

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Факультет харчових технологій та біотехнології

(повна назва факультету)

Кафедра біотехнології та радіології

(повна назва кафедри)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

за ОС «Бакалавр»

на тему: **“Оптимізація умов культивування продуцента
кормового препарату рибофлавіну”**

Виконала: студентка 4 курсу, групи 1
спеціальності

162 «Біотехнології та біоінженерія»

Яворська Яніни Олегівна

(прізвище та ініціали)

Керівник **д.с.-г.н., проф. Буцяк В. І.**

(прізвище та ініціали)

Рецензент **д.с.-г.н., проф. Півторак Я. І.**

(прізвище та ініціали)

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнології та радіології і
рекомендована до захисту в ЕК, протокол № від червня 2026 р.

Завідувач кафедри біотехнології та радіології,
професор, доктор с.-г. наук

Буцяк В. І.

Львів – 2026

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	3
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Хімічна будова, фізико-хімічні властивості та біологічна роль рибофлавіну	8
1.2. Характеристика основних груп мікроорганізмів-продуцентів рибофлавіну	15
1.3. Виробництво кормових препаратів рибофлавіну	21
РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	28
2.1. Опис технологічного процесу одержання рибофлавіну	28
2.3. Матеріали і методи дослідження	38
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	41
3.1. Шляхи оптимізації культивування продуценту рибофлавіну	41
3.2. Аналіз залежності біосинтетичної активності продуцента рибофлавіну залежно від фізико-хімічних параметрів культивування	45
ВИСНОВКИ	56
РЕКОМЕНДАЦІЇ	57
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	58

АНОТАЦІЯ

Загальний обсяг роботи становить 61 сторінку друкованого тексту. Структурно кваліфікаційна робота складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків та переліку використаних джерел. Робота ілюстрована 15 рисунками та містить 10 таблиць. Список літератури охоплює 34 найменування.

Ключові слова: *Eremothecium ashbyi* F-340, рибофлавін, вітамін B₂, біосинтез, глибинне культивування, оптимізація рН, аерація, джерела вуглецю, сорбіт, азотне живлення, кормовий концентрат.

Актуальність теми. Забезпечення тваринництва та птахівництва високоякісними кормовими добавками є стратегічним завданням агропромислового комплексу. Серед широкого спектра вітамінів особливе місце посідає рибофлавін (вітамін B₂) – ключовий компонент коферментів флавінмононуклеотиду (FMN) та флавінаденіндинуклеотиду (FAD). Ці сполуки беруть участь у найважливіших окисно-відновних процесах, регулюють обмін білків, жирів та вуглеводів, а також забезпечують нормальне функціонування зорового апарату та репродуктивної системи тварин.

У кваліфікаційній роботі представлено результати дослідження метаболічного відгуку штаму *E. Ashby* на зміну зовнішніх чинників. Зокрема, вивчено, як варіації температурного режиму, інтенсивності аерації (перемішування), початкового рівня рН середовища, джерел живлення (Карбонатного та Нітратного), а також комплексних поживних середовищ корелюють із динамікою накопичення вітаміну B₂.

Результати дослідження дозволяють інтенсифікувати процес одержання рибофлавіну шляхом раціонального поєднання параметрів аерації та конструктивних особливостей ферментера. Розроблені графічні матеріали

мають практичну цінність для інженерно-технічних розрахунків біотехнологічних систем.

Об'єкт дослідження – процес мікробіологічного синтезу рибофлавіну при культивуванні штаму-продуцента.

Предмет дослідження – залежність виходу рибофлавіну та накопичення біомаси від складу поживного середовища та фізико-хімічних умов ферментації.

Мета дослідження – вивчення впливу складу поживних середовищ та фізико-хімічних чинників на продуктивність промислового штаму *E. Ashbyi* F-340.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

- дослідити динаміку зміни рН поживного середовища в процесі ферментації та встановити його оптимальний діапазон для підтримки життєздатності продуценту;
- проаналізувати вплив концентрації основних компонентів поживного середовища (джерел вуглецю, азоту та мінеральних солей) на динаміку росту штаму *E. Ashbyi* F-340;
- вивчити залежність виходу рибофлавіну від фізико-хімічних параметрів культивування, зокрема інтенсивності аерації та перемішування (80 та 160 об/хв);
- встановити оптимальні режими ведення процесу, що забезпечують максимальну питому продуктивність клітин продуценту;
- здійснити порівняльну характеристику накопичення біомаси та біосинтезу вітаміну B₂ у різних умовах зовнішнього середовища;
- обґрунтувати вибір конструкції ферментаційного обладнання та розробити технологічну схему інокуляції для реалізації процесу в промислових масштабах.

Наукова новизна. Отримані дані складають науково-методичну основу для розробки новітньої біотехнології промислового одержання рибофлавіну. Подальші дослідження будуть спрямовані на математичне моделювання багатокомпонентних середовищ для повної реалізації потенціалу надсинтезу штаму-продуцента.

Практичне значення роботи полягає в оптимізації параметрів культивування продуценту вітаміну B₂, що дозволяє суттєво підвищити вихід цільового продукту. Вибране апаратурне оформлення та розроблена схема інокуляції можуть бути впроваджені в біотехнологічне виробництво рибофлавіну для підвищення його рентабельності.

ВСТУП

Рибофлавін належить до категорії найбільш дефіцитних мікронутриєнтів, попри його присутність у клітинах рослинного та тваринного походження. Складність забезпечення фізіологічних норм вітаміну B₂ природним шляхом зумовлена обмеженим колом продуктів з високою концентрацією цієї сполуки.

Як критичний фактор росту, рибофлавін виконує роль медіатора в електронно-транспортних ланцюгах, забезпечуючи перебіг ключових окисно-відновних реакцій. Його участь у метаболізмі білків, ліпідів та вуглеводів є фундаментальною для процесів біоенергетики та функціонування дихальної системи клітин [1].

Повноцінне забезпечення раціонів тварин та птиці вітаміном B₂ є фундаментальним чинником їхнього фізіологічного розвитку, оскільки гіповітаміноз спричиняє комплекс патологічних станів. Попри можливість хімічного синтезу, сучасний вектор розвитку галузі спрямований на біотехнологічні методи отримання рибофлавіну.

Стратегічна значущість нарощування обсягів виробництва вітаміну B₂ зумовлює пошук найбільш рентабельних підходів, серед яких мікробіологічна ферментація визнана найбільш економічно доцільною. Пріоритетним напрямом удосконалення існуючих технологій є інтенсифікація біосинтетичного потенціалу штамів-продуцентів. Це досягається шляхом прецизійного регулювання параметрів культивування та інтеграції у виробничий цикл високоефективних, альтернативних джерел живлення, що і визначає актуальність даного дослідження [4].

Дефіцит рибофлавіну в раціонах призводить до значних економічних збитків: зниження темпів росту молодняка, виникнення специфічних паралічів у птиці («курчата-інваліди»), зниження несучості та виводимості яєць. Оскільки організм хребетних не здатний синтезувати цей вітамін самостійно, він має надходити з кормами.

Оптимізація умов біосинтезу, що передбачає підбір доступної вітчизняної сировини (відходів переробної промисловості, таких як м'ясо чи кукурудзяний екстракт) та регулювання фізико-хімічних чинників, дозволяє суттєво підвищити вихід цільового продукту. Це зумовлює актуальність даної роботи, спрямованої на вдосконалення технології отримання кормового препарату рибофлавіну [6].

Сучасна біотехнологія рибофлавіну базується на використанні різноманітних таксономічних груп мікроорганізмів, серед яких ключове місце посідають флавіногенні дріжджі та міцеліальні гриби. Для дріжджів родів *Candida* (*C. famata*) та *Pichia* (*P. guilliermondii*) характерною особливістю є індукція надсинтезу вітаміну за умов залізодефіцитної депресії.

Натомість для аскоміцетів роду *Eremothecium* (*E. Gossypii* та *E. ashbyi*) концентрація іонів заліза в середовищі не є лімітуючим фактором біосинтезу, що є їхньою суттєвою технологічною перевагою. Окрему нішу займають високопродуктивні рекомбінантні штами *Bacillus subtilis*, отримані методами генної інженерії [2].

Особливий науковий інтерес становить гриб *Eremothecium ashbyi* – фітопатогенний аскоміцет, що характеризується утворенням септованого багатоядерного міцелію з дихотомічним типом галуження. У процесі життєдіяльності міцелій набуває інтенсивного жовтого забарвлення через екстремально високий рівень акумуляції рибофлавіну, який кристалізується безпосередньо у вакуолях клітин. Морфологічно продуцент представлений інтеркалярними багатоспоровими спорангіями з веретеноподібними спорами та латерально розміщеними конідіями, що забезпечують ефективне розмноження культури [3].

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Хімічна будова, фізико-хімічні властивості та біологічна роль рибофлавіну

Рибофлавін (вітамін В₂) за своєю хімічною природою є 7,8-диметил-10-(1'-D-рибітил)-ізоалоксазином. Структурно молекула складається з двох частин: ізоалоксазинового кільця (флавінова частина) – трициклічна гетероциклічна система, що зумовлює жовте забарвлення сполуки та її здатність до флуоресценції та залишку спирту рибітолу – п'ятиатомний ланцюжок, приєднаний до десятого атома азоту ізоалоксазинового ядра [5].

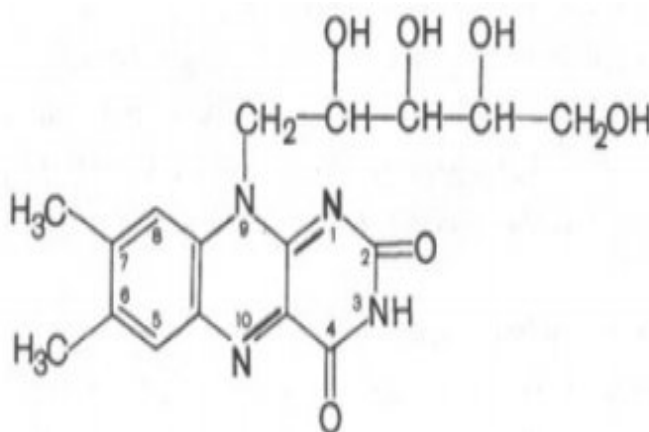


Рис. 1.1. Структурна будова рибофлавіну

Сучасна номенклатура визначає вітамін В₂ як рибофлавін, проте на етапах його відкриття використовували терміни, що відображали джерело виділення сполуки: лактофлавін (молоко), овофлавін (яйця), гепатофлавін (печінка), вердофлавін (рослини) та урофлавін (сеча).

Історія дослідження вітаміну бере початок у 1879 році, коли А. Бліт виділив із молочної сироватки лактохром – пігмент жовтого кольору з вираженою флуоресценцією. Важливим етапом стали роботи О. Варбурга та В. Крістіана (1932 р.), які ідентифікували «жовтий фермент» у пивних дріжджах і теоретично обґрунтували його ключову роль у процесах клітинного дихання [7].

У 1933 році група вчених (Р. Кун, П. Дьєрдь та Т. Вагнер-Яуреґг) виділили кристалічний пігмент із яєчного білка, підтвердивши його стимулювальний вплив на ріст клітин та ідентифікувавши його як вітамін В₂. Майже одночасно, у 1934 році, наукові групи під керівництвом Р. Куна (Гайдельберг) та П. Каррера (Цюрих) здійснили повний хімічний синтез чистого рибофлавіну.

Фундаментальним для біотехнології став 1935 рік, коли А. Гійєрмон виявив феномен надсинтезу (гіперпродукції) вітаміну В₂ міцеліальними грибами, що згодом заклало основу для промислового отримання препарату мікробіологічним шляхом [12].

Синтетична форма рибофлавіну представлена у вигляді мікрокристалічного порошку помаранчево-жовтого кольору, гіркий на смак. Характерною рисою сполуки є низька розчинність у воді та етиловому спирті, причому цей показник корелює зі значенням рН: у кислому середовищі розчинність вітаміну помітно зростає, однак він перетворюється на біологічно інертні форми – люміфлавін (у лужному середовищі) або люміхром (у кислому).

Однією з критичних властивостей препарату є його висока фоточутливість. Характерною ознакою є інтенсивна жовто-зелена флуоресценція при опроміненні ультрафіолетом. Під впливом ультрафіолетового випромінювання відбувається деструкція молекули, що вимагає суворого дотримання умов зберігання як для чистої речовини, так і для збагачених нею харчових продуктів (використання світлонепроникної тари, захист від прямих сонячних променів) [8].

Водночас рибофлавін демонструє значну термостабільність. Процеси термічної обробки (витримує нагрівання до 120°C), такі як варіння або стерилізація, не спричиняють суттєвих втрат біологічної активності (зазвичай вони не перевищують 20%), що робить його технологічно придатним для виробництва стабільних кормових сумішей.

Кристалічна структура рибофлавіну представлена характерними голкоподібними кристалами помаранчево-жовтого кольору. Температура плавлення сполуки становить $+282^{\circ}\text{C}$ і супроводжується термічною деструкцією молекули. Вітамін B_2 є гідрофільним за своєю природою: він абсолютно нерозчинний у жирах та неполярних органічних розчинниках.

Розчинність у водних системах суттєво залежить від температурного режиму та рівня кислотності: при $+27,5^{\circ}\text{C}$ концентрація насиченого розчину становить лише 0,012%; підвищення температури до $+100^{\circ}\text{C}$ дозволяє збільшити розчинність до 0,23%; лужне середовище сприяє кращій дисоціації молекул порівняно з нейтральним [9].

Щодо органічних розчинників, рибофлавін виявляє низьку розчинність у спиртах (бутиловому, аміловому, етиловому – 0,0045% при $+27,5^{\circ}\text{C}$), проте демонструє помірну здатність до розчинення у льодяній оцтовій та мурашиній кислотах. Висока розчинність спостерігається у концентрованій хлоридній кислоті, що часто використовується в аналітичній практиці для екстракції вітаміну

У нейтральних водних розчинах сполука має характерне зеленувато-жовте забарвлення, що зумовлене наявністю у структурі ізоалоксазинового кільця активної азометинової групи ($>\text{C}=\text{N}-$). Ключовою аналітичною ознакою рибофлавіну є інтенсивна жовто-зелена флуоресценція. Показники люмінесценції перебувають у прямій залежності від рівня кислотності середовища: максимальна інтенсивність спостерігається у вузькому діапазоні pH 6,0–7,0. При зміщенні показника в бік сильного закислення або залуження флуоресценція поступово згасає до повного зникнення. Цю властивість критично важливо враховувати при виборі буферних систем під час спектрофотометричного визначення концентрації вітаміну в культурній рідин [10].

Сучасна біотехнологія пропонує мікробіологічний синтез рибофлавіну як найбільш економічно ефективний та екологічно безпечний метод порівняно з хімічним синтезом. Основними промисловими продуцентами є

штами мікроскопічних грибів (наприклад, *Ashbya gossypii*), дріжджів (*Candida famata*) та бактерій (*Bacillus subtilis*). Проте собівартість отримання кормового препарату значною мірою залежить від складу поживного середовища та енерговитрат на підтримання оптимальних параметрів культивування [11].

Біологічна активність рибофлавіну зумовлена його функцією як попередника двох ключових коферментів: флавінмононуклеотиду (FMN) та флавінаденіндинуклеотиду (FAD) (рис.1.2).

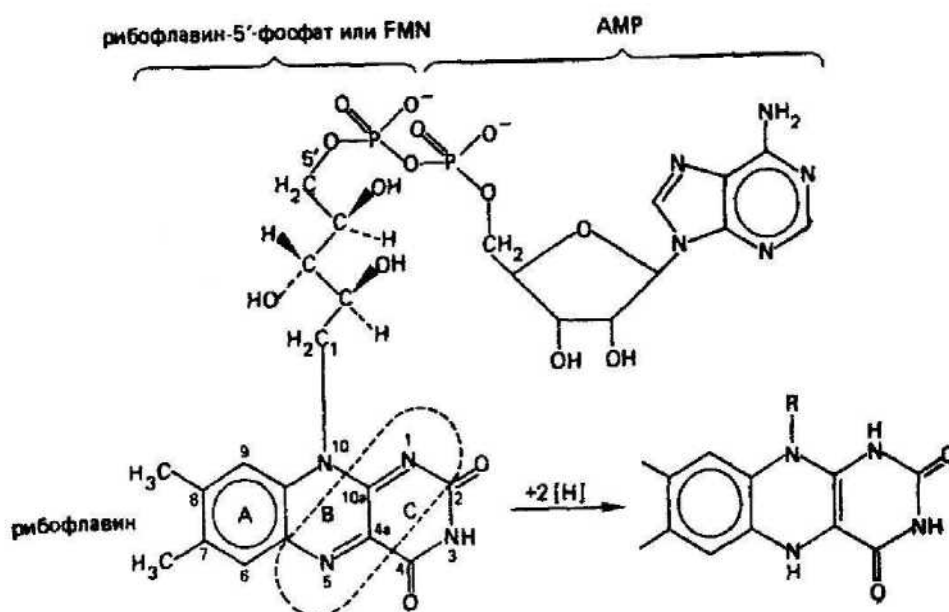


Рис. 1.2. Схема синтезу флавінових коферментів FAD та FMN

У процесах обміну речовин вітаміни не виявляють біологічної активності у первинній формі, в якій вони надходять із аліментарними джерелами. Реалізація їхніх функцій потребує послідовної трансформації за участю специфічних транспортних систем, ферментних комплексів та рецепторних білків (рис.1.3).

Процес засвоєння флавінів ініціюється у шлунку під впливом хлоридної кислоти, після чого всмоктування відбувається у проксимальному відділі тонкого кишечника за участю жовчних солей. Безпосередньо у клітинах слизової оболонки кишечника здійснюється перша стадія активації

– фосфорилювання рибофлавіну з утворенням коферментної форми флавінмононуклеотиду (ФМН).

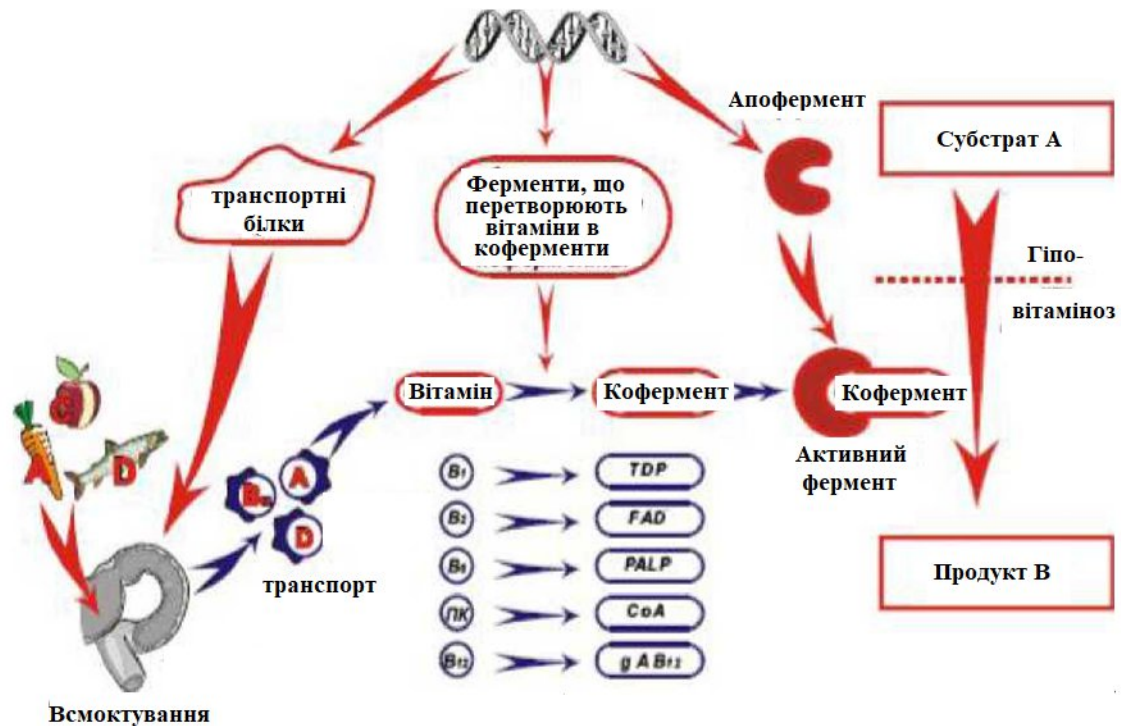


Рис. 1.3. Трансформації ферментних комплексів за участі коферментів

Наступним етапом є транспортування ФМН у комплексі з плазматичним альбуміном до печінки. Саме тут завершується метаболічна адаптація вітаміну шляхом його конверсії у другу активну коферментну форму – флавінаденіндинуклеотид (ФАД). Кінцевим етапом є формування стійких зв'язків ФАД із білковими структурами, що призводить до утворення функціонально активних флавопротеїнів.

Як складова частина флавопротеїнів, вітамін B₂ бере участь у понад 60 окисно-відновних реакціях. Він є акцептором та переносником протонів і електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій, забезпечуючи синтез АТФ (енергії). Коферменти FAD та FMN необхідні для окиснення жирних кислот, розщеплення амінокислот та функціонування циклу Кребса [13].

Рибофлавін входить до складу глутатіонредуктази – ферменту, що захищає клітини від окисного стресу та руйнівної дії вільних радикалів. Він необхідний для трансформації вітаміну B₆ (піридоксину) та фолієвої

кислоти в їхні активні коферментні форми, а також для конверсії триптофану в ніацин (вітамін РР).

Для тваринництва рибофлавін є критичним фактором росту. Його наявність у кормах безпосередньо впливає на стан слизових оболонок, гостроту зору, репродуктивну функцію та інтенсивність нарощування м'язової маси.

Недостатність рибофлавіну в раціонах призводить до порушення синтезу його основної активної форми – флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), що критично позначається на зоотехнічних показниках продуктивності тварин та птиці. Оскільки ФАД є незамінним компонентом ферментів дихального ланцюга, його дефіцит спричиняє «енергетичний голод» клітин навіть при достатній калорійності корму.

Ключові аспекти впливу дефіциту ФАД на продуктивність [19]:

- гальмування росту молодняка через порушення метаболізму амінокислот та синтезу білка спостерігається різке зниження середньодобових приростів маси. Тварини стають кволими, втрачають апетит, розвивається м'язова дистрофія;
- у птахівництві дефіцит ФАД призводить до зниження несучості та високої ембріональної смертності (загибель зародків на 18–21 добу інкубації). Характерною ознакою є поява «курчат-інвалідів» із викривленими пальцями ніг через дегенерацію сідничного нерву.
- оскільки ФАД бере участь у бета-окисненні жирних кислот, енергія з жирів корму не засвоюється належним чином, що призводить до перевитрати дороговартісних кормових компонентів.
- патології шкірних покривів та слизових, які супроводжуються дерматити, випадіння шерсті (алопеція) у свиней та телят, а також запалення слизових оболонок шлунково-кишкового тракту, що додатково погіршує всмоктування поживних речовин (табл. 1.1).

Аналіз даних табл. 1.1 свідчить, що дефіцит рибофлавіну має системний характер і вражає найбільш енергетично залежні процеси в

організмі. Оскільки ФАД є простетичною групою ферментів, що забезпечують метаболізм жирних кислот та амінокислот, його брак зупиняє анаболічні процеси.

Таблиця 1.1.

Наслідки дефіциту рибофлавіну (В₂) у кормах для основних груп
сільськогосподарських тварин та птиці

Вид тварин / птиці	Ключові симптоми дефіциту	Вплив на продуктивність та економічні показники
Курчата- бройлери	Скручування пальців всередину («параліч пальців»), діарея, м'язова слабкість.	Зниження темпів росту на 15–25%, висока смертність молодняка, перевитрата корму.
Кури- несучки	Дистрофія слизових оболонок, погіршення стану оперення.	Зниження несучості, низька виводимість курчат (загибель ембріонів на пізніх стадіях).
Поросята- сисуні	Дерматити, облісіння (алопеція), блювота, помутніння кришталика ока.	Затримка розвитку, зниження відлучної маси, схильність до інфекційних захворювань.
Свиноматки	Порушення статевого циклу, аборти, народження нежиттєздатного приплоду.	Зменшення багатоплідності, подовження сервіс-періоду, передчасне вибракування.
Телята	Гіперсалівація (слинотеча), запалення слизової рота, кон'юнктивіти.	Втрата апетиту, низькі середньодобові прирости, порушення засвоєння замінників молока.

Особливо критичним є вплив на нервову систему птиці: дегенерація сідничного нерву через брак енергозабезпечення мієлінових оболонок призводить до специфічного паралічу пальців, що робить курчат нездатними до споживання корму та води. Це підкреслює необхідність введення кормових препаратів рибофлавіну, отриманих шляхом оптимізованого мікробіологічного синтезу, до складу преміксів та комбікормів [14].

Таким чином, підтримання оптимального рівня рибофлавіну та його похідних є обов'язковою умовою для реалізації генетичного потенціалу сучасних кросів птиці та порід сільськогосподарських тварин.

1.2. Характеристика основних груп мікроорганізмів-продуцентів рибофлавіну

Здатність до синтезу рибофлавіну притаманна більшості прокаріотів та еукаріотів, проте лише обмежена кількість видів володіє механізмом надсинтезу (гіперпродукції), при якому кількість вітаміну в тисячі разів перевищує фізіологічні потреби клітини (табл. 1.2).

Таблиця 1.2

Мікроорганізми продуценти рибофлавіну

Популяція мікроорганізмів	Причина надсинтезу	Концентрація, мг/л
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Невідома	130
<i>Mycobacterium stegmatis</i>	Те саме	135
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Дефіцит заліза	97
<i>Bacillus subtilis</i>	Мутації регуляторних генів	600
<i>Micrococcus glutamicus</i>	Те саме + ампліфікація <i>rib</i> -оперона	3000
<i>Eremothecium ashbyii</i>	Невідома мутація	126
<i>Ashbya gossypii</i>	Те саме	10000
<i>Aspergillus</i>	« «	15000
<i>Torulopsis candida</i>	Дефіцит іонів магнію	46
<i>Candida robusta</i>	Дефіцит заліза	567
<i>Pichia guilliermondii</i>	Дефіцит заліза, середовище з кальцієм	340
<i>Candida famata</i> ATCC 20850	Дефіцит заліза	175
<i>Candida guilliermondii</i>	Невідомі мутації, умови культивування	10000
	Невідома мутація	3518

Здатність до синтезу рибофлавіну є універсальною властивістю мікроорганізмів, проте рівень його накопичення варіюється від мікрограмів до десятків грамів на літр культурної рідини. За цією ознакою виділяють три основні категорії [34]:

- слабкі продуценти (на прикладі *Clostridium acetobutylicum*). Ця група мікроорганізмів синтезує вітамін у кількостях, що лише дещо перевищують їхні власні фізіологічні потреби (зазвичай до 10–50 мг/л). У бактерій роду *Clostridium* біосинтез рибофлавіну тісно пов'язаний із

процесами ацетоно-бутилового бродіння. Синтез жорстко контролюється механізмом ретроінгібування (кінцевий продукт пригнічує активність перших ферментів шляху). Через низький вихід ці мікроорганізми не мають промислового значення для виготовлення чистих вітамінних препаратів, проте збагачують кормову цінність продуктів бродіння.

- помірні продуценти (*Pichia guilliermondii*, *Candida flareri*). До цієї групи відносять переважно флавіногенні дріжджі, здатні накопичувати від 0,5 до 2,0 г/л рибофлавіну. Головною рисою помірних продуцентів є їхня надзвичайна чутливість до йонів заліза (Fe^{2+}). При концентрації заліза вище 10–20 мкг/л синтез вітаміну припиняється. Використання цих дріжджів потребує глибокої стерелізації поживних середовищ, що здорожує виробництво. Проте вони є цінними моделями для вивчення генетичної регуляції флавіногенезу.

- сильні суперпродуценти (*Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*). Ці гриби-аскомицети є найбільш ефективними біологічними «фабриками» рибофлавіну, здатними накопичувати 15–20 г/л і більше. У цих організмів генетичні механізми регуляції біосинтезу практично «вимкнені» або значно ослаблені. Вони продовжують синтезувати вітамін навіть тоді, коли його концентрація досягає рівня насичення і він починає випадати в осад у вигляді кристалів.

Таблиця 1.3.

Порівняльні характеристики груп продуцентів вітаміну B₂

Група	Представники	Концентрація B ₂	Залежність від Fe^{2+}	Сфера застосування
Слабкі	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	< 0,1 г/л	Відсутня	Бродильне виробництво
Помірні	<i>Pichia guilliermondii</i>	0,5 – 2,0 г/л	Критична	Генетичні дослідження
Сильні	<i>Eremothecium ashbyii</i>	10,0 – 20,0 г/л	Відсутня	Промислова біотехнологія

Переваги для виробництва зумовлені відсутністю чутливості до іонів заліза (можна використовувати технічну воду та дешеву сировину), високий

вміст білка в міцелії (40–50%) робить відпрацьовану біомасу ідеальним компонентом кормового препарату, а також здатність асимілювати рослинні жири як основне джерело вуглецю [33].

Міцеліальні гриби (Аскоміцети). Ця група є історично першою та найбільш продуктивною у промисловому отриманні рибофлавіну.

Ashbya gossypii (синонім *Eremothecium gossypii*) вважається "золотим стандартом" біотехнології В₂. Цей гриб є фітопатогеном бавовнику, але в культурі здатний накопичувати до 15–20 г/л рибофлавіну. Процес синтезу тісно пов'язаний із морфогенезом – вітамін починає інтенсивно виділятися у фазі старіння міцелію. На відміну від дріжджів, синтез у *Ashbya* не пригнічується іонами заліза, що дозволяє використовувати дешевшу нестерильну сировину.

Eremothecium ashbyi – близькоспоріднений вид, що утворює характерні кристали рибофлавіну безпосередньо у вакуолях клітин. Міцелій гриба має яскраво-жовте забарвлення. Він дещо чутливіший до умов аерації, ніж *A. gossypii*, але має коротший цикл ферментації.

Флавіногенні дріжджі. Дріжджі приваблюють біотехнологів своєю технологічністю – вони швидше ростуть і легше піддаються сепарації.

Candida famata (та її аскспорова форма *Debaryomyces hansenii*) використовується багатьма світовими корпораціями (наприклад, Archer Daniels Midland). Головна умова надсинтезу – лімітування заліза ($\text{Fe}^{2+} < 10$ мкг/л). При нестачі заліза клітина знімає репресію з генів рибофлавінового оперону, що призводить до "викиду" вітаміну в середовище.

Pichia guilliermondii – менш продуктивний штам, але часто використовується як модельний об'єкт для вивчення генетичної регуляції біосинтезу флавінів.

Вагомий внесок у вивчення генетичних аспектів надсинтезу вітаміну В₂ зробили науковці Інституту біології клітини НАН України та Львівського національного університету імені Івана Франка. Пріоритетним напрямом їхніх досліджень стало з'ясування фундаментальних молекулярно-

генетичних механізмів, що контролюють біосинтез рибофлавіну в еукаріотичних системах.

Як об'єкт моделювання було обрано дріжджі *Pichia guilliermondii*. Вибір цього мікроорганізму зумовлений його унікальною здатністю до регульованої гіперпродукції флавінів, що робить його зручною біологічною моделлю для маніпуляцій із генами-регуляторами. Львівська школа мікробіології детально описала роль метаболічного контролю та вплив специфічних мутацій на інтенсивність флавіногенезу, що створило теоретичну базу для селекції нових високопродуктивних штамів, здатних ефективно функціонувати в промислових умовах [15].

Бактеріальні продуценти. Сучасний етап розвитку біотехнології пов'язаний із використанням генно-модифікованих бактерій.

Bacillus subtilis – Основний бактеріальний продуцент. Природні штами синтезують мало вітаміну, проте рекомбінантні штами (із вбудованими додатковими копіями *rib*-генів) демонструють високу продуктивність. Його перевагою є короткий цикл ферментації (48–60 годин), здатність рости на простих сольових середовищах із глюкозою, висока швидкість масообміну.

Lactic Acid Bacteria (LAB) – Останнім часом активно досліджуються молочнокислі бактерії (наприклад, *Lactobacillus plantarum*) для створення самозбагачених вітаміном ферментованих кормів та продуктів (табл. 1.4).

Таблиця 1.4.

Порівняльна характеристика промислових продуцентів рибофлавіну

Група продуцентів	Типовий представник	Вихід продукту (г/л)	Головний фактор стимуляції	Тривалість процесу (год)
Мицеліальні гриби	<i>Ashbya gossypii</i>	15.0 – 20.0	Рослинні олії, пурини	144 – 180
Дріжджі	<i>Candida famata</i>	7.0 – 10.0	Дефіцит іонів заліза (Fe ²⁺)	96 – 120
Бактерії	<i>Bacillus subtilis</i>	12.0 – 16.0	Генетична модифікація	48 – 72

Вибір конкретного продуцента для виробництва кормового препарату залежить від наявної сировинної бази. Для України найбільш перспективним є використання грибів роду *Eremothecium*, оскільки вони дозволяють використовувати мелясу та неочищені рослинні жири без необхідності стерилізації середовища, що значно здешевлює кінцевий продукт [16].

Процес переробки культурної рідини (КР) у товарну форму кормового препарату базується на методах термічного концентрування та зневоднення. Традиційна технологічна схема передбачає попереднє вакуум-випаровування КР до досягнення вмісту сухих речовин на рівні 30–40%, після чого отриманий концентрат піддають фінальному висушуванню в апаратах розпилювального або валково-вакуумного типу.

Кінцевий продукт являє собою гігроскопічний порошок жовто-бурого забарвлення з високою біологічною цінністю. Згідно з галузевими стандартами, такий препарат повинен містити не менше 10 мг/г рибофлавіну та близько 20% сирого протеїну. Важливою перевагою мікробіологічного способу є те, що разом із цільовим вітаміном В₂ у препараті зберігається комплекс супутніх вітамінів групи В (В₁, В₃, В₆, В₁₂) та нікотинова кислота, що суттєво підвищує його преміксну якість [32].

Альтернативний підхід до виділення вітаміну базується на методі індукованого автолізу. Ця технологія передбачає витримку ферментаційної суспензії в квазіанаеробних умовах (помірне перемішування без аерації) протягом 6–28 годин при температурі 35–55°C та стабільному рН (4,0–9,0). Такий режим сприяє руйнуванню клітинних оболонок продуцента та виходу рибофлавіну в розчин. На завершальному етапі вітамін виділяють шляхом центрифугування або декантації з подальшим висушуванням чистої фракції.

Для отримання високо очищених форм вітаміну В₂ застосовують методи фракціонування та перекристалізації. Технологічний цикл отримання кристалічного препарату ініціюється термічною екстракцією: культурну рідину нагрівають до 95–100°C, що забезпечує повний вихід

внутрішньоклітинного рибофлавіну в розчин. Наступним етапом є сепарація біомаси шляхом центрифугування. Отриманий центрифугат охолоджують до кімнатної температури (+18...20°C) та за умови корекції кислотності до рН 4,5–5,0 проводять осадження вітаміну за допомогою гідросульфїту. Технічний препарат, що утворюється після декантації та сушіння, за необхідності піддають подальшому очищенню в хлоридній кислоті для отримання фармакопейної (медичної) форми [31].

Сучасні підходи до рафінування рибофлавіну передбачають використання мембранних технологій. Згідно з одним із перспективних методів, стабільну модифікацію вітаміну розчиняють у мінеральних кислотах при помірному температурному режимі (до +30°C) та інтенсивному перемішуванні. Для видалення домішок використовують адсорбцію на активованому вугіллі з подальшою ультрафільтрацією крізь керамічні мембрани (розмір пор 20–200 нм). Кристалізація чистого продукту ініціюється шляхом 5–10-кратного розведення концентрату водою, що призводить до випадання стабільних кристалів рибофлавіну, які легко відділяються фільтруванням [17].

1.3. Виробництво кормових препаратів рибофлавіну

Промислове отримання вітаміну В₂ базується на хімічній, мікробіологічній або змішаній технологіях. У структурі виробництва домінує хімічна трансформація рибози (понад 70% ринку). Проте складність прямого синтезу цього вуглеводу змушує виробників поєднувати методи: спочатку отримувати рибозу шляхом ферментації, а вже потім синтезувати з неї фінальний продукт. Виробництво ж кормового рибофлавіну (вітаміну В₂) для тваринництва сьогодні майже повністю базується на біотехнологіях, оскільки хімічний синтез є занадто дорогим та складним для кормового сегмента [18].

Технології, які базуються на мікробіологічному синтезі (основний метод) зводяться до використання спеціальних штамів-продуцентів, які синтезують вітамін у процесі ферментації. Серед них є представники (табл. 1.5): гриби – найбільш технологічно доцільним є аскоміцет *Ashbya gossypii*. Він здатен накопичувати рибофлавін у величезних кількостях (природний захист від світла); дріжджі, серед яких найбільше використовуються штами *Candida famata* та бактерії – генетично модифіковані штами *Bacillus subtilis*. Вони мають високу швидкість росту та простіші умови культивування.

Таблиця 1.5

Порівняльна характеристика основних промислових мікроорганізмів-продуцентів рибофлавіну

Продуцент	Тип організму	Переваги	Особливості культивування
<i>Ashbya gossypii</i>	Ниткистий гриб	Найвища природна здатність до синтезу	Потребує багато кисню та рослинних олій
<i>Bacillus subtilis</i>	Бактерія	Швидкий ріст, легкість генних маніпуляцій	Чутлива до змін рН у середовищі
<i>Candida famata</i>	Дріжджі	Стійкість до несприятливих умов	Потребує специфічних джерел азоту

Технологія культивування *E. Ashbyii* – продуцента цільового продукту базується на здатності гриба синтезувати рибофлавін при

використанні різних джерел вуглецю та азоту. Ключовою особливістю є гнучкість у виборі сировини залежно від регіону та цільового продукту.

Для забезпечення інтенсивного росту та синтезу вітаміну використовують комбінацію доступних вуглеводів та органічного азоту, зокрема, мелясу, гідрол (побічний продукт крахмало-патокового виробництва, темно-коричнева сироподібна рідина) або глюкозу (концентрація 1–3%). Джерела азоту та вітамінів – кукурудзяний екстракт або дріжджовий автолізат (3–8%) із обов'язковим додаванням солей азоту, фосфору, калію, магнію та цинку [20, 30].

Для виробництва кормового препарату рибофлавіну використовують максимально дешеві та поживні компоненти: соєве борошно, кукурудзяний екстракт, крейду. Для збагачення складу додають буряковий або яблучний порошок, а як джерело енергії – рослинну олію.

Після ферментації отриману культуральну рідину висушують (часто разом із залишками мікроорганізмів). Це дозволяє отримати концентрат, де крім B_2 містяться амінокислоти та білки, що підвищує кормову цінність. Сучасні заводи використовують штами з «вимкненими» механізмами зворотного гальмування, щоб бактерія не припиняла виробництво вітаміну, навіть коли його вже достатньо в середовищі.

Високопродуктивні мікроорганізми схильні до мутацій. З часом вони можуть втрачати здатність до надлишкового синтезу, що потребує постійного лабораторного контролю. Рибофлавін руйнується під дією світла (фотолабільність) та в лужному середовищі. Це ускладнює процеси сушіння та зберігання готових преміксів [29].

Для виробництва кормових препаратів рибофлавіну повне очищення не завжди потрібне, проте наявність залишків поживних середовищ може спровокувати розвиток сторонньої мікрофлори або плісняви під час зберігання. Вартість субстратів сильно залежить від вартості джерел вуглецю (патока, олії, крохмаль), що змушує виробників шукати дешевші відходи харчової промисловості.

Особливості культивування гриба *Ashbya gossypii*, як «золотого стандарту» у промисловому виробництві вітаміну В₂ завдяки здатності цього організму синтезувати рибофлавін у кількостях, що у десятки тисяч разів перевищують його власні потреби (табл. 1.6)

Таблиця 1.6

Порівняння методів виробництва рибофлавіну

Характеристика	Хімічний синтез	Мікробіологічний синтез (ГМО-штами)
Сировина	Продукти нафтохімії, рибоза, розчинники	Олії, м'яса, крохмаль, гліцин
Умови процесу	Високий тиск, агресивні реагенти	Температура 28°C, атм. тиск
Вихід продукту	Обмежений складністю реакцій	Понад 20 г/л (висока концентрація)
Собівартість	Висока (через енергію та реагенти)	Низька (за рахунок біотехнології)
Екологічність	Низька (токсичні відходи)	Висока (біорозкладні відходи)
Цільовий ринок	Фармацевтика (чистота 99%+)	Тваринництво (кормові концентрати)

Специфіка процесу культивування, процес зазвичай триває 8–10 днів і чітко поділяється на дві фази: фаза росту, яка триває перші 48 годин (енергія спрямовується на нарощування біомаси. Клітини споживають глюкозу та інші легко розчинні вуглеводи, синтез рибофлавіну на цьому етапі мінімальний; фаза синтезу починається після вичерпання основних джерел вуглецю та уповільнення росту. Саме в цей період гриб починає масово виділяти рибофлавін у середовище як вторинний метаболіт.

Для стимуляції синтезу в середовище додають рослинні олії (ріпакову, соєву) та гліцин. Вихід продукту при використанні олій у 3–4 рази вищий, ніж на глюкозі. Оптимальні умови та середовище [28]:

- температура підтримується на рівні 28°C, оптимальна кислотність (pH) – 6.8, аерація, оскільки гриб є суворим аеробом, тому необхідне інтенсивне перемішування та постійна подача стерильного повітря;

- склад середовища окрім джерел вуглецю (олії, глюкоза), використовують дріжджовий екстракт або дешевший кукурудзяний екстракт як джерело азоту та факторів росту. Для стимулювання синтезу додають попередники, такі як пурини (наприклад, аденін), що може значно підвищити вихід вітаміну, оскільки вони є будівельним матеріалом для молекули рибофлавіну.

Технологічний процес біосинтезу вітаміну B₂ часто зупиняють шляхом автолізу (саморуйнування клітин), після чого отриману масу висушують. Така технологія успішно працює у промислових біореакторах об'ємом до 30 000 літрів.

Таблиця 1.7

Орієнтовна структура собівартості кормового препарату рибофлавіну

Стаття витрат	Частка у собівартості (%)	На що впливає ГМО-технологія
Сировина (субстрат)	40–50%	Знижує витрати через заміну глюкози на олії
Енергоносії	20–25%	Оптимізує час роботи ферментерів
R&D та штами	10–15%	Головний фактор продуктивності заводу
Логістика та пакування	10%	Залежить від концентрації вітаміну в препараті
Інше (амортизація)	5%	Зменшує навантаження на одиницю продукції

Генетична модифікація *Ashbya gossypii* спрямована на те, щоб перетворити клітину гриба на «завод», який не може зупинити конвеєр виробництва вітаміну. Усунення ретроінгібіювання (зворотного гальмування). У диких штамів діє механізм контролю, коли вітаміну стає забагато, клітина вимикає його синтез для економії енергії. Генетики видаляють або модифікують гени, що відповідають за цей «запобіжник», змушуючи гриб синтезувати рибофлавін безперервно [21].

Ампліфікація (збільшення кількості копій) генів. У геном вводять додаткові копії ключових генів оперону рибофлавіну (наприклад, гени *RIB*).

Чим більше копій цих генів працює одночасно, тим вища швидкість синтезу. Синтез рибофлавіну потребує двох основних компонентів: ГТФ (пурин) та рибулозо-5-фосфату (цукор). Модифікації спрямовані на те, щоб посилити шляхи синтезу пуринів (шлях *de novo*), а також перелаштувати метаболізм вуглеводів на пентозофосфатний шлях, щоб забезпечити надлишок рибулозо-5-фосфату.

Штами відбирають або модифікують так, щоб вони були стійкими до токсичних аналогів (наприклад, 8-азагуаніну). Це часто корелює з надлишковим виробництвом власних пуринів, що є «паливом» для вітаміну В₂. Оскільки олії є найкращим субстратом синтезу рибофлавіну, в геном вбудовують потужніші промотори для генів, що відповідають за розщеплення жирних кислот.

Сучасні промислові штамми здатні видавати концентрацію рибофлавіну понад 15–20 г/л культуральної рідини, тоді як дикі штамми виробляють лише міліграми. Використання високопродуктивних ГМО-штамів (таких як модифікований *Ashbya gossypii*) радикально змінює економіку виробництва, роблячи вітамін В₂ доступним для масового тваринництва.

Таблиця 1.8

Рекомендовані норми введення рибофлавіну (вітаміну В₂) у корми

Вид та група тварин	Норма (г на 1 тонну корму)	Основна мета введення
Курчата-бройлери (старт)	5.0 – 6.0	Ріст скелета та нервової системи
Кури-несучки	6.0 – 8.0	Висока інкубаційна якість яєць
Поросята-сисуні (престартер)	4.0 – 5.0	Підтримка імунітету та травлення
Свині на відгодівлі	2.0 – 3.0	Ефективна конверсія корму в м'ясо
Свиноматки (поросні/підсисні)	4.0 – 6.0	Попередження ембріональної смертності
Телята (замінники молока)	3.0 – 5.0	Профілактика діареї та гіповітамінозу
Хутряні звірі (норки, лисиці)	8.0 – 10.0	Якість хутра та репродукція

Норми введення рибофлавіну в комбікорми суттєво варіюються залежно від виду тварин, їхнього віку та фізіологічного стану. Оскільки організм тварин практично не накопичує вітамін В₂, його постійна присутність у раціоні є критичною (табл. 1.8).

Ключові фактори щодо зниження собівартості [27]:

- концентрація продукту. Дикі штами дають міліграми на літр, тоді як ГМО-штами – понад 20 г/л. Це означає, що з того самого об'єму ферментера (наприклад, 100 м³) ви отримуєте у сотні разів більше продукту при тих самих витратах на електроенергію та обслуговування;
- дешевша сировина. Завдяки модифікації метаболізму гриб може ефективно переробляти технічні олії та відходи цукрового виробництва (мелясу), які значно дешевші за чисту глюкозу;
- спрощення очищення. Висока концентрація рибофлавіну дозволяє виробляти кормовий концентрат (80% чистоти) шляхом простого випаровування та сушіння всієї біомаси. Це виключає дорогі етапи багатоступеневої фільтрації та кристалізації, необхідні для фармакологічного В₂;
- скорочення циклу. ГМО-штами швидше проходять фазу росту, що дозволяє робити більшу кількість культивувань у ферментерах за рік, підвищуючи оборотність капіталу.

Порівняння екологічного впливу демонструє, чому світ майже повністю відмовився від хімічного синтезу рибофлавіну на користь біотехнологій. Хімічний синтез базується на використанні органічних розчинників (бензол, хлорид метилену) та важких металів як каталізаторів. Їх утилізація складна й дорога.

Перебіг синтетичних реакції часто потребують високого тиску та специфічних температурних режимів, що збільшує викиди СО₂. Використання мінеральних кислот та лугів створює ризики для персоналу та потребує потужних очисних споруд для стічних вод.

Біотехнологічний метод із використанням гриба *Ashbya gossypii*, який використовує відновлювальну сировину. Замість нафтопродуктів використовуються рослинні олії, крохмаль та меляса (відходи цукрової галузі). Ферментація відбувається за температури 28–30°C і нормального тиску. Це суттєво економить електроенергію.

Біомаса гриба після виділення вітаміну сама по собі є цінним кормовим додатком (містить білок та амінокислоти). Її не викидають, а висушують і додають у корми. Біотехнологічне виробництво генерує на 40–60% менше парникових газів порівняно з хімічним.

Єдиним суттєвим ризиком є біобезпека. Генетично модифіковані штами не повинні потрапляти у відкрите середовище. Тому на заводах діють суворі протоколи стерилізації відпрацьованого поживного середовища перед її виведенням із циклу [22].

РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Опис технологічного процесу одержання рибофлавіну [23].

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу. До роботи допускаються особи від 18 років, які пройшли фахову підготовку та щорічний інструктаж з охорони праці. Програма навчання охоплює технологічний регламент, заходи безпеки та концепцію забезпечення якості продукції. Персонал проходить обов'язковий медичний огляд під час прийняття на роботу та надалі – щороку (згідно з наказом МОЗ України №45 від 31.03.94). Працівники зобов'язані систематично вивчати санітарно-гігієнічні вимоги та суворо дотримуватися правил особистої гігієни протягом усієї робочої зміни.

Працівники забезпечуються халатами, окулярами, рукавичками та респіраторами. Вихід на зміну без спецодягу або в забрудненому стані суворо заборонений. Заміна одягу проводиться щодня або за потреби. Перед зміною персонал зобов'язаний вимити та дезінфікувати руки, прибрати волосся та перевдягнутися в чистий санітарний одяг. У виробничі зони не допускається верхній одяг, продукти харчування та сторонні предмети. Кожен працівник особисто відповідає за дотримання санітарних вимог, гігієну та належний стан свого робочого місця.

ДР 1.2 Приготування дезінфікуючих розчинів. Розчини готує персонал блоку стерилізації або призначена наказом особа з суворим дотриманням правил техніки безпеки. У реактор через дозатори подається розрахована кількість концентрату (каустична сода, пероксид водню, дексоцид) та води. Суміш перемішується протягом 10 хвилин до повної гомогенізації. Готові розчини зберігають у чистих ємностях із пристроями для відбору проб протягом обмеженого часу. Заборонено доливати свіжий розчин у залишки старого.

ДР 1.2.1 Приготування 0,5% мийного розчину. Для ручного миття обладнання та інвентарю в реакторі-2 готують розчин у такій пропорції: концентрат: 5 мл засобу (через дозатор), вода питна: 995 мл (температура $40\pm 5^{\circ}\text{C}$). Компоненти ретельно перемішують до однорідності.

ДР 1.2.2 Приготування робочого розчину перекису водню. Для дезінфекції приміщень використовують розчини з концентрацією 1–6%. Вони мають бактерицидну дію, нетоксичні, не мають різкого запаху та не викликають корозії металів. Робочий розчин готують у реакторі Р-5 (або скляній тарі), розводячи 30% концентрат питною водою через дозатор. Ефективність розчину зростає при підвищенні його температури. Готовий розчин зберігає активність протягом 5–6 діб. Приготування проводить майстер або призначений працівник під його наглядом.

ДР 1.2.3 Приготування 70% розчину етилового спирту. У реакторі Р-8 змішують 792 мл 96% етилового спирту та 208 мл питної води для отримання 1 л готового розчину. Дозування здійснюється через автоматичні дозатори. Готовий антисептик зберігають у герметично закритій скляній тарі. Термін придатності – 1 місяць.

ДР 1.3 Підготовка приміщень. Режим прибирання проводиться вологим способом після кожної зміни (щоденне) та раз на тиждень (генеральне). Склад дезінфікуючого розчину – суміш 3% перекису водню та 0,5% мийного засобу. При стабільному дотриманні класу чистоти протягом місяця – знижують вміст перекису до 1%. При виявленні грибів або спор у повітрі – збільшують вміст перекису до 6%.

У мікробіологічній лабораторії проводять поточну обробку щозміни обробляють поверхні (столи, підлога, обладнання) 3% розчином перекису водню. Робочі столи дезінфікують 70% етиловим спиртом безпосередньо перед початком та після завершення робіт. Стерилізація повітря проводиться щоденно кварцуванням бактерицидними лампами протягом 2–3 годин. Щотижня проводять генеральне прибирання всіх зон із застосуванням дезінфектантів.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

1.4.1 Миття та дезінфекція. Після завершення циклу тиск (або вакуум) в апаратах скидають до 0, відкривають люки та кришки, промивають обладнання проточною водою. Поверхні, що контактують із середовищем або культурою, обробляють сумішшю мийних засобів та дезінфектантів (спирт, 6%-ий розчин NaOH) при температурі 50–60°C. Частини, що безпосередньо взаємодіють із препаратом, демонтують, розбирають та ретельно миють у дезінфікуючих розчинах за аналогічного температурного режиму.

Дезінфікуючі засоби необхідно періодично чергувати, щоб попередити появу стійких штамів мікроорганізмів. Особлива увага приділяється повному видаленню залишків поживного середовища для виключення сторонньої контамінації в наступному циклі.

ДР 1.4.3 Перевірка обладнання на герметичність. Перевірка здійснюється після завершення будь-яких ремонтних або профілактичних робіт. У ємнісному обладнанні створюють повітряний тиск 0,05–0,06 МПа. Обладнання вважається справним, якщо протягом 30 хвилин падіння тиску за манометром не перевищує 0,005 МПа. Фланцеві з'єднання та зварні шви посівних апаратів, ферментерів та головних фільтрів додатково перевіряють на наявність витоків за допомогою мильної води під робочим тиском випробування.

ДР 1.5. Стерилізація обладнання та комунікацій.

ДР 1.5.1 Стерилізація головного фільтра та комунікацій. Проводиться гострою парою під тиском 0,18–0,20 МПа при температурі 130±2°C. Тривалість експозиції – 2 години. Після завершення циклу тиск знижують до 0,04 МПа, а фільтр продувають стисненим повітрям до повного видалення вологи (конденсату). Повітря, що пройшло крізь головний фільтр, підлягає обов'язковій перевірці на біологічну стерильність.

ДР 1.5.2 Стерилізація індивідуального фільтра та комунікацій. Проводиться обов'язково перед кожним циклом ферментації. Фільтр,

прилегла арматура та трубопроводи стерилізуються сукупно гострою парою при температурі 126–132°C. Тривалість процесу – 1 година. Після завершення стерилізації повітря на виході з фільтра підлягає обов'язковій перевірці на біологічну стерильність.

ДР 1.5.3 Стерилізація інокулятора та ферментера. Проводиться після успішної перевірки апаратів та комунікацій на герметичність. Обробка гострою парою під тиском 0,18–0,20 МПа при температурі 125–130°C. Експозиція становить 1 годину з моменту досягнення робочих параметрів (125°C, 0,2 МПа). Пара подається на всі вузли та через усі вентилі, що межують зі стерильною зоною апарата.

ДР 2. Підготовка стерильного технологічного повітря. Повітря використовується для аерації поживного середовища в інокуляторі (на етапі підготовки посівного матеріалу) та у виробничому ферментері. Технологічне повітря повинно бути повністю стерильним (після проходження фільтрів) та мати стабільну температуру 28–30°C. Стерильність забезпечується системою головного та індивідуальних фільтрів. Температурний режим регулюється за допомогою теплообмінників для підтримки життєдіяльності продуцента.

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря. Забір зовнішнього повітря здійснюється через повітрозбірник ПЗ-13. Встановлюється на висоті 2 м над рівнем даху будівлі для мінімізації потрапляння пилу та приземних забруднень.

ДР 2.2 Попередня очистка повітря. Механічна фільтрація часток розміром понад 5 мкм у сухому фільтрі Ф-14. Використовується пінополіуретан, що виключає недоліки масляних фільтрів (сторонні запахи та витік мастила). Захист вентилятора від забруднення та первинне зниження рівня контамінантів складає не менше 70%.

ДР 2.3 Транспортування та стиснення повітря. Стиснення повітря здійснюється поршневим компресором К-15 простої дії. На виході підтримується тиск 0,2 МПа, необхідний для подолання гідродинамічного

опору системи та висоти стовпа рідини у ферментері. Внаслідок стиснення температура повітря зростає з 15–25°C (на вході) до 90–100°C (на виході).

ДР 2.4 Стабілізація термодинамічних показників. Стиснене повітря з компресора охолоджується в трубчастому теплообміннику ТО-16 до 30°C технічною водою. Це запобігає конденсації вологи у фільтрах і утворенню каналів «проскоку» мікрофлори. Ресивер РС-17 слугує для згладжування пульсацій тиску та остаточного відділення крапельної вологи завдяки насадці та зміні напрямку потоку. Утворена волога автоматично або примусово скидається в каналізацію. Повітря подається на подальшу очистку під стабільним тиском 0,3 МПа.

ДР 2.5 Очищення повітря у головному фільтрі. Видалення пилу та мікроорганізмів розміром менше 5 мкм відбувається у фільтрі Ф-18. З цією метою використовуються глибинні набивні фільтри періодичної дії. Найчастіше скловолокно (діаметр волокон 7–21 мкм), що забезпечує високу ступінь очищення на рівні 90–99%. Повна заміна фільтрувального матеріалу проводиться 2 рази на рік.

ДР 2.6 Стерильна фільтрація в індивідуальних фільтрах. Заключна очистка повітря від контамінантів безпосередньо перед подачею в інокулятор (Ф-31) та ферментер (Ф-33) проводиться шляхом використання патронних фільтрів тонкої очистки з використанням тканини Петрянова (марка ФПА-15 на основі ацетатцелюлози). Надтонкі хаотично сплетені волокна товщиною 1,5–2,5 мкм. Вони забезпечують максимальний рівень стерильності; коефіцієнт контамінації мікроорганізмами не перевищує 0,1–0,01%.

ДР 3. Приготування та стерилізація піногасника. Як піногасник використовується соєва олія, яку стерилізують в реакторі Р-11 за температури 120–122°C, тиск 0,12 МПа, експозиція становить 2 години.

ДР 4. Підготовка стерильного поживного середовища.

ДР 4.1 Приготування та стерилізація розчинів для титрування. У реактор Р-21 змішують 3 кг сухого гідроксиду натрію з питною водою до загального об'єму 50 л. Використовується для коригування рН середовища. У

реакторі Р-24 змішують 3 л концентрованої соляної кислоти з питною водою до загального об'єму 50 л. Використовується для підкислення середовища та культуральної рідини до рН 4,5–5,0. Обидва розчини стерилізують при температурі 120–122°C та тиску 0,12 МПа протягом 2 годин.

ДР 4.2 Приготування та стерилізація виробничого середовища. Підготовка здійснюється у реакторі Р-27 (загальний об'єм 1 м³). Склад (на 0,5 м³ готового середовища): ГФС – 10–20 кг; дріжджовий екстракт – 5 кг; пептон – 0,5 кг; K₂HPO₄ – 1,5 кг. Стерилізація проводиться безпосередньо в реакторі при температурі 120°C протягом 1 години, коригування рН в межах 7,5 здійснюється після стерилізації стерильним розчином.

ДР 4.3 Охолодження виробничого середовища. Охолодження простерилізованого середовища здійснюється подачею технічної води в сорочку реактора при зниженні температури до 30°C. Після досягнення робочої температури значення рН доводять до 7,5 за допомогою стерильних титрувальних розчинів.

ДР 5. Підготовка та зберігання посівного матеріалу. Культуру *Ashbya gossypii* F-340 утримують на агаризованому середовищі ГПД у пробірках при температурі 5°C (у холодильнику). Музейну культуру зберігають при кімнатній температурі (згідно з протоколом підтримки життєздатності штаму).

ДР 5.1 Відновлення та селекція музейної культури. Перед циклом контролюють рівень синтезу рибофлавіну. За низьких показників проводять підтримуючу селекцію. Штам пересівають у колби (на 250 см³ з 50 см³) впродовж 7 діб за температури 28°C, із перемішування 180 об/хв. Культуру висівають на чашки Петрі (середовище ГПД). Для подальшої роботи відбирають одиничні колонії з найінтенсивнішим яскраво-жовтим забарвленням. Вміст рибофлавіну в КР має бути не менше 200 мг/л. Стимуляція (у разі спаду продуктивності) проводять шляхом УФ-опромінення культури протягом 1 хвилини. Усі маніпуляції виконуються суворо асептично відповідальною особою.

ДР 5.2 Культивування посівного матеріалу в колбах. Колби (Кб-32) об'ємом на 250 см³ з 50 см³ середовища на основі ГФС-10 стерилізують в автоклаві 40 хвилин (тиск 0,12 МПа). У стерильне середовище, охолоджене до 28–30°C, вносять 1 см³ активної музейної культури. Маніпуляції проводять суворо асептично. Культивування на качалці (180 об/хв) протягом 72 годин при температурі 28°C. Одержаний матеріал перевіряють на відсутність сторонньої мікрофлори шляхом висіву на МПА та контрольної мікроскопії.

ТП 6. Культивування продуцента у ферментері. Виробничий ферментер Вф-30 (об'єм 1 м³, коефіцієнт заповнення 0,6). У стерильне середовище вносять 1% посівного матеріалу від об'єму середовища при температурі 28-30°C, режиму аерації 1,5-2 м³ хв при безперервному перемішуванні. Тривалість біосинтезу від 120 до 125 год. Одержана культуральна рідина обов'язково досліджується на відповідність наступним параметрам: вміст рибофлавіну – 3 г/л; концентрація біомаси – 4,5-6,7 г/дм³. Культурну рідину передають у збірник, рН доводять розчином HCl до 4,5-5,0, після такого значення рН рибофлавін є стабільним.

ТП 7. Термічна екстракція рибофлавіну. Повне вивільнення вітаміну, зв'язаного з міцелієм гриба, у розчин проводиться безпосередньо у виробничому ферментері Вф-30 шляхом нагрівання культуральної рідини до 95–100°C, тривалість процесу – впродовж 1 години. Руйнування клітинних структур (автоліз/термоліз) та перехід усього синтезованого рибофлавіну в рідку фазу.

ТП 8. Сепарація та розділення фаз. Культуральна рідина після термічної витримки (ТП 7) подається на центрифугу Ц-37 зі швидкістю обертання барабана – 3000 об/хв. Фугат (рідка фаза з розчиненим вітаміном) спрямовується на стадію виділення продукту (ТП 9). Біомаса (осад) передається на переробку як білкова добавка для збагачення кормів.

ТП 9. Відновлення та осадження рибофлавіну. У реакторі Р-39 до фугату додають відновник – гідросульфід натрію та проводять безперервне

перемішування в герметичному середовищі (суворо без доступу повітря), а потім реагенти змішують у співвідношенні 1:1 до маси розчиненого рибофлавіну. В результаті цього утворюється осад зеленого кольору (лейкосполука), що забезпечує перехід вітаміну в нерозчинну форму для подальшого виділення.

ТП 10. Виділення осаду лейкофлавіну. Центрифугування відновленого розчину на центрифугі Ц-42 за охолодження до 10–15°C для повноти випадіння осаду. Осад спрямовується на подальшу стадію перекристалізації (ТП 11), а фугат скидається у виробничу каналізацію.

ТП 11. Кислотне розчинення та перекристалізація. Осад зі стадії ТП 10 завантажується в реактор Р-43, додається хлоридна кислота та питна вода до досягнення концентрації кислоти у суміші – 3,3%. Термічний режим нагрівання маси до 98–99°C, витримка при заданій температурі від 1 до 3 годин для повного розчинення. Отриманий розчин піддають поступовому охолодженню для випадіння очищених кристалів рибофлавіну.

ТП 12. Кристалізація рибофлавіну. Охолодження кислотного розчину до температури 0–2°C призводить до ініціації випадіння чистих кристалів вітаміну. Охолодження проводиться в реакторі Р-43 шляхом подачі холодоагенту (технічної води) у сорочку апарата. Отримання кристалічного осаду рибофлавіну, готового до фінального виділення.

ТП 13. Виділення кристалічного рибофлавіну. Центрифугування охолодженої кристалізаційної маси на центрифугі Ц-46 зі швидкістю обертання – 3000 об/хв. Кристали рибофлавіну спрямовуються на стадію промивання (ТП 12). Фугат відводиться у виробничу каналізацію.

ТП 14. Спиртове промивання кристалів. Очищення кристалів рибофлавіну від залишків соляної кислоти та побічних продуктів реакції шляхом промивання здійснюється холодним етиловим спиртом у збірнику 36-47. В результаті цього одержуємо чистий вологий концентрат, який спрямовується на фінальну стадію сушіння.

ТП 15. Вакуумне сушіння рибофлавіну. Осад сушиться в герметичному циліндричному корпусі з обігрівальною сорочкою на барабанній вакуум-сушарці СШ-48 (тип РТСД 125). Обертання барабана навколо горизонтальної осі забезпечує постійне перемішування продукту. Вакуум дозволяє проводити процес при низьких температурах, що зберігає активність вітаміну. Рівномірне підведення тепла скорочує час сушіння та гарантує стабільну якість порошку. Отриманий сухий порошок рибофлавіну спрямовується на дільницю фасування та пакування.

ПМБ 16. Пакування, маркування та відвантаження. Фасування здійснюється на пакувальній машині Пм-49. Маркування виконується державною мовою (та мовою контракту). Кожна одиниця продукції містить етикетку з наступними даними: назва, адреса та товарний знак виробника; номер партії та дата виготовлення; маса нетто; термін придатності. Продукт передається на склад готової продукції для подальшої реалізації.

ПВ 17. Переробка відходів та регенерація. Фільтрувальні матеріали (для води та повітря) підлягають повторному використанню після промивання гарячою водою, механічного очищення та дезінфекції. Відокремлена на центрифугі біомаса *Ashbya gossypii* є цінним побічним продуктом. Після відповідної термічної обробки її спрямовують у тваринництво як білково-вітамінну добавку для збагачення кормів. Повторне використання матеріалів та збут біомаси дозволяють знизити собівартість основного продукту та забезпечити маловідходне виробництво.

ЗВ 18. Знешкодження відходів та екологічний контроль. Некондиційний посівний матеріал, промивні води, відпрацьоване повітря, браковані партії препарату та залишки пакування йде на знешкодження. Очищення стічних вод відбувається шляхом механічного вловлювання великих домішок та повного біологічного очищення в загальній системі очисних споруд. Очищення повітря від технологічних викидів проходить крізь циклони для відділення механічних часток. Очищений газ викидається в атмосферу.

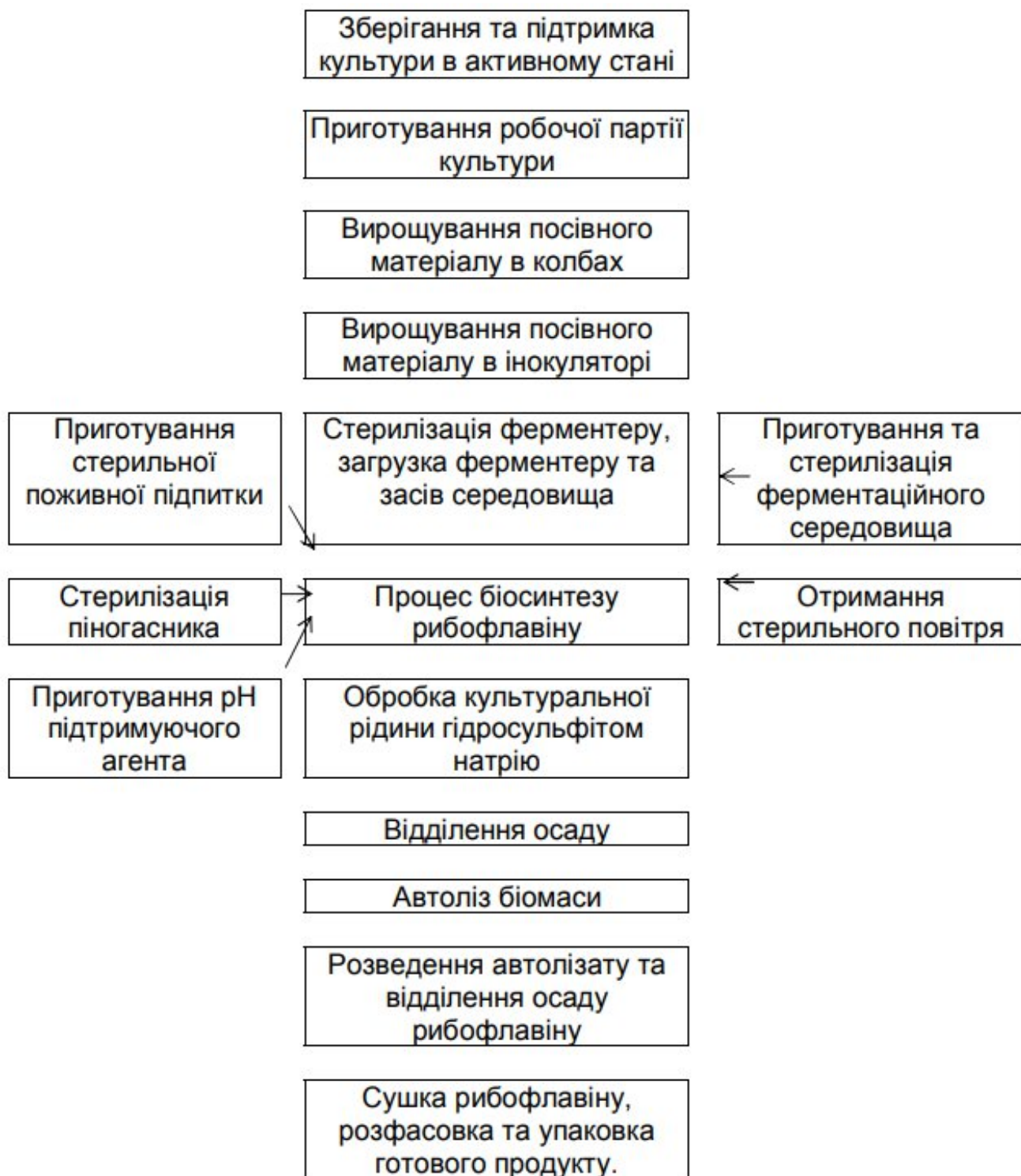


Рис. 2.1. Основні технологічні ланки одержання рибофлавіну для живлення тварин

2.2. Матеріал та методи дослідження

У роботі досліджували біосинтетичну здатність штаму мікроскопічного гриба *Eremothecium ashbyi* Guilliermond F-340, який є активним продуцентом рибофлавіну. Дана культура була отримана з фондів колекції промислових мікроорганізмів. Відповідно до сучасної філогенетичної класифікації, закріпленої у міжнародних реєстрах CABI Bioscience та CBS Database of Fungal Names, систематичне положення об'єкта визначено наступним чином: царство Fungi, відділ Ascomycota, підвідділ Saccharomycotina, клас Saccharomycetes, порядок Saccharomycetales, родина Eremotheciaceae.

Для підтримання життєздатності штаму гриба зберігали в лабораторних умовах за кімнатної температури на щільних поживних середовищах. Регулярні пересіви здійснювали на два типи скошених агаризованих середовищ: глюкозо-пептонне середовище (ГПС) – збалансований субстрат, що містить дріжджовий екстракт (0,5%) та пептон (0,3%) як джерела азоту та вітамінів, а також глюкозу (1,0%) як основне джерело вуглецю; соєве середовище – спеціалізоване середовище, до складу якого входить соєве борошно (4,0%) та сахароза (1,0%). Для забезпечення щільності в обох випадках додавали агар-агар у концентрації 2,0%.

Підтримання штаму *E. ashbyi* в активному стані здійснювали шляхом регулярних пасажів на щільні поживні середовища. Під час пересіву застосовували метод візуального відбору: для подальшої роботи обирали колонії з найбільш інтенсивним жовто-гарячим забарвленням, що є непрямим показником високої синтетичної активності продуцента [24].

Процес глибинного культивування реалізовували в рідких середовищах при температурі 28°C. Експеримент тривав протягом 7 діб. Ферментацію проводили у конічних колбах (об'єм середовища – 50 мл) за умов постійної аерації на орбітальній качалці. Для порівняння інтенсивності перемішування використовували два режими швидкості: 70 та 180 об/хв. Як посівний матеріал використовували 5% (від об'єму середовища) фізіологічно

активної вегетативної культури, попередньо вирощеної на глюкозо-пептонному середовищі (ГПС). Для встановлення оптимального рівня кислотності для росту біомаси та біосинтезу вітаміну B₂ використовували ГПС із варіативним значенням рН. Початкові показники середовища корегували в межах від 4,0 до 8,0 одиниць із кроком 0,5, застосовуючи розчин 0,1 н. NaOH.

Контроль динаміки процесу здійснювали шляхом щодобового відбору проб культуральної рідини. Під час аналізу кожної проби фіксували наступні параметри: поточне значення рН середовища; кількість накопиченої біомаси та концентрацію синтезованого рибофлавіну.

Для встановлення спектру сполук, що найефективніше стимулюють ріст біомаси та біосинтетичну активність *E. ashbyi*, було проведено серію експериментів з оптимізації складу поживного середовища за джерелами вуглецю та азоту. Дослідження проводили на базовому середовищі, що містило дріжджовий екстракт (0,5 %) та пептон (0,3 %). Як єдине джерело вуглецю до субстрату вносили різні органічні сполуки в концентрації, еквівалентній вмісту карбону в 10 г/дм³ глюкози. До переліку тестованих субстратів увійшли: моносахариди: фруктоза, галактоза, ксилоза; дисахариди: мальтоза, лактоза, сахароза; багатоатомні спирти: сорбіт, маніт, дульцит, гліцерин, інозит; полісахариди: крохмаль [25-26].

Для визначення найбільш сприятливих джерел азоту використовували синтетичне середовище з фіксованим вмістом глюкози (10 г/дм^3) та мінеральним фоном ($\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1 \text{ г/дм}^3$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,5 \text{ г/дм}^3$, $\text{KCl} - 0,5 \text{ г/дм}^3$). Досліджувані азотовмісні компоненти вносили в кількості, що за вмістом Нітрогену відповідали 3 г/дм^3 хлориду амонію.

Для порівняльної оцінки ростових характеристик *E. ashbyi* на складних субстратах застосовували низку комплексних середовищ: глюкозо-пептонне (ГПС), соєве, середовище Городкової, а також неохмелене пивне сусло та мелясу. Вміст вуглецю в усіх варіантах був стандартизований до еквівалента 10 г/дм^3 глюкози. Як додаткові джерела нітрогену та факторів росту до складу вносили дріжджовий екстракт і пептон.

Накопичення біомаси: аналізували гравіметричним (ваговим) методом. Клітини відокремлювали від культуральної рідини шляхом фільтрування, після чого осад висушували до досягнення сталої маси за температури 105°C . Активна кислотність (pH): вимірювання проводили за допомогою потенціометричного методу на приладі рН-метр-мілівольтметр 150МА.

Вміст рибофлавіну: концентрацію вітаміну в культуральній рідині встановлювали спектрофотометричним методом при довжині хвилі $\lambda = 450 \text{ нм}$. Для забезпечення точності вимірювань проводили попередній повний гідроліз флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) до флавінмононуклеотиду (ФМН), витримуючи проби протягом 12 годин у 10% розчині трихлороцтової кислоти.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Шляхи оптимізації культивування продуцента рибофлавіну

Оптимізація умов культивування завершується розробкою технологічної схеми, яка дозволяє перетворити культурну рідину на стабільний кормовий препарат. Для кормового рибофлавіну найефективнішою є схема отримання сухого концентрату, де вітамін залишається разом із біомасою продуцента (це підвищує поживну цінність за рахунок білка та амінокислот).

- підготовка посівного матеріалу (Inoculum). Розведення чистої культури штаму-продуцента у колбах, а потім у маточних ферментерах. Отримання активної біомаси в об'ємі 5–10% від об'єму основного ферментера;

- ферментація (основний етап). Аеробне глибинне культивування у ферментерах зі сталі марок AISI 316, за температури 28–30°C, постійна подача стерильного повітря та перемішування. На цьому етапі підтримується оптимальний рівень рН (6.2–6.5) шляхом автоматичного титрування розчином амоніаку або лугу. Процес триває до моменту максимального накопичення вітаміну (72–120 годин).

Сучасний стан технологічного розвитку не забезпечує можливості підготовки значних об'ємів стерильного повітря, що відповідало б установленим стандартам аерації, в межах одного пристрою. Загальні принципи функціонування типової системи, призначеної для комплексного одержання, тонкої фільтрації та стерилізації повітряних мас, відображені на схемі (рис. 3.1).

На рис. 1.5 представлена технологічна схема вузла підготовки та стерилізації повітряних потоків, що подаються для аерації. Дана схема ілюструє послідовність етапів кондиціювання та багатоступеневого очищення повітря, необхідних для забезпечення стерильних умов процесу.

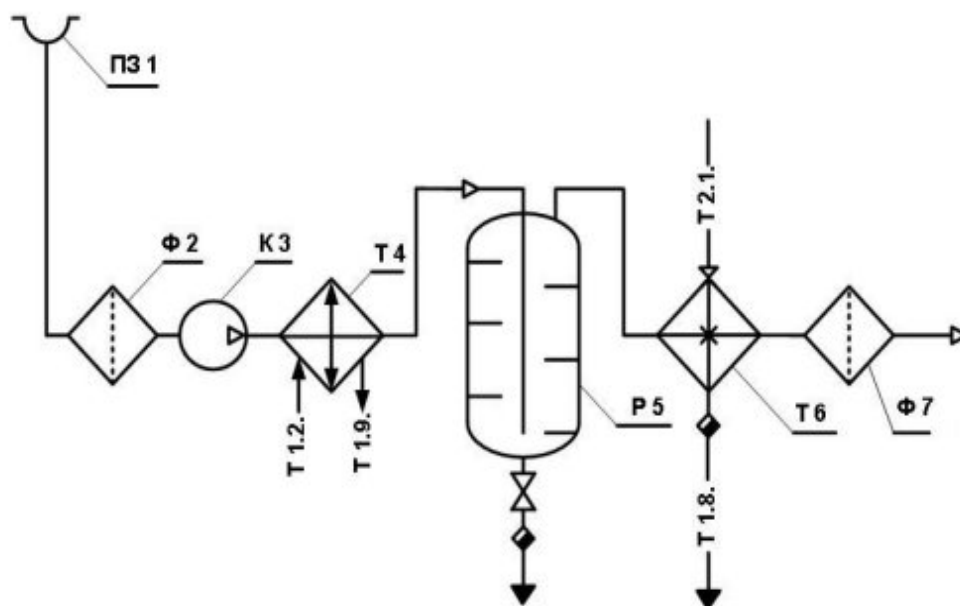


Рис 3.1. Апаратурне забезпечення щодо підготовки та стерилізації повітря

- попередня обробка культурної рідини. Додавання антиоксидантів (наприклад, етоксихіну або токоферолів) для запобігання руйнуванню вітаміну при термічній обробці;
- концентрування. Перед сушінням культурну рідину часто піддають вакуум-випаровуванню при низьких температурах (45–55°C) до вмісту сухих речовин 20–25%. Це економить енергію на етапі сушіння;
- сушіння (отримання препарату). Розпилювальне сушіння або сушіння на вальцах. Температура теплоносія на вході – 140–160°C, на виході – 70–80°C. Короткий час контакту з гарячим повітрям (лічені секунди) дозволяє зберегти термолабільний рибофлавін. В результаті отримуємо дрібнодисперсний порошок жовто-коричневого кольору.
- стандартизація та пакування. Якщо концентрація рибофлавіну занадто висока, додають інертні кормові наповнювачі (висівки, крейду) для досягнення стандартної активності (наприклад, препарат "Рибофлавін кормовий 50%). Пакування в багатошарові паперові мішки з поліетиленовим вкладишем, що не пропускає світло (рибофлавін чутливий до УФ-променів).

Спрощене апаратне оформлення (ланцюжок технологічного процесу):

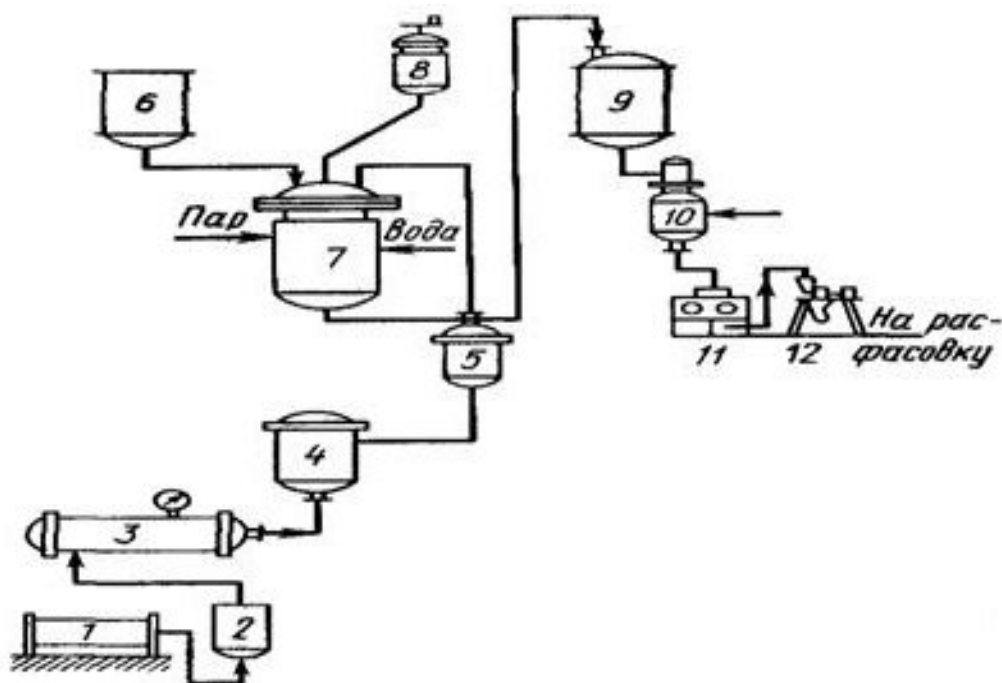
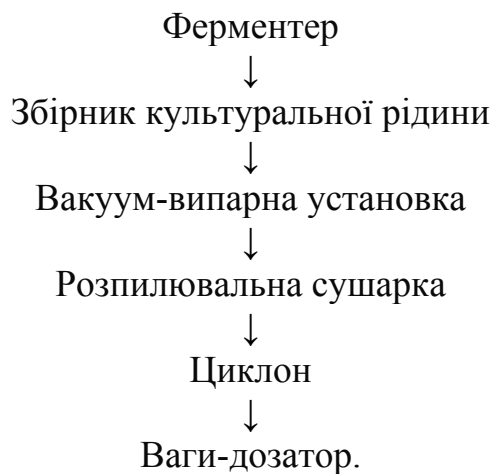


Рис.3.2. Принципова технологічна схема промислового виробництва рибофлавіну як кормової добавки

На рис. 3.2 відображено склад апаратного комплексу, що забезпечує повний цикл отримання препарату. Основні вузли системи включають: блок підготовки повітря:

- повітряний компресор (1), систему очищення від мастила (2), ресивер для стабілізації тиску (3) та магістральний фільтр тонкої очистки (4);

- ферментаційний блок: апарати для підготовки посівного матеріалу (інокулятори 5, 8), змішувач компонентів середовища (6) та основний біореактор (ферментер 7);

- ділянка виділення та обробки цільового продукту: ємність для збору готової культуральної рідини (9), випарювальна установка (10) для концентрування маси, розпилювальна сушарка (11) та подрібнювальне обладнання (дробарка 12) для доведення продукту до необхідної кондиції.

3.2. Аналіз залежності біосинтетичної активності продуцента рибофлавіну залежно від фізико-хімічних параметрів культивування

У цьому розділі наведено результати вивчення метаболічної активності штаму *E. Ashbyi* у відповідь на зміну фізико-хімічних параметрів середовища. Зокрема, проаналізовано кореляцію між динамікою синтезу рибофлавіну та варіаціями температурного режиму, інтенсивністю масообміну (швидкістю перемішування), а також вихідним значенням активної кислотності (pH) субстрату.

Вивчення впливу початкового рівня pH на ріст біомаси та біосинтез рибофлавіну проводили за умов глибинного культивування на рідкому глюкозо-пептонному середовищі. Встановлено, що в ході життєдіяльності штаму відбувається характерна трансформація кислотності культуральної рідини, характер якої безпосередньо залежить від стартових показників pH (табл. 3.1)

Таблиця 3.1

Динаміка активної кислотності (pH) культуральної рідини *E. Ashby* F-340 при різних початкових значеннях

Початкове значення pH	Період інтенсивного росту (до 3 доби)	Стаціонарна фаза та фазі автолізу (після 5 доби)	Загальна тенденція
4,0	Стабільний стан	Суттєві зміни відсутні	Показник практично не змінюється
4,5 – 5,5	Поступове зниження	Подальше підкислення	Стійка тенденція до зниження pH
6,0 – 8,0	Інтенсивне зниження до рівня 4,5 – 5,0	Підвищення (підлужування) до рівня 7,0 – 8,0	Двофазна динаміка (спад з наступним зростанням)

За низьких значень pH (в межах 4,0) кислотність середовища залишалася стабільною впродовж усього періоду вирощування, суттєвих коливань показника не зафіксовано. За помірно кислих значень (pH 4,5–5,5) спостерігалася тенденція до поступового додаткового підкислення субстрату,

а за нейтральних та лужних значеннях (рН 6,0–8,0) динаміка має двофазний характер. На етапі експоненціального росту (до 3-ї доби) відбувалося різке зниження рН до значень 4,5–5,0. Однак із переходом культури у стаціонарну фазу та початок автолізу (після 5-ї доби) спостерігалось вторинне підлужування середовища до рівня рН 7,0–8,0.



Рис. 3.3. Динаміка нарощування біомаси штамом *E. ashbyi* F-340 залежно від рН початку ферментації

Аналіз отриманих даних показав, що параметри кислотності середовища неоднаково впливають на процеси росту продуцента та синтез вітаміну. Найбільш інтенсивне накопичення біомаси зафіксовано при початкових значеннях рН 5,5 та 6,0 (рис. 3.3). Наприкінці експерименту (7-ма доба) концентрація клітинної маси у цих варіантах досягла $5,1 \pm 0,24$ мг/см³ та $6,0 \pm 0,26$ мг/см³ відповідно.

Водночас для ефективного біосинтезу рибофлавіну оптимальним виявився рівень рН 7,5. У цьому режимі вихід цільового продукту на 7-му добу становив $47,7 \pm 1,8$ мкг/см³ (рис. 3.4). Такий показник є суттєво вищим за результати інших варіантів: зокрема, він на 30% перевищує вихід при рН 6,5–8,0 та на 58% – при стандартному для поживних середовищ значенні рН 6,0.

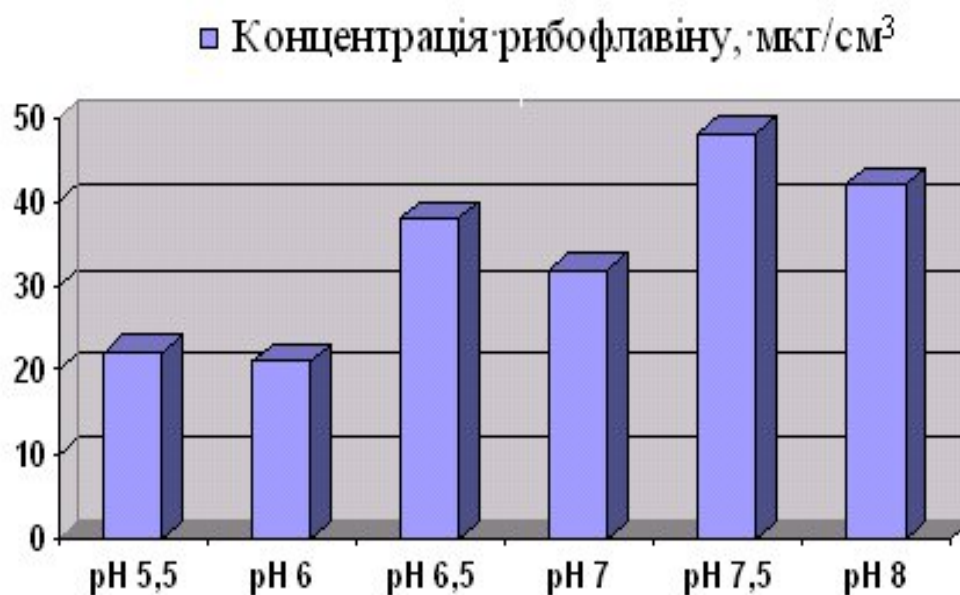


Рис. 3.4. Синтез цільового продукту – вітаміну B₂ штамом *E. ashbyi* F-340 залежно рН поживного середовища

Під час вивчення ролі гідродинамічних умов культивування на рідкому ГПС було проаналізовано залежність накопичення біомаси та рибофлавіну від швидкості перемішування 80 та 160 об/хв). Результати експерименту (рис. 3.5) свідчать, що інтенсивність аерації є визначальним фактором для продуктивності штаму.

Встановлено, що найвищий рівень біосинтезу вітаміну забезпечується при швидкості 160 об/хв. За таких умов концентрація рибофлавіну досягла $23,5 \pm 1,1$ мкг/см³, що на 64% перевищує показники, отримані при низькій інтенсивності перемішування (80 об/хв).

Така залежність пояснюється особливостями фізіології аскоміцетів роду *Eremothecium*. Оскільки біосинтез рибофлавіну є енергозалежним аеробним процесом, швидкість 160 об/хв забезпечує вищий коефіцієнт масопередачі кисню з газової фази в рідку. Достатня концентрація розчиненого кисню стимулює роботу дихального ланцюга та активізує ключові ферменти пуринового обміну, які є попередниками у циклі синтезу вітаміну B₂. Натомість при 80 об/хв спостерігається дефіцит кисню, що

обмежує метаболічну активність гриба та переключає клітини на менш ефективні енергетичні шляхи.

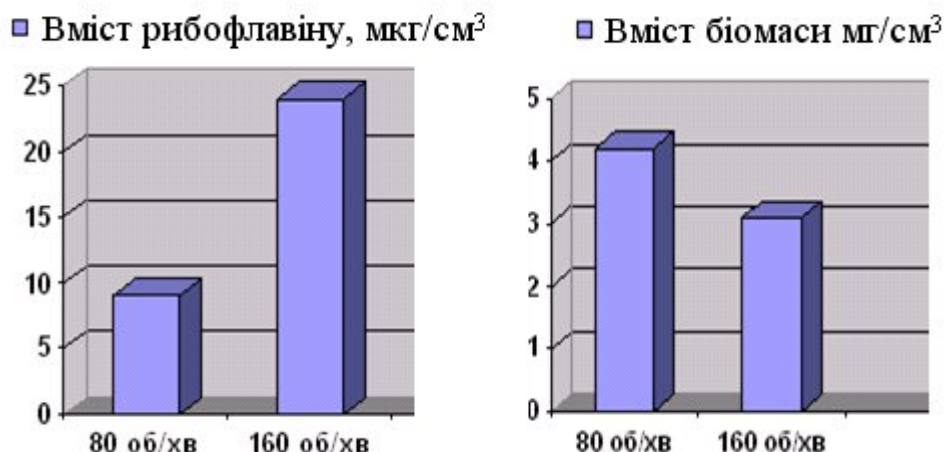


Рис. 3.5. Синтез вітаміну B₂ та біомаси продуцента залежно від частоти перемішування

Збільшення інтенсивності перемішування з 80 до 160 об/хв призвело до зниження вмісту біомаси продуцента на 26% (з 4,2 до 3,1 мг/см³).

Це може свідчити про високу швидкість обертання створює значні зсувні зусилля, які руйнують клітини або міцелій продуцента. Надмірне насичення середовища киснем при 160 об/хв може пригнічувати ріст специфічних штамів. Клітини витрачають більше енергії на підтримку цілісності та адаптацію до турбулентності, а не на приріст маси.

Спостерігається цікава закономірність: інтенсивне перемішування (160 об/хв) пригнічує ріст біомаси, але критично важливе для синтезу вітаміну. Максимальний приріст клітин і максимальний біосинтез рибофлавіну не збігаються. Це класичний приклад того, що стресові умови (висока аерація та зсувні зусилля) стимулюють вторинний метаболізм.

Рибофлавін є попередником коферментів (FMN, FAD), що беруть участь в окисно-відновних процесах. Висока швидкість (160 об/хв) забезпечує кращий масообмін кисню, що є вирішальним фактором для ферментації, попри меншу кількість «робочих» клітин. Хоча біомаси при 160 об/хв менше, кожна одиниця цієї біомаси працює значно ефективніше, виробляючи на 64% більше продукту.

Отже, для промислового отримання вітаміну режим 160 об/хв є пріоритетним, оскільки цільовим результатом є концентрація продукту, а не маса продуценту.

Аналіз гідродинамічних умов показав чітку диференціацію процесів: помірна інтенсивність перемішування сприяє переважно росту біомаси, тоді як інтенсивна аерація є необхідною умовою для активації флавіногенезу. На основі цих даних було проведено детальне вивчення нутрієнтних потреб продуцента (рис. 3.6).

Встановлено, що штам *Eremothecium ashby* характеризується широким спектром субстратної специфічності та здатний асимілювати вуглецеві сполуки різної хімічної природи, а саме моносахариди (глюкоза, фруктоза), дисахариди (цукроза), шестиатомний спирт сорбіт та побічні відходи переробки цукрового буряка – мелясу.

Найвищу біосинтетичну ефективність щодо вітаміну B₂ виявлено при використанні сорбіту як єдиного джерела вуглецю. За таких умов концентрація рибофлавіну досягла свого максимуму – $56 \pm 1,56$ мкг/см³. Високі показники продуктивності також зафіксовані на середовищах із вмістом фруктози та меляси, що свідчить про їхню роль як ефективних попередників у метаболічних шляхах синтезу флавінів.



Рис. 3.6. Синтез біомаси продуцента вітаміну B₂ залежно від джерела Карбону

Найвищий рівень накопичення міцеліальної маси – $10,1 \pm 0,37$ мг/см³ зафіксовано при використанні фруктози, що визначає її як найбільш ефективний субстрат для росту клітин.

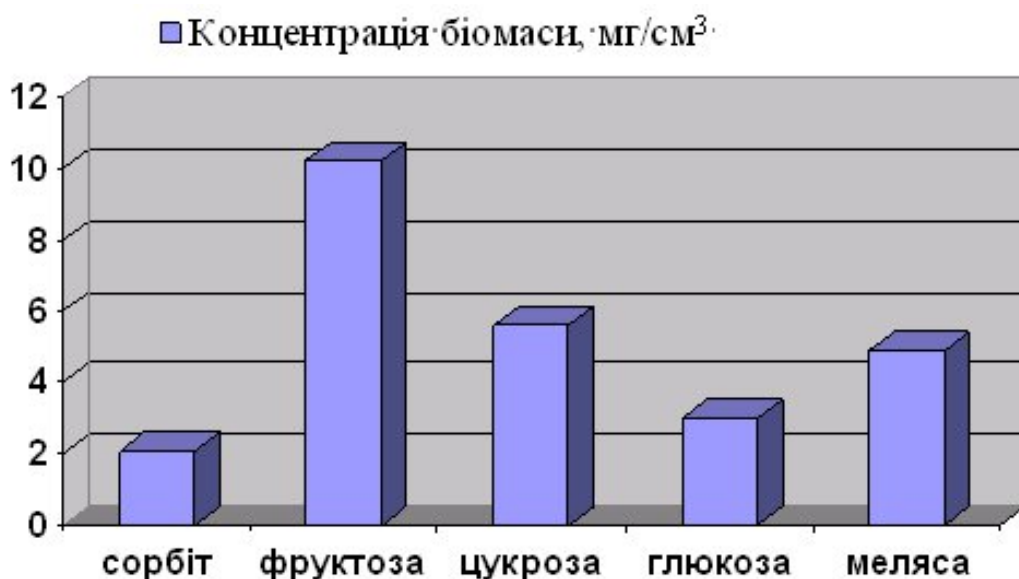


Рис. 3.7. Динаміка синтезу біомаси продуцента залежно від джерел Карбону живильного середовища

Щодо азотного живлення, штам *E. Ashbyi* продемонстрував здатність асимілювати широкий спектр сполук (рис. 3.8), а саме амінокислоти (метіонін, аргінін), неорганічні та органічні джерела (сечовину, хлорид та нітрат амонію, а також комплексні компоненти на основі пептону).

Водночас було виявлено групу метаболітів, які незначно підтримують ріст даного продуцента. До них належать хлорид та нітрат амоніаку, а також сечовина. Це свідчить про специфічність ферментативних систем штаму щодо певних форм Нітрогену.

Аналіз біосинтетичної здатності продуцента (рис. 3.8) дозволив ідентифікувати найбільш ефективні субстрати для продукції вітаміну. Серед перевірених амінокислот найвищі показники флавіногенезу забезпечили метіонін ($11,12 \pm 0,29$ мкг/см³) та аргінін ($8,54 \pm 0,25$ мкг/см³). Високу продуктивність за рибофлавіном також зафіксовано при використанні комплексного органічного джерела – пептону ($8,41 \pm 0,22$ мкг/см³).

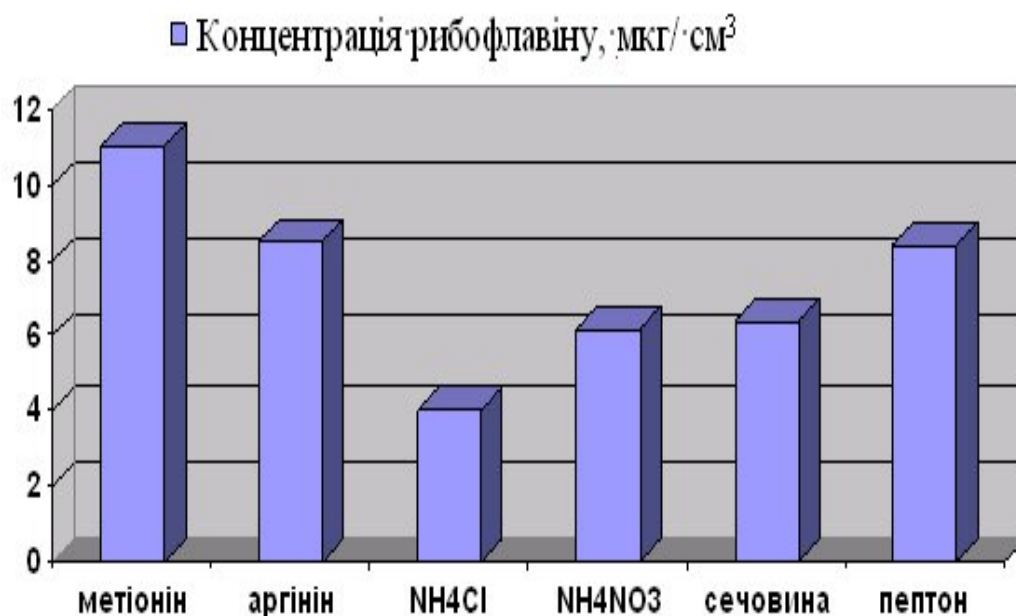


Рис. 3.8. Вплив джерел Нітрогену на активність синтезу рибофлавіну штамом *E.ashbyi* F-340

Щодо неорганічних та синтетичних речовин, кращі результати отримано на середовищах із сечовиною, де концентрація цільового продукту становила $6,4 \pm 0,42$ мкг/см³.

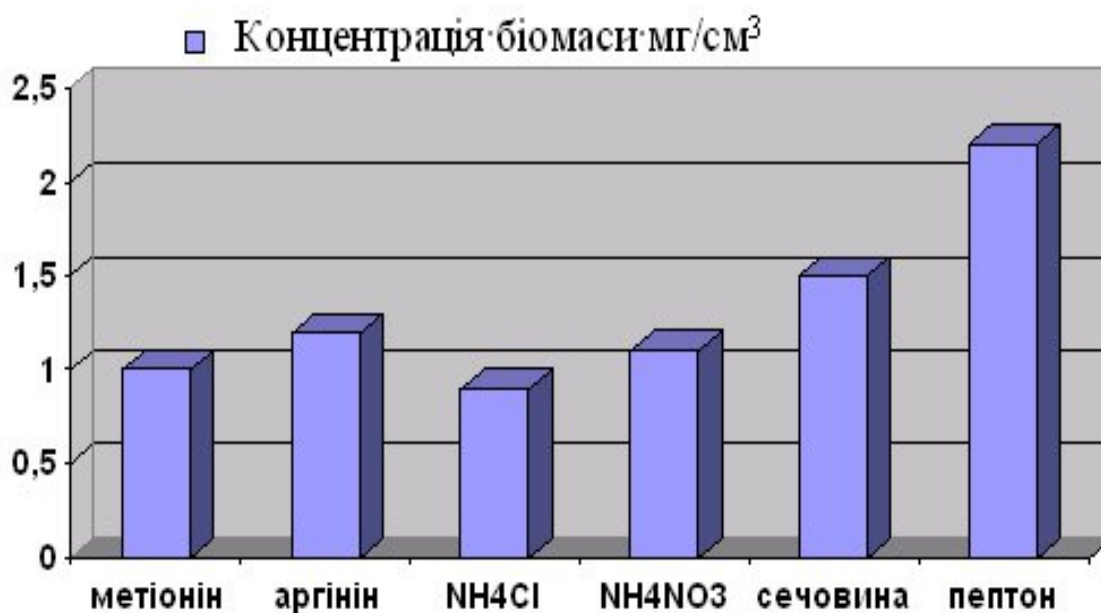


Рис. 3.9. Динаміка біомаси продуцента залежно від джерел Нітрогену в поживному середовищі

Динаміка росту міцеліальної біомаси (рис. 3.9) мала дещо іншу специфіку. Сприятливими для накопичення біомаси виявилися пептон та сечовина. Однак максимальний приріст клітинної маси було досягнуто на середовищі з додаванням пептону, що підкреслює його універсальність як для росту, так і для синтетичних процесів даного штаму (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Оптимальні джерела Карбону та Нітрогену для процесів функціональної життєдіяльності *E. Ashbyi* F-340

Показник продуктивності	Краще джерело вуглецю	Краще джерело азоту	Максимальний вихід
Синтез рибофлавіну	Сорбіт	Метіонін	$56,22 \pm 1,56$ мкг/см ³ (на сорбіті)
Накопичення біомаси	Фруктоза	Пептон	$10,12 \pm 0,37$ мг/см ³ (на фруктозі)

Встановлено, що використання пептону забезпечує у 1,5 рази інтенсивніше накопичення біомаси порівняно з аспарагіном. З огляду на економічну доцільність та високу біологічну цінність комплексних субстратів, було проведено скринінг складних поживних середовищ для оцінки їхнього впливу на флавіногенез (рис. 3.10, 3.11).

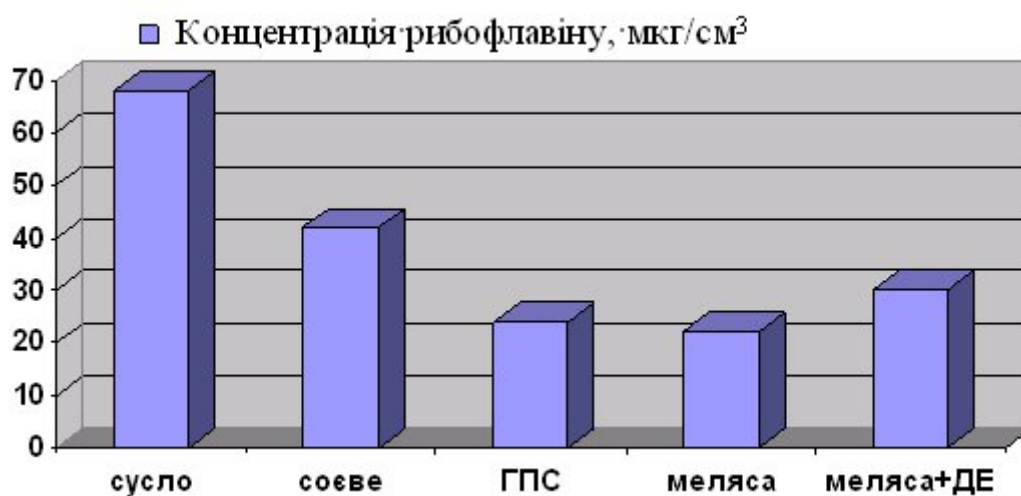


Рис. 3.10. Динаміка синтезу вітаміну В₂ залежно від використання спеціалізованих поживних середовищ

Результати порівняльного аналізу (рис. 3.10) свідчать, що пивне сусло виявилось найбільш ефективним субстратом для біосинтезу. Концентрація рибофлавіну досягла $68,28 \pm 2,65$ мкг/см³, що у 2,8 рази перевищує показники на ГПС та у 1,6 рази на соєвому середовищі. Традиційні середовища на соєвому та глюкозо-пептонному середовищах забезпечили вихід вітаміну, що був суттєво нижчим – $41,93 \pm 1,75$ та $23,51 \pm 0,8$ мкг/см³ відповідно.

Меляса з дріжджовим екстрактом забезпечила абсолютний максимум накопичення біомаси – $15,59 \pm 0,54$ мг/см³ (рис. 3.11), що підтверджує високий ростовий потенціал цього субстрату, попри нижчу інтенсивність синтезу вітаміну порівняно з суслом.

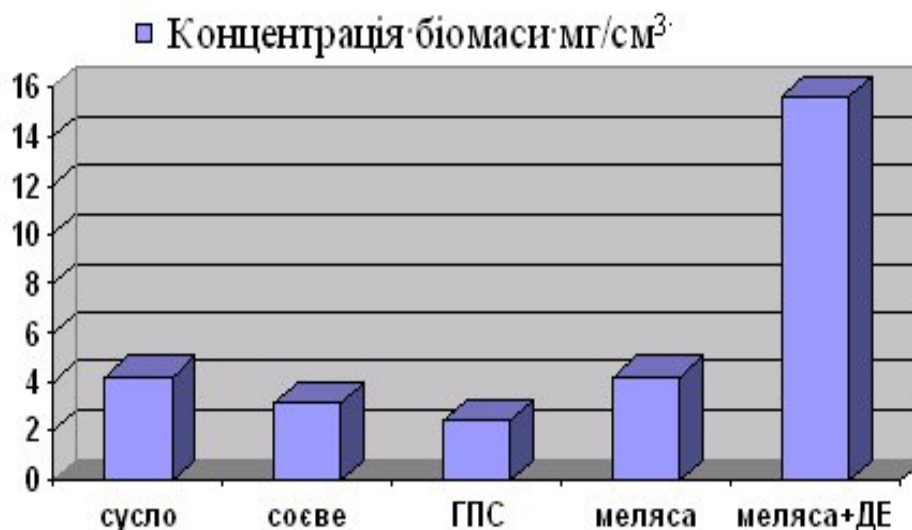


Рис. 3.11. Динаміка наростання маси продуцента залежно від використаних поживних середовищ

Фізико-хімічні чинники, зокрема активна кислотність та гідродинамічний режим (інтенсивність перемішування), є визначальними детермінантами ефективності мікробіологічного синтезу. Штам *E. Ashbyi* демонструє високу адаптивну здатність, зберігаючи життєздатність у широкому діапазоні рН від 4,0 до 8,0. Проте встановлено, що рівень рН виступає ключовим регулятором, який перемикає метаболізм продуцента між накопиченням клітинної маси та біосинтезом цільового продукту.

Аналіз попередньо отриманих даних підтверджує необхідність диференційованого підходу до підготовки поживних середовищ: початкові значення рН для отримання максимальної кількості біомаси та досягнення пікової концентрації рибофлавіну не збігаються, що потребує окремої оптимізації для кожного технологічного завдання.

Комплексний аналіз культурно-морфологічних та біосинтетичних особливостей штаму *E. ashbyi* F-340 дозволив встановити чітку залежність між параметрами середовища та вектором метаболізму продуцента. Виявлено, що для генерації активного посівного матеріалу та максимізації виходу біомаси оптимальним є діапазон рН 5,5–6,0, тоді як перемикання клітин на інтенсивний флавіногенез потребує початкового підлужування до рН 7,5.

Експериментально доведено, що динаміка накопичення вітаміну перебуває у зворотній кореляції з інтенсивністю росту міцелію. Це пояснюється метаболічною конкуренцією: активізація проліферації клітин стимулює синтез нуклеїнових кислот, що відтягує на себе пул спільних попередників – пуринів, тим самим обмежуючи флавіногенез. Ефективне керування цим процесом можливе через регуляцію аерації, яка забезпечує рівномірний розподіл нутрієнтів та кисню, знижуючи енерговитрати виробництва.

Визначено пріоритетність сорбіту та фруктози для стимуляції синтетичних процесів. При цьому фруктоза виступає найбільш ефективним енергетичним субстратом для побудови структурних компонентів клітини. Висока біосинтетична активність на середовищах із метіоніном, аргініном та пептоном свідчить про важливість аліфатичних амінокислот. Виняткова роль пептону зумовлена його полікомпонентним складом (суміш пептидів та вільних амінокислот), що забезпечує комплексний стимулюючий ефект.

Найвищий титр рибофлавіну ($68,28 \pm 2,65$ мкг/см³) зафіксовано на неохмеленому пивному суслі. Його ефективність пояснюється високим

вмістом мальтози, яка є специфічним індуктором накопичення ФАД, а також наявністю природного набору факторів росту.

Отримані дані дозволяють оптимізувати промисловий регламент виробництва кормового концентрату вітаміну B₂.

ВИСНОВКИ

1. Здійснено аналіз наукових джерел, що стосуються розробки технологічних аспектів культивування промислових штамів-продуцентів рибофлавіну, зокрема з використанням методів генетичної інженерії.

2. На основі проведених комплексних досліджень впливу фізико-хімічних та трофічних факторів на життєдіяльність продуцента рибофлавіну *E. Ashbyi* F-340 встановлено наступне:

- визначено диференціацію оптимумів для максимального накопичення біомаси ($6,0 \pm 0,26$ мг/см³) сприятливим є початкове рН 5,5–6,0, тоді як пік флавіногенезу ($47,7 \pm 1,8$ мкг/см³) досягається при рН 7,5;

- інтенсивність перемішування є критичним фактором із збільшення швидкості до 160 об/хв підвищує вихід вітаміну на 64% порівняно з низькоаераційним режимом (80 об/хв), що зумовлено високою потребою аскоміцетів у розчиненому кисні;

- найкращим джерелом Карбону для біосинтезу рибофлавіну є сорбіт ($56,22 \pm 1,56$ мкг/см³), тоді як для максимального приросту міцеліальної маси найефективнішою виявилася фруктоза ($10,12 \pm 0,37$ мг/см³);

- серед досліджених джерел Нітрогену найвищу стимулюючу дію на синтез вітаміну мають амінокислоти метіонін та аргінін. Універсальним компонентом виявився пептон, який забезпечує стабільно високі показники як за виходом біомаси, так і за рівнем накопичення рибофлавіну.

3. Для реалізації виявлених оптимумів запропоновано апаратурну схему, що включає багатоступеневу систему стерилізації повітря та блоки ферментації і подальшої сушки, що дозволяє отримувати якісний кормовий концентрат вітаміну B₂.

4. Найвищий титр рибофлавіну ($68,28 \pm 2,65$ мкг/см³) зафіксовано на неохмеленому пивному суслі.

5. Представлено технічне обґрунтування вибору ферментера та схеми інокуляції, що супроводжується необхідними графічними матеріалами.

РЕКОМЕНДАЦІЇ

На основі проведених досліджень можна сформулювати практичні рекомендації щодо складу оптимізованого поживного середовища та технологічних параметрів для промислового отримання кормового концентрату рибофлавіну за допомогою штаму *Eremothecium ashbyi* F-340:

- основне джерело Карбону – сорбіт (у концентрації, еквівалентній 10 г/дм³ за Карбоном), що забезпечує максимального виходу вітаміну ($56,22 \pm 1,56$ мкг/см³). Як альтернативу для прискореного накопичення біомаси можна використовувати фруктозу.

- джерела Нітрогену та факторів росту. Пептон – як основне органічне джерело для стабільного росту та флавіногенезу, метіонін або аргінін як специфічні амінокислотні стимулятори синтезу рибофлавіну, дріжджовий екстракт у концентрації 0,5% для забезпечення вітамінами та мікроелементами, сечовина або хлорид амоніаку як додаткові бюджетні джерела азоту (в еквіваленті 3 г/дм³ NH₄Cl).

Підтримування рН на рівні 7,5 (корекція 0,1 н. NaOH). Це забезпечує на 58% вищий вихід цільового продукту порівняно зі стандартними середовищами. Інтенсивне перемішування на рівні 180 об/хв (або відповідний рівень масопередачі кисню в промисловому ферментері). Підтримка стабільної температури на рівні 28°C, тривалість процесу – 7 діб (із переходом у стаціонарну фазу на 5 добу для максимального накопичення флавінів). Для скорочення лаг-фази рекомендується вносити 5% об'єму фізіологічно активної глибинної культури, попередньо вирощеної на ГПС.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Радченко М. М., Андріяш Г. С., Бейко Н. Є. та ін. Оптимізація умов культивування штаму-продуцента рибофлавіну. *Biotechnologia Acta*. 2020. Т. 13, № 2. С. 48–55.
2. Андріяш Г. С., Радченко М. М., Шульга С. М. Оптимізація складу поживного середовища для культивування продуцента рибофлавіну *Ashbya gossypii*. *Біотехнологія*. 2013. Т. 6, № 3. С. 98–104.
3. Бейко Н. Є., Тигунова О. О., Шульга С. М. Вплив джерел вуглецю на біосинтез рибофлавіну грибом *Ashbya gossypii*. *Мікробіологічний журнал*. 2017. Т. 79, № 4. С. 35–42.
4. Радченко М. М., Степанова Т. О., Поліщук О. М. Використання відходів харчової промисловості як субстратів для отримання вітаміну В₂. *Харчова наука і технологія*. 2019. Т. 13, № 1. С. 44–51.
5. Тигунова О. О., Шульга С. М. Промислові продуценти вітамінів: біохімічні та генетичні аспекти. *Вісник НАН України*. 2021. № 8. С. 56–64.
6. Поліщук О. М., Радченко М. М. Математичне моделювання процесу культивування *Bacillus subtilis* – продуцента рибофлавіну. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. 2016. № 5 (109). С. 28–34.
7. Шульга С. М. Біосинтез вітамінів мікроорганізмами. *Біотехнологія*. 2011. Т. 4, № 2. С. 9–21.
8. Averianova L. A., Balabanova L. A., Son O. M. Production of Vitamin B₂ (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. Vol. 8, Art. 570. P. 1–15.
9. Дмитрук, К. В. Конструювання надпродуцентів рибофлавіну (вітаміну В₂) дріжджів *Candida famata* [Текст] / К. В. Дмитрук, В. Ю. Ячишин, А. Я. Вороновський, Д. В. Федорович, А. А. Сибірний // Наука та інновації. 2009. Т. 5, № 6. С. 70–74.
10. Сибірний А.А., Федорович Д.В., Борецький Ю.Р., Вороновський А.Я. Мікробний синтез флавінів. Київ: Наукова думка, 2006. 253 с.

11. Карпов Л. М. Порівняльна динаміка вмісту макроергічних фосфатів і загальної АТФазної активності в органах щурів після різних способів введення їм вітамінних комплексів / Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов, Н. В. Полтавцева // Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Серія : біологія. 2008. Т. 814, № 7. С. 13-17.
12. Карпов Л. М. Вплив комплексу вітамінів групи В на активність Na, K-АТФази в умовах інгібування біосинтезу білка в тканинах та органах щурів / Л. М. Карпов, В. Ю. Анісімов, О. В. Безп'ятих // Аграрний вісник Причорномор'я. Сільськогосподарські та біологічні науки. 2005. № 31. С. 188-189.
13. Поліщук В.Ю., Маланюк М.І., Дуган ОМ. Морфолого-культуральні і біосинтетичні властивості *Eremotecium ashbyii* Guill // Наукові вісті НТУУ «КПІ». 2011. № 3. С.74-78.
14. Lim S. H., Choi J. S., Park E. Y. Microbial production of riboflavin using *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famata*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2001. Vol. 6, No. 2. P. 75–88.
15. Stahmann K. P., Revuelta J. L., Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* of industrial relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000. Vol. 53, No. 5. P. 509–516.
16. Біотехнологія отримання вітамінів і коферментів: методичні вказівки до вивчення дисципліни для студентів спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" / уклад. Н. І. Теслюк. Київ: НУХТ, 2018. 45 с.
17. Шинкаренко Л. М., Наглій С. В., Маслова Г. О. Оптимізація умов культивування продуцентів біологічно активних речовин. *Вісник Національного технічного університету «ХПІ»*. Серія: Нові рішення в сучасних технологіях. 2015. № 45. С. 112–118.
18. Дуган О. М., Галкін О. Б. Промислова біотехнологія: основи технологічних процесів: навчальний посібник. Київ: ІВЦ «Політехніка», 2014. 268 с.

19. Сирота Т. В. Біосинтез вітамінів мікроорганізмами та шляхи його інтенсифікації. *Наукові праці НУХТ*. 2011. № 38. С. 15–20.
20. Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів»: від 31 трав. 2007 р. № 1103-V / Верховна Рада України. *Відомості Верховної Ради України*. 2007. № 35. Ст. 484.
21. Abbas C. A., Sibirny A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011. Vol. 75, No. 2. P. 321–360.
22. Дмитрук К.В., Ячишин В.Ю., Вороновський А.Я., Федорович Д.В., Сибірний А.А. Конструювання надпродуцентів рибофлавіну (вітаміну В2) дріжджів *Candida famata* // Наука та інновації. 2009. Т. 5. № 6. С. 70-74.
23. Park M. Y., Abbott D. A., Zelle R. M. Metabolic engineering of *Candida famata* for enhanced riboflavin production. *Metabolic Engineering*. 2011. Vol. 13, No. 2. P. 212–220.
24. Schwechheimer S. K., Park M. Y., Revuelta J. L. Biotechnology of riboflavin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 100, No. 5. P. 2107–2119.
25. Jimenez A., Santos M. A., Revuelta J. L. Genetic engineering of *Ashbya gossypii* for increased riboflavin production. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71, No. 11. P. 6746–6751.
26. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія. К.: НУХТ, 2009. 391 с.
27. Sibirny A. A., Voronovsky A. Y., Abbas C. A. Flavinogenesis in yeasts. *Yeast*. 2003. Vol. 20, No. 16. P. 1327–1343.
28. Kalingan A. E., Liao C. M. Influence of oxygen transfer on riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *Bioprocess Engineering*. 2000. Vol. 23, No. 5. P. 445–449.

29. Kato T., Park E. Y. Optimization of riboflavin production by *Ashbya gossypii* using vegetable oils *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012. Vol. 114, No. 1. P. 50–55.
30. Wu Q., Chen T., Chen X. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced riboflavin production by metabolic pathway analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007. Vol. 55, No. 13. P. 5054–5059.
31. Shi S., Chen T., Zhao X. Effect of different nitrogen sources on riboflavin production by *Bacillus subtilis*. *Frontiers of Chemical Engineering in China*. 2009. Vol. 3, No. 1. P. 65–69.
32. Lu X., Wu Q., Zhao X. Improvement of riboflavin production by *Bacillus subtilis* through metabolic engineering. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 23, No. 7. P. 972–978.
33. Wang G., Shi S., Chen T. Optimization of agitation and aeration for riboflavin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2014. Vol. 19, No. 3. P. 450–456.
34. Agostini F. G., Revuelta J. L. Bio-based production of riboflavin: current status and future prospects. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2018. Vol. 3, No. 1. P. 1–9.