлення за Грамом) клітин *B. subtilis* IMB B-7797

Як і всі клітини роду *Bacillus* здатні до спороутворення, в кожній клітині розташовується одна овальна спора, розташування спор центральне (рис. 2.4, 2.5). Розмір спор 0,9х0,6 мкм.



Рис. 2.4 – Мікроскопія спорової культури штаму *B. subtilis* IMB B-7797

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						24
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



Рис. 2.5 – Мікроскопічне зображення спор штаму *B. subtilis* IFBG МК-1А та голчатих кристалів рибофлавіну

Клітини здатні до руху за допомогою перитрихіально розташованих джгутиків.

Бактерії гідролізують крохмаль, засвоюють азот (як солі амонію), як джерело вуглецю засвоюють глюкозу, сахарозу, арабінозу, маніт.

Накопичення рибофлавіну відбувається у вигляді голчастих кристалів (рис. 2.5, 2.6).



Рис. 2.6 – Голчасті кристали рибофлавіну культурою *B. subtilis*

2.3 Біосинтез цільового продукту

Незважаючи на досить широкий спектр вуглеводів, які можуть використовуватись як джерело вуглецю клітинами *B. subtilis*, для обраного штаму серед цукрів глюкози, сахарози, фруктози, кращим є глюкоза. Класичний шлях катаболізму глюкози для багатьох хемоорганотрофів є перетворення на піруват у реакціях гліколізу або шляху Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (рис. 2.7).

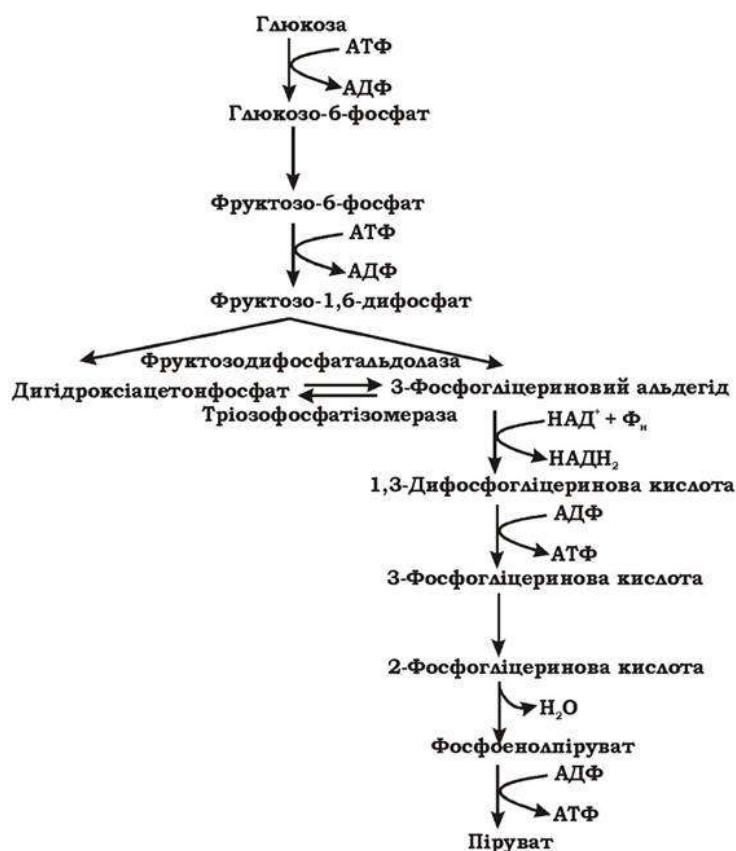


Рис. 2.7 – Гліколітичний шлях перетворення глюкози

Ферменти: 1 - гексокіназа; 2 - глюкозофосфатізомераза;
 3 - фосфоглюкокіназа; 4 - фруктозодифосфатацьдолаза;
 5 - триозофосфатізомераза;
 6 - гліцерацьдегідфосфатдегідрогеназа;
 7 - фосфогліцераткіназа; 8 - гліцератфосфомутаза та фосфогліцератфосфомутаза; 9 -
 енолаза; 10 – піруваткіназа
 (Джерело: Мікробіологія, Сергійчук М.Г. та ін., 2000)

У *B. subtilis* окрім глюконатного шляху функціонують окислювальний пентозофосфатний шлях і неокислювальний пентозофосфатний шлях (рис. 2.8).

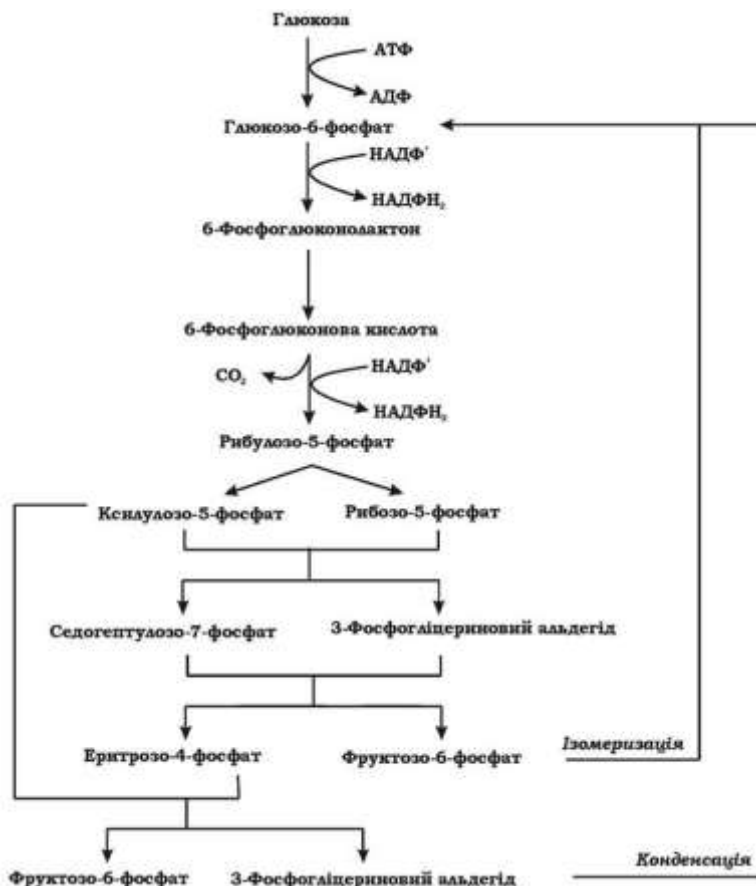


Рис. 2.8 – Пентозофосфатний шлях перетворення глюкози

Ферменти: 1 - глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа;

2 - глюконат-6-фосфатдегідрогеназа; 3 - трансальдолаза і транскетотлаза; 4 - глюкозофосфатізомераза; НАД(Ф) означає, що дегідрогеназа використовує як коферменти НАД або НАДФ

(Джерело: Мікробіологія, Сергійчук М.Г. та ін., 2000)

Синтез рибофлавіну можна поділити на 2 етапи: 1 етап включає вихідні синтетичні шляхи в результаті утворюються прямі попередники Ru5P і GTP, 2 етап – низхідні синтетичні шляхи в результаті відбувається прямий біосинтез рибофлавіну.

Попередниками рибофлавіну є рибulozo-5-фосфат (Ru5P) і гуанозин-5'-трифосфат (GTP) (рис. 2.9). Гліколіз, окислювальний пентозофосфатний шлях

і неокислювальний пентозофосфатний шлях є джерелами для одного з попередників рибофлавіна рибулозо-5-фосфата Ru5P. При окисному пентозофосфатному шляху глюкозо-6-фосфат спочатку перетворюється на 6-фосфоглюконолактон за допомогою глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, а потім гідролізується до 6-фосфоглюконової кислоти за допомогою 6-фосфоглюконатдегідрогенази, яка далі каталізується до Ru5P шляхом окисного декарбоксилювання. У неокислюваному пентозофосфатному шляху фруктозо-6-фосфат і гліцеральдегід-3-фосфат піддаються трансальдозним і транскетозазним реакціям з утворенням Ru5P. У глюконатному шляху глюкоза каталізується глюкозодегідрогеназою до глюконату, який потім фосфорилується глюконаткіназою до глюкозо-6-фосфату та вступає в окислювальний пентозофосфатний шлях для отримання Ru5P

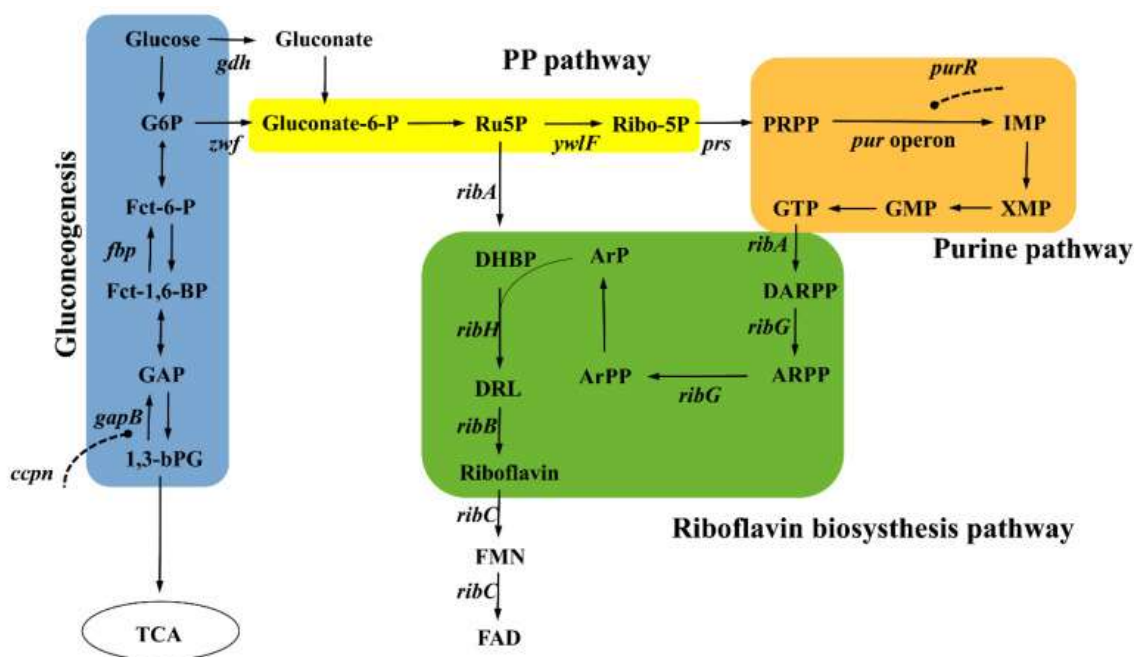


Рис. 2.9 - Біосинтез і регуляція продукції рибофлавіну у *B. subtilis*

Ферменти та речовини реакцій: G6P, глюкозо-6-фосфат; F6P, фруктозо-6-фосфат; F1,6BP, фруктозо-1,6-бісфосфат; GAP, гліцеральдегід-3-фосфат; 1,3-bPG, 1,3-бісфосфогліцерат; Ru5P, рибулозо-5-фосфат; Рибо-5P, рибозо-5-фосфат; PRPP, фосфорибозилпірофосфат; ІМП інозинмонофосфат; XMP ксантозинмонофосфат; GMP гуанозинмонофосфат; GTP, гуанозин-5'-трифосфат; DARPP, N-(2,5-діаміно-6-оксо-1,6-дигідро-4-піримідиніл)-5-О-фосфоно-β-D-рибофуранозиламін; ARPP, N-(5-аміно-2,6-діоксо-1,2,3,6-тетрагідро-4-піримідиніл)-5-О-фосфоно-β-D-рибофуранозиламін; ArPP, 1-[(5-аміно-2,6-діоксо-1,2,3,6-тетрагідро-4-піримідиніл) аміно]-1-дезоксид-5-О-фосфоно-D-рибозит; ArP, 1-[(5-аміно-2,6-діоксо-1,2,3,6-тетрагідро-4-піримідиніл) аміно]-1-дезоксид-D-

рибіт; DNBP, 2-гідрокси-3-оксобутилдигідрофосфат; DRL, 1-дезоксид-1-(6,7-диметил-2,4-діоксо-3,4-дигідро-8(2H)-птеридиніл)-D-рибіт; FMN, флавіновий моновуклеотид; ФАД, флавін-адениндинуклеотид; *fbp* : фруктозо-1,6-бісфосфатаза 1; *garB* , гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа; *gdh* , глутаматдегідрогеназа; *zwf* , глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; *ywlF* , рибоза-5-фосфат-ізомераза B; *prs* , PRPP синтетаза; *ribA*, GTP циклогідролаза 2; *ribB*, 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза; *ribC*, рибофлавінсинтаза; *ribG*, Діаміногідроксифосфорибозиламінопіримідиндезаміназа/5-аміно-6-(5-фосфорибозиламіно)урацилредуктаза; *ribH*, 6,7-диметил-8-рібітиллумазинсинтаза.

Пунктирна лінія означає негативний відгук.

(Джерело: Metabolic Engineering of Bacillus subtilis for Riboflavin Production: A Review, Yang Liu et al., 2023)

Другий прямий попередник рибофлавіну гуанозин-5'-трифосфат GTP утворюється в клітинах за допомогою шляху синтезу пурину *de novo*, який складається з 10 різних ферментативних реакцій для генерації інозинмонофосфату (IMP) з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату (PRPP).. Далі IMP перетворюється на GTP і АТР.

Другий етап – прямий біосинтез рибофлавіну, гени, відповідальні за цей етап, присутні на хромосомі бактерії у формі оперона. Загальна довжина оперону становить 4,2 кб, і він містить п'ять кодуєчих областей, що не перекриваються, у порядку *ribG*, *ribB*, *ribA*, *ribH*, *ribT*. Серед них *ribA* і *ribG* кодують біфункціональні ферменти. *RibA* кодує GTP-циклогідролазу II на 3'-кінці та гідроксибутиронфосфатсинтазу на 5'-кінці, яка реагує з попередниками GTP і рибулозо-5-фосфатом відповідно. GTP циклогідролаза II каталізує гідролітичне розкриття імідазольного кільця, вивільняючи C-8 у формі формиату, і гідролітичне вивільнення пірофосфату з бічного ланцюга фрагмента рибози з утворенням 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4(3H)-піримідинон-5'-фосфат (DARPP), який вимагає Mg^{2+} для активації, тоді як неорганічний фосфат діє як інгібітор ферменту. Іншою функцією *ribA* є каталізування виробництва L-3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфату (DNBP) з Ru5P. Встановлено, що голофермент *RibA* є ферментом, що обмежує швидкість синтезу рибофлавіну. Надмірна експресія індивідуальних *RibG*, *RibB*, *RibH* і усіченого *RibA* з GTP циклогідролазою II або DNBP поодиночці знижує продукцію рибофлавіну. *ribG* кодує біфункціональну активність

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

піримідиндезамінази та піримідинредуктази, дезаміназа кодується на 5'-кінці, а редуктаза - на 3'-кінці, причому фермент також активується Mg^{2+} . DARPP дезамінується у другій позиції піримідинового кільця в присутності піримідиндезамінази з утворенням 5-аміно-6-рибозиламіно-2,4(1H,3H)-піримідиндіон-5-фосфату (ARPP). У присутності піримідинредуктази NADPH витрачається на відновлення та розкриття кільця рибофуранозної групи ARPP з утворенням 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4(1H,3H)-піримідиндіон-5-фосфату (ArPP). Ця реакція відновлення потребує NADPH або NADH як кофактора. Далі ArPP каталізується неспецифічною фосфатазою для дефосфоризації в 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4(1H,3H)-піримідиндіон (ArP). Припускають, що ця стадія дефосфорилювання каталізується гідролазою з низькою субстратною специфічністю.

І *ribV* і *ribH* кодують рибофлавінсинтази. Рибофлавінсинтаза є складним ферментом, що складається з легкого ферменту та важкого ферменту. Легкий фермент містить три альфа-субодиниці. Важкий фермент являє собою комплекс однієї молекули легкого ферменту і приблизно 60 бета-субодиниць. *ribH* кодує бета-субодиницю рибофлавінсинтази, також відому як лумазинсинтаза. Він утворює основу Шиффа, каталізуючи реакцію між 5-позиційною аміногрупою піримідину ArP і карбонільною групою одиниці C4 DHBP, з подальшим дефосфорилюванням і поєднанням зі стадією перехресної таутомеризації для закриття кільця з кінцевим утворенням 6,7-диметил-8-рібітиллумазин (DRL). *ribB* кодує альфа-субодиницю рибофлавінсинтази, яка каталізує дисмутацію двох молекул DRL, безпосереднього попередника синтезу рибофлавіну, що включає перенесення одиниці C4, утворюючи одну молекулу рибофлавіну та одну молекулу ArPP. ArPP переробляється в синтетичному шляху як субстрат для лумазинсинтази. *ribT* розташований на кінці цього оперона, і його функція ще не з'ясована. *ribC* і *ribR* відіграють опосередковану регуляторну роль у експресії рибофлавінового оперону.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

У природних умовах *B. subtilis* не накопичує рибофлавін, тому для створення надсинтетиків використовують різні стратегії впливу на регуляцію шляху синтезу рибовлавіну.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

З ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1 Розрахунок матеріального балансу

Для того, щоб розрахувати загальні потреби у живильному середовищі на 1 серію (цикл) виробництва розрахуємо спочатку об'єми апаратів, в яких буде проходити вирощування продуцента. А потім розрахуємо кількості кожного компонента, що входять до складу середовищ №1 та №2, а також необхідні для приготування підживлювачів, коригента рН (25 % розчин аміачної води) та піногасника.

Враховуючи власні потреби підприємства у рибофлавіні для виробництва дієтичних добавок та лікарських засобів з його вмістом та потенційну можливість постачати субстанцію для потреб інших виробників прийmemo річну потребу виробництва $N = 1000$ кг/рік рибофлавіна (при наявності попиту можливе подальше збільшення обсягів).

Як продуцент ми обрали штам *B. subtilis* IFBG NTG2 із виходом цільового продукту 19,1 г/л за 68 год культивування (при використанні методу ферментації з підживленням), тоді об'єм культуральної рідини, в якій буде містити 1000 кг рибофлавіну, складає 52356 л або 52,4 м³. Але потрібно врахувати витрати на стадіях виділення рибофлавіну. Приймемо витрати на стадіях виділення як 20 %, тоді кінцевий об'єм культуральної рідини, який потрібно отримати, становить 62,88 м³.

Для розрахунку об'єму потрібного ферментера обрахуємо кількість субстанції за 1 виробничий цикл, кількість потрібних циклів за рік. Враховуючи графік роботи підприємства та кількість вихідних та святкових днів та зупинок на ремонт і з технологічних причин, ефективний час роботи обладнання складає 272 дні. Тоді, кількість субстанції, що буде вироблятися за 1 добу складає $1000 / 272 = 3,7$ кг.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

За даними розробників штаму тривалість процесу ферментації складає $t = 68$ год (чистий час культивування), але при розрахунку повного циклу роботи обладнання потрібно врахувати технологічні витрати часу на підготовку до роботи (t_0) – на миття, підігрів і стерилізацію, перевірку на герметичність, на його охолодження, а також на завантаження живильних компонентів та вивантаження культуральної рідини. Цей час залежить від об'єму ферментера і складає 15-20 год. Приймаємо середнє значення 18 год. Отримуємо повний цикл роботи ферментеру у межах 86 год. Тоді кількість субстанції рибофлавіну за 1 робочий цикл складає $G_{pц} = 3,7 \cdot 86 / 24 = 13,3$ кг/цикл.

Кількість циклів роботи обладнання для забезпечення цих умов складає $N_{ц} = 1000 / 13,3 = 75$ циклів.

Надалі розрахуємо об'єм культуральної рідини, в якій міститься ця кількість субстанції, тобто тієї культуральної рідини, що буде утворюватися за 1 робочий цикл ферментеру. Як прийнято раніше, втрати рибофлавіну на стадіях виділення становлять 20 %, частка сухих речовин у готовій субстанції 95 %, вихід рибофлавіну продуцентом становить $19,1$ кг/м³, тоді об'єм культуральної рідини, що буде містити розраховану кількість субстанції, за 1 цикл роботи у ферментері складатиме: $V_{кр} = 13,3 \cdot 0,95 / 19,1 \cdot 0,8 = 0,53$ м³/цикл.

Тоді, враховуючи коефіцієнт заповнення ферментеру 0,6-0,8 (приймаємо середнє значення), об'єм ферментера для реалізації цього процесу:

$$V_{ф} = 0,53 / 0,7 = 0,76 \text{ м}^3.$$

Згідно з табличними даними для апаратів періодичної дії номінальний об'єм головного ферментера становить $V_{фн} = 1 \text{ м}^3 = 1000$ л.

Знаючи параметри головного ферментера, розрахуємо об'єми апаратів, що необхідні на стадії масштабування культури, починаючи від колб та інокулятора.

Розрахуємо кількості живильного середовища та посівної дози культури, які потрібно внести до головного ферментера. Розрахована кількість культуральної рідини на виході з ферментера становить $V_{кр} = 0,53 \text{ м}^3 = 530$ л. Тоді, враховуючи її втрати при ферментації через краплевиніс з колектору

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

відпрацьованого повітря 10 %, увести до ферментеру ми повинні (разом посівний матеріал + свіже живильне середовище) $V_{кр1} = 530 / 0,9 = 589$ л.

Посівна доза складає 10 %, тоді об'єм живильного середовища у цьому ферментері дорівнює $V_{жс1} = 589 / 1,1 = 536$ л, а об'єм посівного матеріалу $V_{пм1} = 589 - 536 = 53$ л.

Таким чином, у попередньому апараті (інокуляторі) нам потрібно отримати на виході 53 л культуральної рідини. Підберемо інокулятор для цього процесу. Коефіцієнт заповнення інокулятора 0,7, об'єм інокулятора для реалізації цього процесу: $V_i = 53 / 0,7 = 76$ л $= 0,076$ м³.

Згідно з табличними даними для апаратів періодичної дії номінальний об'єм інокулятора становить $V_{iн} = 0,1$ м³ $= 100$ л.

Так саме як і в попередніх розрахунках, враховуючи втрати при ферментації через краплевиніс з колектору відпрацьованого повітря 10 %, увести до інокулятора ми повинні (разом посівний матеріал + свіже живильне середовище) $V_{кр2} = 53 / 0,9 = 58,9$ л.

Посівна доза складає 10 %, тоді об'єм живильного середовища у цьому інокуляторі дорівнює $V_{жс2} = 58,9 / 1,1 = 53,5$ л, а об'єм посівного матеріалу $V_{пм2} = 58,9 - 53,5 = 5,4$ л.

Таким чином, у попередньому до інокулятора апараті (посівний апарат), ми повинні отримати 5,4 л культуральної рідини. До цього апарату ми повинні увести (разом посівний матеріал + свіже живильне середовище) $V_{кр3} = 5,4 / 0,9 = 6$ л. Враховуючи коефіцієнт заповнення, $V_{п.а.} = 6 / 0,7 = 8,6$ л. Згідно з даними літератури номінальний об'єм апарату: $V_{п.а.н} = 0,01$ м³ $= 10$ л.

Посівна доза складає 10 %, тоді об'єм живильного середовища у цьому посівному апараті дорівнює $V_{жс3} = 6 / 1,1 = 5,45$ л, а об'єм посівного матеріалу $V_{пм3} = 6 - 5,45 = 0,55$ л.

Для отримання посівного апарату об'ємом 0,55 л можна використати колби качалочні на 0,75 л, при коефіцієнті заповнення 0,2 та потенційних втратах при вирощуванні, прийнятих 1 %, нам потрібен загальний об'єм культуральної

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		34

рідини на виході з цих колб $V_{кр4} = 0,55 / 0,99 = 0,61$ л, а об'єм живильного середовища дорівнює $V_{жс4} = 0,61 / 1,1 = 0,55$ л та об'єм посівного матеріалу $V_{пм4} = 0,61 - 0,55 = 0,06$ л.

Кількість колб на цій стадії: $0,61 / (0,75 \cdot 0,2) = 4$.

Склад живильного середовища на різних стадіях масштабування різний: на стадіях вирощування продуцента у колбах та посівному апараті використовується середовище №1, склад якого наведений у табл. 3.1, на стадіях вирощування продуцента у інокуляторі та головному апараті використовується середовище №2, склад якого наведений у табл. 3.2.

Згідно з наведеними розрахунками на 1 серію продукту потрібно середовища №1 $0,55 + 5,45 = 6$ л. З врахуванням втрат при приготуванні та подачі середовища до колб і апараті 5 %, загальна потреба у середовищі №1 6,3 л. Розрахунок компонентів на приготування цього об'єму середовища №1 наведено у табл. 3.1.

Згідно з наведеними розрахунками на 1 серію продукту потрібно середовища №2 $53,5 + 536 = 589,5$ л. З врахуванням втрат при приготуванні та подачі середовища до інокулятора та ферментера 5 %, загальна потреба у середовищі №2 619 л, але до ферментера ще протягом культивування додають підживлення, тому кількість середовища №2 буде менша.

Протягом культивування до ферментера додають підживлення, склад якого наведено у табл. 3.3. Кількість підживлення залежить від рівня глюкози у середовищі, додається поступово при його зниженні, в середньому до 25 % від середовища в апараті, це в середньому 134 л. З врахуванням 5 % втрат потрібно 140,7 л. Тоді кількість середовища №2 дорівнює 478,3 л. Розрахунок компонентів на приготування цього об'єму середовища №2 наведено у табл. 3.2, підживлювача у табл. 3.3.

Для коригування рН (до 7,5) використовують 25 % розчин гідроксиду амонію, на 1 серію потрібно близько 5 л. Для контролювання піноутворення

використовують піногасник «Пропінол Б400» у кількості приблизно 0,5 % від культуральної рідини у апаратах. Кількість піногасника наведено у табл. 3.1, 3.2. Таблиця 3.1 – Витрати компонентів живильного середовища №1 на 1 серію (цикл ферментації)

Компонент	Вміст	
	г/дм ³ (на 1 л середовища)	г/дм ³ (на 1 серію рибофлавіна – 6,3 л)
Меляса	30	189
Кукурудзяний екстракт	15	94,5
Амоній сірчаноокислий	4	25,2
Магній сірчаноокислий	0,5	3,15
Вода питна	950,5	5988,15
Пропінол Б400		0,2

Таблиця 3.2 – Витрати компонентів живильного середовища №2 на 1 серію (цикл ферментації)

Компонент	Вміст	
	г/дм ³ (на 1 л середовища)	г/дм ³ (на 1 серію рибофлавіна – 478,3 л)
Дріжджі хлібопекарські сухі	65	31089,5
Кукурудзяний екстракт	25	11957,5
Амоній сірчаноокислий	10	4783
Калій ортофосфорний	6,25	2989,375
Магній сірчаноокислий	2,5	1195,75
Вода питна	891,25	426284,875
Пропінол Б400		2,4

Таблиця 3.3 – Витрати підживлення на 1 серію (цикл ферментації)

Компонент	Вміст	
	г/дм ³ (на 1 л середовища)	г/дм ³ (на 1 серію рибофлавіна – 140,7 л)
Глюкоза	638,3	89808,81
Дріжджі хлібопекарські сухі	17,0	2391,9
Кукурудзяний екстракт	21,3	2996,91
Вода питна	323,4	45502,39

Загальний матеріальний баланс компонентів на 1 серію виробництва рибофлавіну наведено у табл. 3.4.

Таблиця 3.4 – Витрати компонентів на 1 серію виробництва рибофлавіну

Компонент	Витрати, г
Меляса	189
Кукурудзяний екстракт	15048,91
Амоній сірчаноокислий	4808,2
Магній сірчаноокислий	1198,9
Дріжджі хлібопекарські сухі	33481,4
Калій ортофосфорний	2989,375
Глюкоза	89808,81
Пропінол Б400	2,65
Гідроксид аміаку	125
Вода питна	477775,415

3.2 Розрахунок і вибір обладнання

Попередніми дослідженнями розраховане наступне обладнання, необхідне для вирощування продуцента для отримання рибофлавіну: ферментер на 1000 л, інокулятор на 100 л, посівний апарат на 10 л, 4 качалочні колби на 0,75 л.

Розрахуємо реактори необхідні для приготування середовищ №1 та 2 та розчину підживлення. Середовище № 1 пропонується готувати у флаконах та стерилізувати в автоклаві при 121 С, 40 хв. Для середовища №2 потрібен реактор об'ємом $478,3 / 0,7 = 613,3$ л, номінальним об'ємом згідно з табличними даними $V_{P1} = 0,63$ м³. Для підживлюючого розчину потрібен реактор об'ємом $140,7 / 0,7 = 201$ л, номінальним об'ємом згідно з табличними даними $V_{P2} = 0,25$ м³.

Для кожного з апаратів згідно з табличними даними наведемо основні їхні параметри.

Ферментер: номінальний об'єм $V_H = 1,0$ дм³, діаметр апарата $D = 1200$ мм, площа поверхні теплообміну сорочки $F_p = 3,4$ м², площа поверхні теплообміну змійовика $F_z = 2,8$ м², діаметр валу мішалки $d_v = 50, 65$ мм, висота рівня рідини $H_{ж} = 0,76$ м ($\phi = 0,75$), $H_{ж} = 0,54$ м ($\phi = 0,5$).

Інокулятор: номінальний об'єм $V_H = 0,1$ дм³, діаметр апарата $D = 500$ мм, площа поверхні теплообміну сорочки $F_p = 0,7$ м², діаметр валу мішалки $d_v = 40$ мм, висота рівня рідини $H_{ж} = 0,42$ м ($\phi = 0,75$), $H_{ж} = 0,29$ м ($\phi = 0,5$).

Реактор (для середовища №2): номінальний об'єм $V_H = 0,63$ дм³, діаметр апарата $D = 1000$ мм, площа поверхні теплообміну сорочки $F_p = 2,5$ м², діаметр валу мішалки $d_v = 40, 50, 65$ мм, висота рівня рідини $H_{ж} = 0,68$ м ($\phi = 0,75$), $H_{ж} = 0,48$ м ($\phi = 0,5$).

Реактор (для підживлюючого розчину): номінальний об'єм $V_H = 0,25$ дм³, діаметр апарата $D = 700$ мм, площа поверхні теплообміну сорочки $F_p =$

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						38
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1,3 м², діаметр валу мішалки $d_v = 40$ мм, висота рівня рідини $H_j = 0,5$ м ($\varphi = 0,75$), $H_j = 0,38$ м ($\varphi = 0,5$).

Важливим конструктивним елементом ємнісного обладнання (реакторів, ферментерів) є перемішувачий пристрій. Проведемо обґрунтування вибору та розрахунок потрібної мішалки для кожного типу обладнання.

Взагалі для перемішування в ємнісних апаратах, в яких здійснюється перемішування рідких середовищ, можливе використання таких методів:

1. Пневматичне (барботажне) перемішування виконується за допомогою стисненого газу (зазвичай повітря), що подається через шар рідини. Для рівномірного розподілу газу використовують барботер – систему перфорованих труб, розташованих у днищі змішувача. Інтенсивність процесу визначається об'ємом газу, що подається через одиницю вільної поверхні рідини за певний час. Цей метод має обмежене застосування і використовується лише тоді, коли контакт рідини з газом є прийнятним. Але застосування барботера є обґрунтованим у ферментерах для вирощування аеробних продуцентів, тоді до апарату через барботажні пристрої нагнітають стерильне повітря.

2. Циркуляційне перемішування виконується за допомогою насоса, який забезпечує циркуляцію рідини через замкнену систему (змішувач-насос-змішувач). Ефективність залежить від кратності циркуляції – відношення об'єму рідини, прокачаного насосом за одиницю часу, до загального об'єму рідини. Цей метод підходить для систем, що потребують відведення тепла через виносний теплообмінник. Для великих об'ємів живильних середовищ, в яких відбувається інтенсивне вирощування мікроорганізмів, часто виникає необхідність відведення тепла, що утворюється в процесі життєдіяльності продуцентів.

3. Механічне перемішування передбачає передачу енергії безпосередньо в середовище за допомогою мішалок, які можуть мати різні конструкції і швидкості обертання. Мішалка складається з вала, лопатей та приводу.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

Завдяки простоті конструкції і широкій різноманітності типів, механічне перемішування є універсальним для рідин різної в'язкості.

Для реакторів для приготування живильного середовища та розчину підживлювача обираємо перемішування за допомогою мішалки. Типовими перемішувачами для ємнісного обладнання за конструкцією є: лопатеві, якірні, рамні, турбінні, трьохлопатеві (пропелерні), існують також спеціальні мішалки; залежно від умов всередині апарату можливі комбінації мішалок.

Мішалки діляться на тихохідні (лопатеві, рамні, якірні, листові – до 80-100 об/хв) та швидкохідні (турбінні, пропелерні), які забезпечують ламінарний або турбулентний режими відповідно.

Принципи вибору різних типів мішалок для реакторів при приготуванні живильних середовищ залежить від сукупності факторів: характеристики рідини, режиму перемішування, цілі процесу, об'єму обладнання, конструктивних особливостей, матеріалу, енергозатратам, експлуатаційним вимогам.

Серед характеристики рідини важливими є в'язкість та гомогенність середовища. Для малов'язких рідин (наприклад, водних розчинів) використовують швидкохідні мішалки, такі як пропелерні або турбінні. Для середовищ із середньою або високою в'язкістю (гель, суспензії) застосовують тихохідні мішалки – якірні, рамні або лопатеві. Для рівномірного розподілу твердих частинок у суспензіях підходять турбінні або пропелерні мішалки.

Потрібно також враховувати режим перемішування – ламінарний або турбулентний. При ламінарному режимі використовують тихохідні мішалки (лопатеві, рамні), якщо необхідно уникати турбулентності, турбулентний режим - швидкохідні мішалки (турбінні, пропелерні) підходять для середовищ, які потребують інтенсивного змішування.

При виборі також потрібно враховувати ціль процесу. Якщо ціль - розчинення речовин, то можливе обрання пропелерної мішалки, що

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						40
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

забезпечуює інтенсивне перемішування, прискорюючи розчинення. Якщо потрібно забезпечити теплообмін, то турбінні або якірні мішалки підходять для забезпечення рівномірного розподілу тепла в реакторі. Для аерації, введення газу в рідину (наприклад, кисню для аерації) використовують турбінні або пропелерні мішалки.

Об'єм ємнісного обладнання також враховується при виборі перемішуючого пристрою. У великих реакторах переважно використовують багаторівневі мішалки для забезпечення рівномірного перемішування по всьому об'єму. У малих реакторах можуть бути ефективними прості конструкції, як-от лопатеві мішалки.

Конструктивні особливості обладнання також враховуються. Зокрема форма реактора - жля вузьких і високих реакторів краще підходять пропелерні або турбінні мішалки, які забезпечують вертикальну циркуляцію. Якщо потрібно уникнути локального перегріву, вибирають якірні або рамні мішалки.

Важливо, щоб мішалка була виготовлена з матеріалу, стійкого до агресивного середовища або біологічно активних речовин, що входять до складу живильного середовища.

Для зменшення енергоспоживання вибирають мішалки оптимальної потужності для заданого об'єму і типу середовища.

Важливими є експлуатаційні вимоги. Зокрема, мішалка повинна бути простою в обслуговуванні, легко підлягати очищенню та стерилізації (особливо у біотехнологічних процесах).

Дотримуючись цих принципів, можна підібрати оптимальний тип мішалки для забезпечення ефективного перемішування при приготуванні живильних середовищ та забезпеченні вирощування продуцентів.

Для реактору для приготування підживлюючого розчину на 250 л обираємо лопатеву мішалку (рис. 3.1), яка буде забезпечувати рівномірне перемішування компонентів при швидкості від 100 об/хв.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						41
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

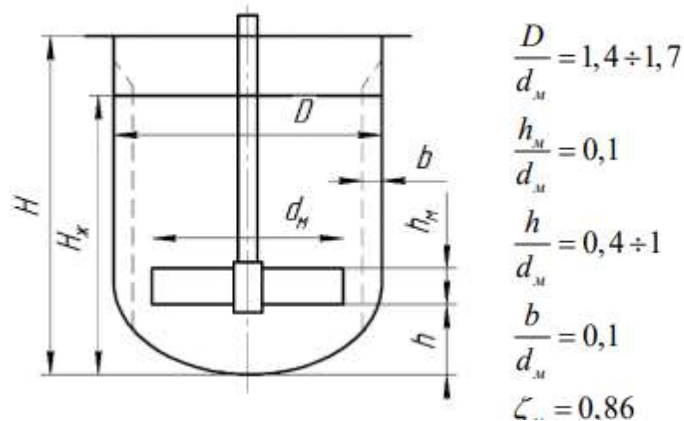


Рис. 3.1 – Лопатева мішалка та її основні параметри для розрахунків

Як апарат для приготування підживлювача обираємо реактор вітчизняного виробника фірми Промвіт - Реактор РС-250. Обігрів корпусу реактора відбувається за рахунок дозованої подачі пари через пропорційний клапан, керований ПІД-регулятором. Реактор оснащений мішалкою лопатевою з 1-ним знімним ротором; швидкість обертання мішалки, плавно регульована, - 0÷300 об/хв; вал мішалки ущільнюється подвійним торцевим ущільненням із незалежною системою мастила та охолодження. Пульт керування оснащений: кнопками "Пуск-Стоп" мішалки; ручкою регулювання обертів мішалки; дисплеєм із показаннями оборотів мішалки; дисплеєм із показаннями датчика рівня; ПІД-регулятором для регулювання температури продукту; архіватором для архівування всіх технологічних параметрів процесу.

Конструктивні характеристики реактора: робочий об'єм - 250 л, корпус на 4-х стійках з приварним еліптичним днищем та відокремленою еліптичною кришкою, тиск у корпусі - від - 0,7 до + 2,0 бар; температура в корпусі - від 15 до 95 С; тиск у сорочці - до 3,0 бар; температура в сорочці - до 140 С; сорочки корпусу теплообмінна та теплоізолююча. Обігрів корпусу реактора відбувається за рахунок дозованої подачі пари через пропорційний клапан, керований ПІД-регулятором. Мішалка лопатева з 1-ним знімним ротором, швидкість обертання мішалки, плавно регульована, - 0÷300 об/хв; вал мішалки

ущільнюється подвійним торцевим ущільненням з незалежною системою змащення та охолодження. Оснащення кришки: оглядове вікно Dn 100 зі склоочисником та ліхтарем підсвічування, мановакуумметр - штуцер Dn 32, мийна головка Dn 25, клапан запобіжний Dn 25, подача вакууму – штуцер Dn 25 с краном – повітря, подача інертного газу – штуцер Dn 25, патрубок дихального фільтра Dn 25, технологічний штуцер Dn 40 з кульовим вентилям та лійкою об'ємом 10 л, штуцер установки магнітострикційного датчика рівня Dn 65, штуцер резервний Dn 25. Оснащення бічної поверхні: пробовідбірник типу «keofit» виробництва ТМ «ПРОМВІТ» Dn 5. Оснащення днища: мембранний клапан із ручним механізмом відкриття вентиля Dn 25, датчик температури ТСП - встановлена потужність 1,5 кВт. Матеріали виготовлення: в контакт з продуктом сталь AISI 316 L (03X17H9M2), не в контакт з продуктом сталь AISI 304 (07X17H9). Чистота обробки поверхонь реактора: у контакт з продуктом $Ra \leq 0,6$, зовнішні поверхні $Ra \leq 0,8$, зовнішніх зварних швів $Ra \leq 1,6$. Габаритні розміри, не більше: довжина 1420 мм, ширина 1310 мм, висота 1630 мм. Маса нетто 265 кг.

Як апарат для приготування живильного середовища №2 обрано реактор об'ємом 630 л, як перемішувачий пристрій – турбінна мішалка зі швидкістю процесу 200 об/хв (рис. 3.2). Обираємо реактор на 630 л з введенням сипких компонентів в потоці рідини і гомогенного перемішування в результаті рециркуляції продукту між ємністю і пристроєм продуктивністю введення до 1500 кг/год вітчизняного виробника фірми Промвіт. Пристрій введення складається з відцентрового насоса спеціальної конструкції, системи вентури на всмоктуванні та вирви з приймальним столом та дисковим затвором для регулювання подачі сипких компонентів. У цій конструкції сипучі компоненти рухаються вертикально з лійки, а вентурі розміщена горизонтально. Вакуум створюється біля основи вирви, сипучі компоненти подаються в потік рідини, проходять через корпус насоса і трубопроводом подаються в корпус реактора, в якому працює 2-ярусна мішалка турбінна. Час

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

рециркуляції продукту, обороти насоса та мішалки реактора підбираються індивідуально залежно від властивостей компонентів продукту, розчинності сипких компонентів та їх кількості.

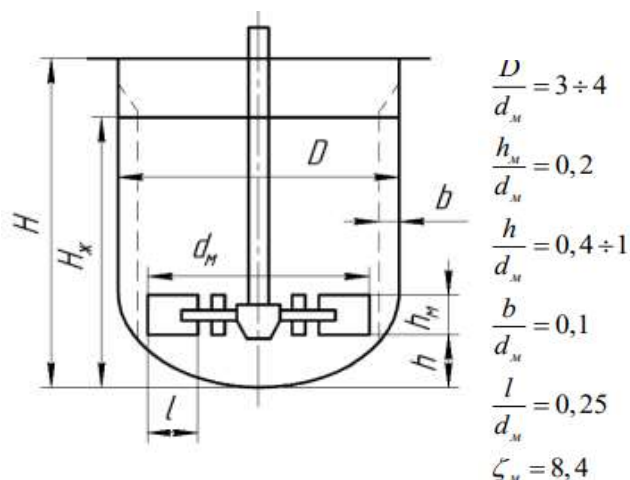


Рис. 3.2 – Турбінна мішалка та її основні параметри для розрахунків

Для вирощування продуцента обираємо ферментер на 1000 л та інокулятор на 100 л фірми FlyCheng, Китай. Корпус резервуара, виготовлений SS316 і SS304, розрахунковий тиск резервуара 0,3 МПа, розрахунковий тиск сорочки 0,35 МПа. Механічний привід у верхній/нижній частині або магнітний привід у верхній частині, шестилопатева трьохярусна мішалка з регульованою висотою. Швидкість перемішування: 50-1000 об/хв / 50-400 об/хв.

Згідно з проведеним вище аналізом перемішуючих пристроїв для робочого ферментера пропонуємо трьохлопастну мішалку

Для цього апарату визначемо конструктивні параметри мішалки та днища.

Діаметр мішалки дорівнює $d_m = D / 1,4 - D / 1,7 = 1200/1,4 - 1200/1,7 = 857 - 705$ мм. Стандартне значення діаметра мішалки $d_m = 800$ мм. Висота кожної лопаті мішалки $h_m = 0,1 * d_m = 0,1 * 800 = 80$ мм. Відстань до стінки апарата $b = 0,1 * d_m = 0,1 * 80 = 8$ мм.

При базовому розміру днища $D_{\text{дн}} = 1200$ мм, $h_{\text{дн}} = 300$ мм, площа внутрішньої поверхні днища $F_{\text{дн}} = 1,66 \text{ м}^2$, ємність днища $V_{\text{дн}} = 255 \text{ м}^3$.

3.3 Опис технологічного процесу

Виробництво рибофлавіну як субстанції для виробництва комплексних вітамінних дієтичних добавок містить стадії:

Передферментаційні стадії:

- підготовка сировини;
- підготовка робочих розчинів (розчини гідрокиду аміаку, оцтової кислоти, етилацетату);
- підготовка піногасника;
- приготування живильного середовища №1;
- приготування живильного середовища №2;
- приготування підживлюючого розчину;

Ферментаційні стадії:

- підготовка посівного матеріалу;
- вирощування продуцента у колбах;
- вирощування продуцента у посівному апараті;
- вирощування продуцента у інокуляторі;
- вирощування продуцента у ферментері;

Післяферментаційні стадії:

- концентрування рибофлавіну;
- центрифугування суспензії рибофлавіну;
- автоліз осаду рибофлавіну;
- центрифугування автолізату рибофлавіну;
- сушка кристалів рибофлавіну;

Отримання товарної форми дієтичної добавки:

- упакування субстанції рибофлавіну;
- змішування активних компонентів дієтичної добавки;
- приготування дражувальної маси;

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						45
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- отримання драже;
- фасування драже;
- упакування драже.

Основним стадіям технологічного процесу передують підготовка виробництва, обладнання, приміщень, персоналу. Обов'язковими є підготовчі стадії приготування миючих розчинів, дезінфікуючих розчинів, санітарна обробка обладнання та його стерилізація, підготовка стерильного повітря, які описані у загальній документації підприємства.

Стадія 1 Підготовка сировини.

Підготовка сировини включає етапи прийому всіх компонентів за якістю сертифікатів виробників та зважування за кількістю згідно з розрахованим матеріальним балансом.

Стадія 2. Приготування робочих розчинів.

У окремих збірниках змішувачах готують розчин гідроксиду аміаку 25 %, який використовується для доведення рН живильного середовища до 7,5, гідросульфату натрію, який використовується для відновлення рибофлавіну при його осадженні, 1,5 % розчин оцтової кислоти для автолізу рибофлавіну, 0,7 % розчин етилацетату для автолізу рибофлавіну.

Стадія 3. Підготовка піногасника.

Зважений пропінол Б400 стерилізують в автоклаві при температурі 120 С 30 хв та передають на стадії вирощування продуцента. Подача здійснюється з бачка автоматично з пульта керування інокулятора та ферментера.

Стадія 4. Приготування живильного середовища №1.

Зважені компоненти живильного середовища №1 згідно з розрахованими значеннями матеріального балансу завантажують до реактору, включають подачу води очищеної із мірника, після виключення подачі води, вмикають мішалку 100 об/хв. Включають подачу пари до сорочки та стерилізують середовище при 121 С протягом 40 хв. Охолодження середовища

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

здійснюється подачею холодної води до сорочки. Охолоджене середовище №1 подається до колб та посівного апарату.

Стадія 5. Приготування живильного середовища №2

Зважені компоненти живильного середовища №2 згідно з розрахованими значеннями матеріального балансу завантажують до реактору, включають подачу води очищеної із мірника, після виключення подачі води, вмикають мішалку 200 об/хв. Включають подачу пари до сорочки та стерилізують середовище при 121 С протягом 40 хв. Охолодження середовища здійснюється подачею холодної води до сорочки. Охолоджене середовище №2 подається до інокулятора та ферментеру.

Стадія 6. Приготування підживлюючого розчину

Зважені компоненти підживлюючого розчину згідно з розрахованими значеннями матеріального балансу завантажують до реактору, включають подачу води очищеної із мірника, після виключення подачі води, вмикають мішалку 200 об/хв. Включають подачу пари до сорочки та стерилізують середовище при 121 С протягом 40 хв. Охолодження розчину здійснюється подачею холодної води до сорочки. Охолоджений підживлюючий розчин подається до ферментеру при постійному вимірюванні глюкози.

Стадія 7. Підготовка посівного матеріалу

Культуру *B. subtilis* IFBG NTG2 у виробничій лабораторії з пробірки на скошеному агарі пересівають на чашки Петрі та пробірки з агаром для контролю чистоти та властивостей культури та для подальших пересівів та зберігання культури.

Стадія 8. Вирощування продуцента у колбах

До культури *B. subtilis* IFBG NTG2 у пробірці на скошеному агарі в асептичних умовах додають стерильний фізіологічний розчин. Відбирають суспензію та засівають до 4 качалочних колб об'ємом 0,75 л із 0,55 л живильного середовища №1 кожна. Вирощують у термостаті на качалці при струшуванні 200 об/хв при 37 С протягом 24 год.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						47
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Стадія 9. Вирощування продуцента у посівному апараті

Культуральну рідину із колб загальним об'ємом 0,55 л подають до посівного апарату на 10 л із 5,45 л живильного середовища №1. Вирощують при 37 С протягом 24 год.

Стадія 10. Вирощування продуцента у інокуляторі

Культуральну рідину із посівного апарату загальним об'ємом 5,4 л подають до інокулятора на 100 л із 53,5 л живильного середовища №2. Аерацію здійснюють подачею стерильного стиснутого повітря. Температуру в апараті підтримують подачею гарячої води до сорочки. Перемішують мішалкою при 200 об/хв. При утворенні піни автоматично подається стерильний піногасник, при зниженні рН нижче 7,2 – гідроксид аміаку. Протягом культивування відбираються проби на контроль відсутності сторонньої мікрофлори та кількості рибофлавіну. Вирощують при 37 С протягом 48 год.

Стадія 11. Вирощування продуцента у ферментері

Культуральну рідину із інокулятора загальним об'ємом 53 л подають до ферментером на 1000 л із 536 л живильного середовища №2. Аерацію здійснюють подачею стерильного стиснутого повітря. Температуру в апараті підтримують подачею гарячої води до сорочки. При утворенні піни автоматично подається стерильний піногасник, при зниженні рН нижче 7,2 – гідроксид аміаку. Протягом культивування відбираються проби на контроль відсутності сторонньої мікрофлори та кількості рибофлавіну та глюкози. При зниженні рівня глюкози включають подачу підживлюючого розчину. Перемішують мішалкою при 200 об/хв. Вирощують при 37 С протягом 68 год. Культуральну рідину у кількості 530 л перекачують до збірника.

Стадія 12. Концентрування рибофлавіну

Концентрування рибофлавіну здійснюють шляхом осадження розчином гідросульфітом натрію, який додають до збірника з культуральною рідиною.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

Надосадову рідину зливають, а суспензію осаду із рибофлавіном передають на центрифугування.

Стадія 13. Центрифугування суспензії рибофлавіну

Із збірника суспензію подають на центрифугу, центрифугування здійснюють при 1000 об/хв протягом 40 хв. Фугат зливають, а осад передають на автоліз.

Стадія 14. Автоліз осаду рибофлавіну

До збірника з осадом рибофлавіну додають 1,5 % оцтової кислоти та 0,7 % розчин етилацетату. Перемішування здійснюють мішалкою при 100 об/хв, температуру у збірнику підтримують 45 С подачею гарячої води до сорочки. Процес триває 24 год. Отриманий автолізат передають до центрифуги.

Стадія 15. Центрифугування автолізату рибофлавіну

Із збірника суспензію подають на центрифугу, центрифугування здійснюють при 1000 об/хв протягом 40 хв. Фугат зливають, а осад передають до ліофільної сушарки.

Стадія 16. Сушка кристалів рибофлавіну

Осад передають до ліофільної сушарки, процес заморожування ведуть при -40 С, сушка при +60С та вакуумі 112 Па протягом 48 год. Сухий порошок передають на фасування та на отримання дієтичних добавок.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						49
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.4 Схеми виробництва

Біологічна схема виробництва субстанції рибофлавіна представлена на рис. 3.3.

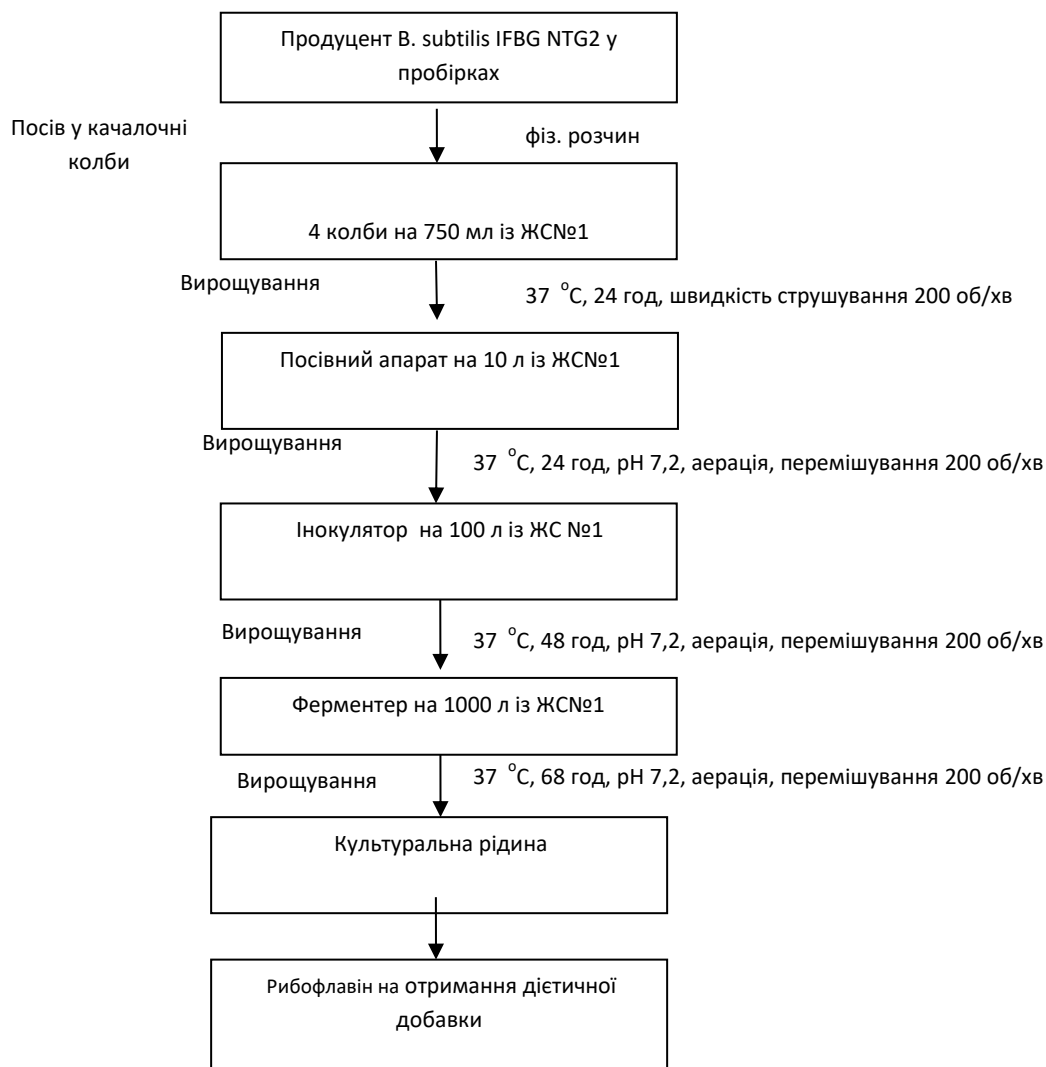


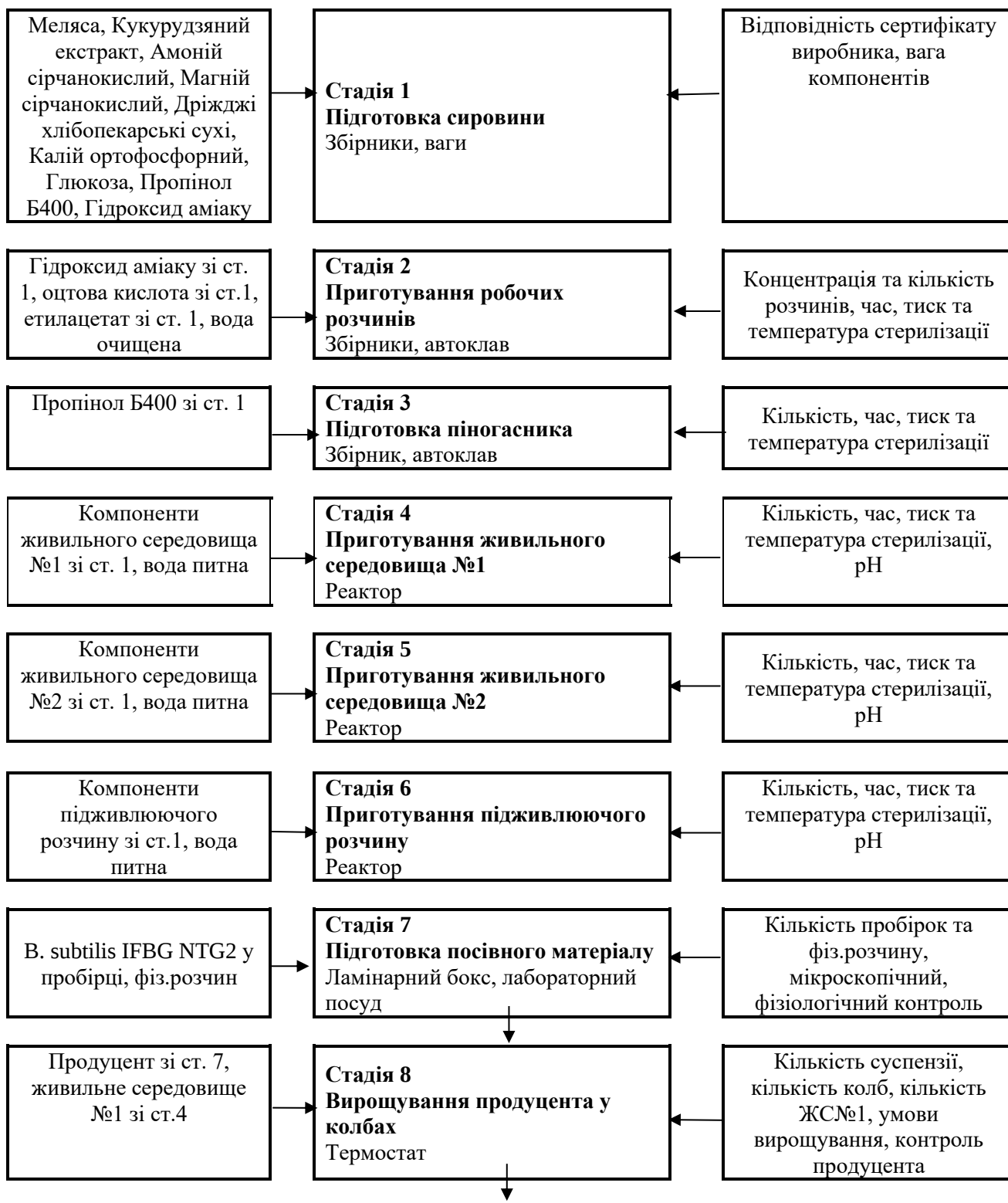
Рис. 3.3 – Біологічна схема отримання рибофлавіну

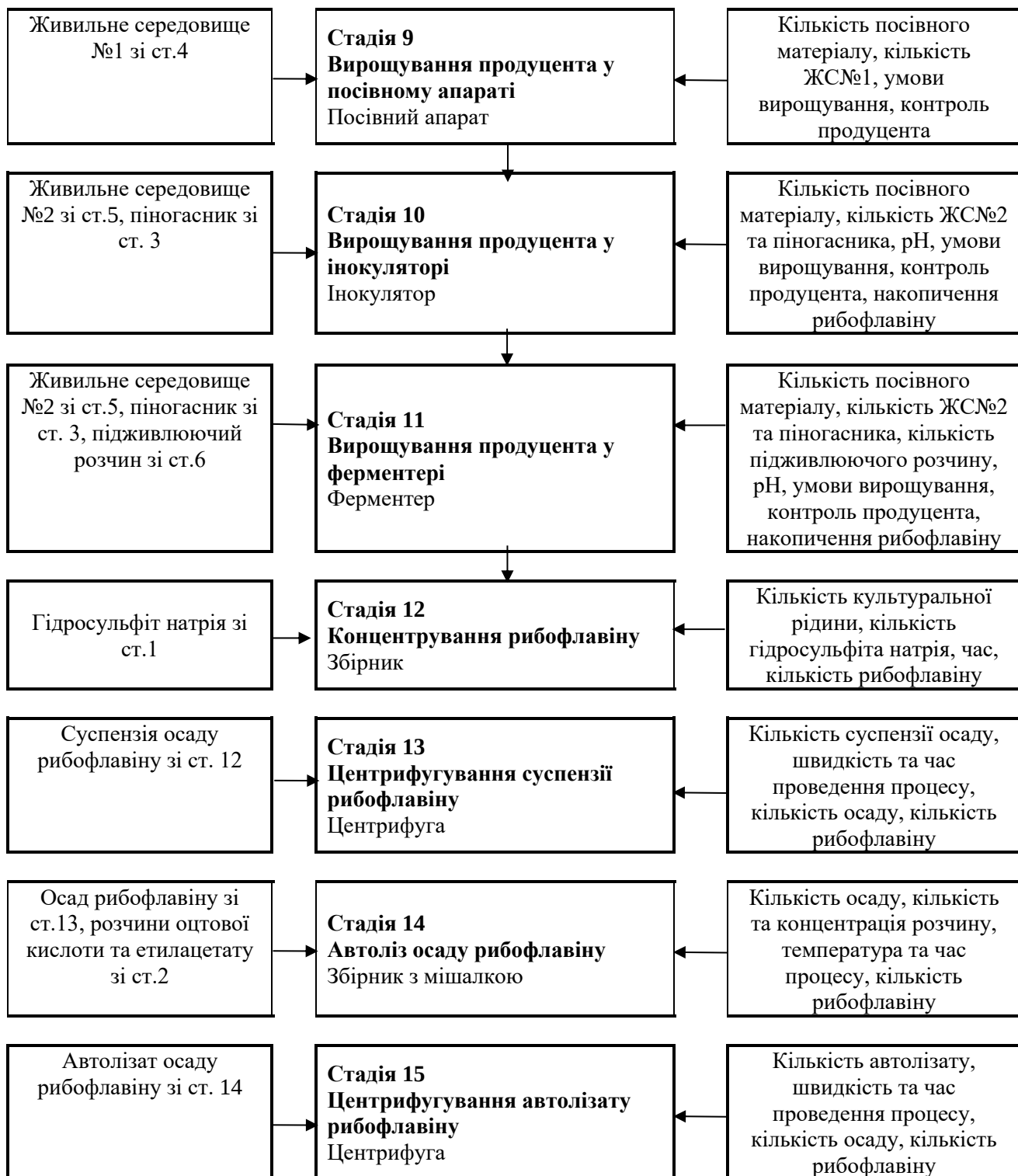
Технологічна схема виробництва субстанції рибофлавіну представлена на рис. 3.4.

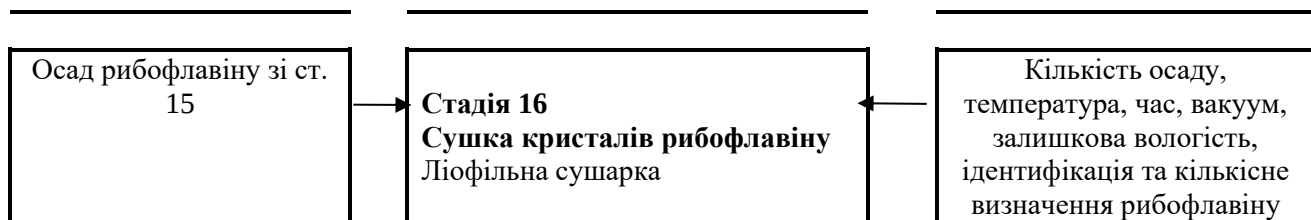
*Вихідна сировина,
проміжна продукція та
матеріали*

Виробництво рибофлавіну

*Контроль у процесі
виробництва*



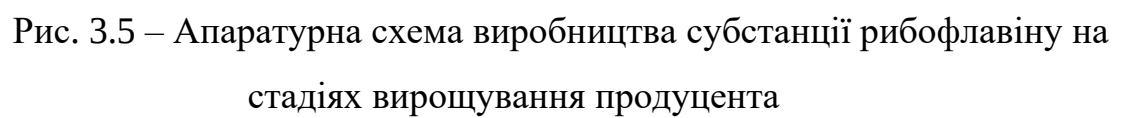




Ліофілізований порошок рибофлавіну на отримання дієтичної добавки

Рис. 3.4 - Технологічна схема виробництва субстанції рибофлавіну для отримання дієтичної добавки

Апаратурну схему виробництва рибофлавіна на стадіях вирощування продуцента представлено на рис. 3.5. Креслення апаратурної схеми наведено в додатку.



162.01.12.00 000 ПЗ

Специфікація обладнання, що використовується у виробництві рибофлавіну на стадіях вирощування продуцента, представлена у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5 – Специфікація обладнання виробництва рибофлавіна

Поз.	Позначення	Найменування	Кільк.	Маса, кг	Примітка
1	2	3	4	5	6
П 1		Пробірка лабораторна, 10x100 мм, Чехія ТС	4		Скло
К 2		Колби качалочні 750 мл, горло 45 мм, Simax	4		Скло
ПС 3		Посівний апарат 10 л, діаметр 350 мм, висота 600 мм, мішалка швидкість 2-1000 об/хв, виробник Biostat	1	30	AISI304
Н 4, Н6, Н8		Насос відцентровий, 36 Вт, 500 год, виробник Jеbaо	3		
І 5		Інокулятор 100 л, тиск резервуара 0,3 МПа, тиск сорочки 0,35 МПа, мішалка швидкість 50-1000 об/хв, виробник FlyCheng, Китай	1	220	SS316, SS304
Ф 7		Ферментер 1000 л, тиск резервуара 0,3 МПа, тиск сорочки 0,35 МПа, мішалка швидкість 50-1000 об/хв, виробник FlyCheng, Китай	1	350	SS316, SS304
М1.1-1.3		Дозатор об'ємний, ваговий, продуктивність 0,1-600 кг/год	3		Н/сталь 12Х18Н 9Т

3.5 Критичні параметри виробництва

У табл. 3.6 представлені контроль критичних параметрів на стадіях вирощування продуцента.

Таблиця 3.6 – Контроль критичних параметрів

Номер	Критичні точки (критичні стадії, операції)	Критичні параметри і критичні характеристики якості	Одиниця виміру	Значення критерію
1	2	3	4	5
К 7.1-7.5	Стадія 7. Підготовка посівного матеріалу	1. кількість пробірок 2. кількість фіз.розчину 3. мікроскопічний контроль 4. фізіологічний контроль 5. чистота	1. шт 2. мл 3. – 4. – 5. -	1. 4 2. 10 3. грампозитивні палички, 0,4-2,0 x 1,3-5,0 мкм, джгутики 4. амебоподібні колонії темно-жовті, арабіноза і маніт зниження рН, гідролізація крохмалю, засвоєння цукрів 5. відсутність інших клітин
К 8.1-8.10	Стадія 8 Вирощування продуцента у колбах	1 кількість суспензії 2. кількість колб 3. кількість ЖС 1 4. час вирощування 5. температура вирощування 6. рН 7. перемішування 8. мікроскопічний контроль 9. фізіологічний контроль 10. чистота	1. мл 2. шт 3. л 4. год 5. С 6. - 7. об/хв 8. - 9. - 10. – 11. -	1. 0,5 2. 4 3. 0,55 4. 24 5. 37 6. 7,2 7. 200 8. грампозитивні палички, 0,4-2,0 x 1,3-5,0 мкм, джгутики 9. амебоподібні колонії темно-жовті, арабіноза і маніт зниження рН, гідролізація крохмалю, засвоєння цукрів 10. відсутність

				інших клітин
К 9.1-9.10	Стадія 9 Вирощування продуцента у посівному апараті	1 кількість посівного матеріалу 3. кількість ЖС 2 4. час вирощування 5. температура вирощування 6. рН 7. перемішування 8. мікроскопічний контроль 9. фізіологічний контроль 10. чистота	1. л 3. л 4. год 5. С 6. - 7. об/хв 8. - 9. - 10. - 11. -	1. 0,55 3. 5,45 4. 24 5. 37 6. 7,2 7. 200 8. грампозитивні палички, 0,4-2,0 х 1,3-5,0 мкм, джгутики 9. амебоподібні колонії темно- жовті, арабіноза і маніт зниження рН, гідролізація крохмалю, засвоєння цукрів 10. відсутність інших клітин
К 10.1-10.10	Стадія 10 Вирощування продуцента у інокуляторі	1 кількість посівного матеріалу 2. кількість підживлювача 3. кількість ЖС 2 4. час вирощування 5. температура вирощування 6. рН 7. перемішування 8. мікроскопічний контроль 9. фізіологічний контроль 10. чистота	1. л 3. л 4. год 5. С 6. - 7. об/хв 8. - 9. - 10. - 11. -	1. 5,4 3. 53,5 4. 48 5. 37 6. 7,2 7. 200 8. грампозитивні палички, 0,4-2,0 х 1,3-5,0 мкм, джгутики 9. амебоподібні колонії темно- жовті, арабіноза і маніт зниження рН, гідролізація крохмалю, засвоєння цукрів 10. відсутність інших клітин
К 11.1-11.10	Стадія 11 Вирощування продуцента у ферментері	1 кількість посівного матеріалу 2. кількість підживлювача 3. кількість ЖС 2 4. час вирощування 5. температура вирощування	1. л 2. л 3. л 4. год 5. С 6. - 7. об/хв 8. - 9. - 10. -	1. 53 2. 140,7 3. 478,3 4. 68 5. 37 6. 7,2 7. 200 8. грампозитивні палички, 0,4-2,0 х 1,3-5,0 мкм,

		6. рН 7. перемішування 8. мікроскопічний контроль 9. фізіологічний контроль 10. чистота	11. -	джгутики 9. амебоподібні колонії темно-жовті, арабіноза і маніт зниження рН, гідролізація крохмалю, засвоєння цукрів 10. відсутність інших клітин
--	--	---	-------	---

3.6 Екологічні аспекти виробництва

Виробництво вітамінів за допомогою мікробної ферментації є процесом, який пропонує кілька екологічних переваг порівняно з традиційним хімічним синтезом. Ці аспекти підкреслюють потенціал стійкості та зменшення впливу на навколишнє середовище.

Виробництво рибофлавіна на основі вирощування продуцента позитивно вплине на зменшення споживання ресурсів, зокрема, забезпечить нижче споживання енергії (мікробна ферментація зазвичай відбувається за температури та тиску при низьких температурах, споживаючи значно менше енергії, ніж умови високої температури та високого тиску, які часто необхідні для хімічного синтезу), мінімальне використання сировини (ферментація покладається на відновлювану сировину, таку як цукор, отриманий із сільськогосподарської біомаси, замість невідновлюваних нафтохімічних ресурсів)

Також слід відмітити і біорозкладаність побічних продуктів та зменшення використання токсичних хімічних речовин. Побічні продукти ферментації, як правило, біологічно розкладаються та є менш небезпечними, зменшуючи навантаження на системи управління відходами та ризики забруднення навколишнього середовища. Традиційний хімічний синтез часто передбачає використання токсичних реагентів і розчинників. Мікробна

ферментація усуває або значно зменшує потребу в цих шкідливих речовинах, що призводить до більш чистих методів виробництва.

Процеси ферментації можуть використовувати сільськогосподарські відходи або побічні продукти (наприклад, патоку, кукурудзяний розчин) як сировину, сприяючи принципам циклічної економіки та зменшуючи проблеми з утилізацією сільськогосподарських відходів. Методом мікробного синтезу виробляється менше парникових газів у порівнянні зі звичайними методами, особливо при живленні відновлюваних джерел енергії.

Децентралізований характер процесів бродіння дозволяє локально виробляти вітаміни, зменшуючи транспортні викиди, пов'язані з глобальними ланцюгами поставок.

Уможливорюючи використання стійкої сировини та зменшуючи залежність від нафтохімікатів, мікробна ферментація підтримує екологічно чисті методи сільського господарства.

Інтегруючи мікробну ферментацію у виробництво вітамінів, галузі можуть значно зменшити свій вплив на навколишнє середовище, одночасно підтримуючи глобальні цілі сталого розвитку.

Виробництво рибофлавіну (вітамін B2) за допомогою мікробної ферментації зазвичай вважається екологічно чистим процесом. Однак, як і будь-який промисловий процес, він може утворювати відходи в газоподібній, рідкій і твердій формах. Належне поводження з цими відходами має вирішальне значення для мінімізації впливу на навколишнє середовище.

Серед газоподібних відходів слід виділити вуглекислий газ, летючі органічні сполуки та оксиди азоту. Вуглекислий газ виробляється під час дихання мікробів при метаболізованні глюкози. Слідові кількості летючих органічних сполук можуть виникати з побічних продуктів бродіння або з розчинників, які використовуються в подальшій обробці. Газоподібні оксиди нітрогену можуть виділятися, якщо багаті азотом компоненти середовища

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
						59
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

метаболізуються або якщо для коригування рН використовуються хімічні речовини на основі азоту.

Для вирішення проблеми з газоподібними викидами рекомендоване використання біофільтрів або скрубєрів для уловлювання та нейтралізації газоподібних викидів та оптимізовані системи аерації для забезпечення контрольованого газообміну

Рідкі відходи включають відпрацьоване живильне середовище, надосадкові рідини при осадженні та центрифугуванні та стічні води після переробки. Після збору рибофлавіну культуральна рідина, що залишилася, містить залишкові поживні речовини, мікробні клітини та побічні продукти. Культуральна рідина може містити невикористані цукри, джерела азоту або фосфати із середовища. Стічні води містять воду, яка використовується для розділення клітин, промивання та очищення продукту. Також сюди відносяться стічні води для регулювання рН - кислоти та луги, які використовуються для підтримки оптимального рН під час вирощування, можуть сприяти утворенню рідких відходів.

Рішенням проблеми поводження з рідкими відходами є очищення стічних вод біологічними, хімічними або фізичними методами та заходи з відновлення та переробки поживних речовин для використання в наступних циклах ферментації.

До твердих відходів при виробництві рибофлавіну мікробним синтезом відносяться залишки біомаси, які містять мертві мікробні клітини, відпрацьовані компоненти середовища та нерозчинні побічні продукти, осад після центрифугування, будь-яка невикористана сировина (наприклад, компоненти живильного середовища), що залишилася в системі, відходи упаковки (ємності або матеріали, що використовуються для зберігання сировини або продуктів).

Заходами по раціональному поводженню з твердими відходами на підприємстві є: компостування або анаеробне зброджування залишків біомаси

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

для отримання біогазу або біодобрив, ефективне використання сировини для мінімізації невикористаної сировини, переробка нешкідливих твердих відходів, впровадження інтегрованого управління відходами: об'єднання потоків відходів для ефективної обробки (наприклад, використання відпрацьованого середовища у виробництві біогазу), повторне використання побічних продуктів як сировини в інших процесах, таких як корм для тварин або виробництво біоенергії.

Застосовуючи належні заходи щодо поводження з відходами та переробки, вплив на навколишнє середовище виробництва рибофлавіну шляхом мікробної ферментації можна мінімізувати.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

ВИСНОВОК

Проведено аналіз ринку дієтичних добавок, що підтвердив високий попит на рибофлавін у харчовій, фармацевтичній, косметичній та ветеринарній галузях.

Виявлено, що в Україні відсутнє власне виробництво рибофлавіну, що створює залежність від імпоротної продукції. Вирішення цієї проблеми сприятиме розвитку вітчизняної біотехнологічної галузі.

У роботі використано штам *Bacillus subtilis* IFBG NTG2, який демонструє високу здатність до синтезу рибофлавіну. Оптимізація умов культивування цього продуцента дозволила досягти підвищення виходу цільового продукту до 19,1 г/л шляхом використання методів індукованого мутагенезу та оптимізації середовища вирощування.

Запропоновано біологічну, технологічну, апаратурну схеми виробництва рибофлавіну, яка включає стадії підготовки живильного середовища, ферментації, виділення та очищення продукту.

Підібрано обладнання, необхідне для впровадження процесу у виробничих умовах.

Впроваджена технологія має низький рівень утворення відходів та мінімальний вплив на довкілля завдяки використанню відновлюваних ресурсів і біологічно безпечного процесу ферментації.

Результати роботи можуть бути впроваджені на фармацевтичних підприємствах для організації власного виробництва рибофлавіну. Це дозволить знизити залежність від імпорту, забезпечити доступність продукції для українських споживачів, а також створити можливість експорту високоякісного вітаміну на міжнародний ринок.

Проведена робота створює основу для подальших досліджень у галузі вдосконалення штамів-продуцентів, а також розробки нових методів отримання рибофлавіну з ще вищим виходом.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

Таким чином, результати кваліфікаційної роботи підтверджують доцільність удосконалення виробництва рибофлавіну на базі вітчизняних підприємств та сприяють сталому розвитку біотехнологічної галузі України.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Алієв А. А. Технологія виробництва рибофлавіну для харчової промисловості. Дільниця підготовки посівного матеріалу : дипломний проект ... бакалавра : 162 Біотехнології та біоінженерія. Київ, 2021. 83 с.
2. Гнатюк М. О. Технологія виробництва вітаміну В2 на глюкозо-фруктозному сиропі. Дільниця підготовки поживного середовища : дипломний проект ... бакалавра : 162 Біотехнології та біоінженерія. Київ, 2020. 109 с.
3. Біотехнологія : підручник / В. Г. Герасименко та ін. ; під общ. ред. В. Г. Герасименка. Київ : Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
4. Буценко Л. М., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів : навч. посіб. Київ : НУХТ, 2010. 323 с.
5. ДСТУ ГОСТ 2.612:2014. Єдина система конструкторської документації. Електронний формуляр. Загальні вимоги. (ГОСТ 2.612–2011, IDT). Офіц. вид. Вперше ; чинний від 2014–11–01. Київ : Мінекономрозвитку України, 2014. 47 с.
6. Каратєєва О. І., Юлевич О. І. Загальна біотехнологія : курс лекцій для здобувачів (короткого циклу) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти. Миколаїв : МНАУ, 2022. 107 с.
7. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л., Бородай В. В., Коломієць Ю. В. Загальна (промислова) біотехнологія : навч. посіб. Київ : ФОП Корзун Д.Ю., 2014. 252 с.
8. Екологічна біотехнологія : навч. посіб. : у 2 кн. / О. В. Швед та ін. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2018. Т. 1. 424 с.
9. Капрельянц Л. В. Теоретичні основи біотехнології : навч. посіб. Харків : Факт, 2020. 296 с.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

10. Красінько В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв : конспект лекцій. Київ : НУХТ, 2019. 252 с.

11. Лазоренко В. В., Белих І. А. Біотехнологія виробництва рибофлавіну з використанням штаму *Bacillus subtilis*. *Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості* : зб. матеріалів ІХ Міжнар. наук.-практ. конф., 18-19 листоп. 2021 г. / ред. кол. Л. Л. ТОВАЖНЯНСКИЙ [та ін.] ; Нац. техн. ун-т "Харків. політехн. ін-т" [та ін.]. Харків : НТУ "ХПІ", 2021. С. 135-136.

12. Методичні рекомендації до виконання кваліфікаційної роботи бакалавра для здобувачів вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ОП «Біотехнологія» / О. С. Калюжная та ін. Харків : НФаУ, 2024. 128 с.

13. Отримання штаму-продуценту *Bacillus subtilis* із підвищеним накопиченням рибофлавіну / М. М. Радченко та ін. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2022. № 31. С. 77-82. DOI: 10.7124/FEEO.v31.1488.

14. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник. 2–ге вид., допов. і перероб. Київ : НУХТ, 2010. 632 с.

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

16. Поліщук В. Ю., Дуган О. М. Вплив умов культивування на біосинтетичну здатність *Eremothecium ashbyii* Guillerm. *Technology audit and production reserves*. 2016. №2/4 (28). С. 35-41.

17. Поліщук В. Ю., Дуган О. М. Рибофлавін – виробництво і застосування. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія*. 2017. Вип. 134, ч. 3. С. 274–290.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

18. Поліщук В. Ю. Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill. : дис. ... канд. техн. наук : 03.00.20 – біотехнологія (технічні науки). Київ, 2018. 177 с.

19. Радченко М. М. Отримання штаму-продуцента *Bacillus subtilis* з підвищеним накопиченням рибофлавіну : дисертація ... д-р філософії : 091 Біологія. Київ, 2023. 151 с.

20. Решетило Л. І. Мікроорганізми як продуценти рибофлавіну. *Вісник Львівського торговельно-економічного університету. Технічні науки*. 2020. № 23. С. 116-120.

21. Римарчук А. Отримання рибофлавіну методом ферментації грибів. *Політ. Сучасні проблеми науки : тези доп. XXII Міжнар. наук.-практ. конф. здобувачів вищої освіти і молодих учених*. Київ, 2022. С. 137-138.

22. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. І. Ферментація. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 240 с.

23. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. II. Обробка культуральних рідин. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 296 с.

24. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. III. Основи проектування мікробіологічних виробництв. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 252 с.

25. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості : підруч. для вищ. навч. закл. / М. В. Стасевич та ін. Львів : Новий Світ–2000, 2018. 410 с.

26. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навч. посіб. / за ред. М. І. Гиль. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.

					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

27. Biotechnology of riboflavin / S. K. Schwechheimer et al. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016. Vol. 100(5). P. 2107-19. DOI: 10.1007/s00253-015-7256-z (Date of access: 20.12.2024).

28. Commission Regulation (EU) No 234/2011 of 10 March 2011 implementing Regulation (EC) No 1331/2008 of the European Parliament and of the Council establishing a common authorisation procedure for food additives, food enzymes and food flavourings. *Official Journal of the European Union*. 2011. Vol. 64. P. 15–24.

29. Kato T., Enoch Y. Park Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *Biotechnology Letters*. 2011. Vol. 34(4). P. 611-618.

30. Lim S. H., Choi J. S., Park E. Y. Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis* and *Candida famata*: an overview. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2001. Vol. 6(2). P. 75-88.

31. Microbial production of riboflavin: Biotechnological advances and perspectives / Jiajia You et al. *Metab Eng*. 2021. Vol. 68. P. 46-58. DOI: 10.1016/j.ymben.2021.08.009.

32. Pujari V., Chandra T. S. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyii*. *Bioprocess Engineering*. 2000. Vol. 23, № 3. P. 303-307.

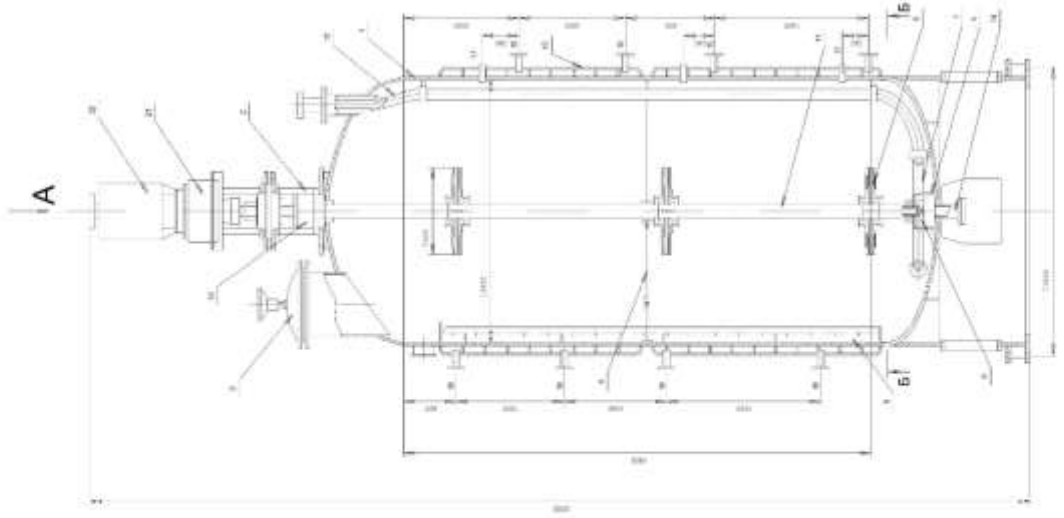
33. Riboflavin in Nutrition, Food Processing, and Analysis - A Review / J. Golbach et al. *Journal of Food Research*. Vol. 3(6). P. 23. DOI: 10.5539/jfr.v3n6p23 (Date of access: 20.12.2024).

34. Strategies to Increase the Production of Biosynthetic Riboflavin / G. Zhao et al. *Mol Biotechnol*. 2021. Vol. 63. P. 909–918. DOI: 10.1007/s12033-021-00318-7.

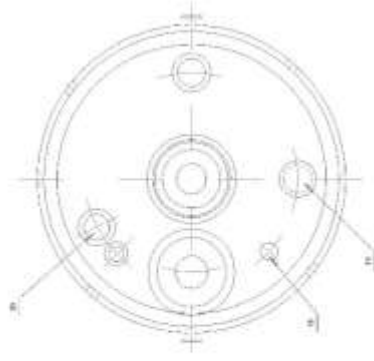
					162.01.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

ДОДАТКИ

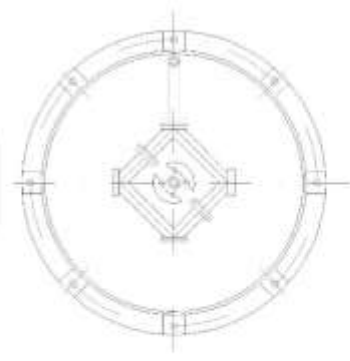
162.01.12.00.000.B3



A



Б-Б



Перелік складових частин апарату

Лист	Позначення	Найменування	Кіл.	Примітка
1	Корпус		1	
2	Сліма		1	
3	Покр		1	
4	Гілка проміжна отвори		1	
5	Мішечка опора		3	
6	Підвіска для трубки		1	
7	Барометр		1	
8	Мішечка проміжна		1	
9	Водобіи		3	
10	Торцеве ущільнення		1	
11	Вел		1	
12	Помилковий		1	
13	Складна оболонка		1	
14	Трубка для входу		1	
15	Середня		1	
16	Трубка для входу		4	
17	Трубка для виходу		4	
18	Трубка для виходу		3	
19	Трубка для виходу		1	
20	Трубка для виходу		1	
21	Трубка для виходу		1	
22	Електрообладунок		1	

162.01.12.00.000.B3

Лист	Всього	Всього	Всього	Всього
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	1
4	1	1	1	1
5	3	3	3	3
6	1	1	1	1
7	1	1	1	1
8	1	1	1	1
9	3	3	3	3
10	1	1	1	1
11	1	1	1	1
12	1	1	1	1
13	1	1	1	1
14	1	1	1	1
15	1	1	1	1
16	4	4	4	4
17	4	4	4	4
18	3	3	3	3
19	1	1	1	1
20	1	1	1	1
21	1	1	1	1
22	1	1	1	1