

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична

промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

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

МИЧКОДАН Марія Іванівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез ціанкобаламіну *Pseudomonas denitrificans*»

керівник роботи СТАБНИКОВ Віктор Петрович, доц., д.т.н.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Pseudomonas denitrificans*,

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва доксорубіцину – 1 аркуш формату А1.

Апаратурна схема виробництва доксорубіцину – 1 аркуш формату

А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	04.04.2022 – 08.04.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	09.04.2022 – 13.04.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.04.2022 – 20.04.2022	
4	Біосинтез цільового продукту	21.04.2022 – 26.04.2022	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	27.04.2022 – 03.05.2022	
6	Специфікація обладнання	04.05.2022 – 13.05.2022	
7	Опис технологічної схеми біосинтезу	14.05.2022 – 19.05.2022	
8	Контроль виробництва	20.05.2022 – 25.05.2022	
9	Оформлення пояснювальної записки	26.05.2022 – 01.06.2022	
10	Виконання графічної частини проекту	26.05.2022 – 01.06.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Марія МИЧКОДАН
(ім'я та прізвище)

Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

Реферат

Дипломна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схеми біосинтезу ціанокобаламіну (вітамін В₁₂) за допомогою *Pseudomonas denitrificans* SC510, який синтезує 214,3 мг/л цільового продукту. Розрахована потужність виробництва ціанокобаламіну становить 33,945 кг готового продукту. Технологічний процес складається з допоміжних (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних агентів, приготування та стерилізація підживлювального розчину та підготовка і стерилізація поживних середовищ) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалці та посівних апаратах об'ємами 10 л, 100 л, 1 м³, а також виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³).

Дипломний проект викладений на 81 сторінці друкованого тексту, містить 14 таблиць, 5 рисунків. Складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (71 джерел) та графічної частини (2 креслення формату А1).

Ключові слова: *Pseudomonas denitrificans*, ціанокобаламін, вітамін, кормова добавка, *Pseudomonas*, цукрубурякорва меляса.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ...7	
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	11
2.2. Морфолого-культуральні ознаки	19
2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	19
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	20
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	21
3.1 Потреба у цільовому продукті.....	21
3.2. Розрахунок річної потреби.....	22
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.	23
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	24
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	28
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	28
4.1.1. Обґрунтування умов і способу культивування	28
4.1.2. Вибір типу ферментера.....	29
4.1.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	31
4.1.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	32
4.1.4.1. Обґрунтування вибору дезінфікуючих засобів для виробництва ціанкобаламіну.....	37
4.1.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	45
4.1.5.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.....	45

4.1.5.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	46
4.1.5.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	47
4.1.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН.....	48
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	50
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ ЦІАНОКОБАЛАМІНУ	53
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	66
7.1. Мікробіологічний контроль.....	66
7.1.1. Мікробіологічний контроль чистоти культури.....	66
7.1.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища	
7.2. Визначення концентрації біомаси.....	66
7.3. Визначення концентрації джерел Карбону та Нітрогену.....	67
7.3.1. Визначення концентрації джерела Карбону.....	67
7.3.2. Визначення концентрації джерела Нітрогену (сульфат амонію).....	67
7.3.3. Визначення концентрації джерела Нітрогену (кукурудзяний екстракт).....	68
7.4. Визначення концентрації цільового продукту.....	68
7.5. Карта постадійного контролю.....	69
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	74

Вступ

Вітаміни — органічні сполуки різної хімічної природи, необхідні в невеликих кількостях для нормального обміну речовин і життєдіяльності живих організмів. Багато вітамінів є попередниками коферментів, які беруть участь у ферментативних реакціях. Людина і тварини не синтезують вітаміни, або синтезують у недостатній кількості, тому повинні одержувати їх з їжею. Нестача вітамінів приводить до порушення обміну речовин [1].

Актуальність теми. В наш час в Україні модернізація промисловості і науки являється актуальною проблемою в вирішенні якої значне місце відводиться біотехнології.

Однією з важливих задач модернізації являється вдосконалення технології отримання біологічно активних речовин.

Вітамін B₁₂ є цінним лікувальним препаратом який використовується в фармацевтичній промисловості, оскільки він є чинником росту й стимулятором гемопоезу, впливає на функції печінки й нервової системи, активує процеси згортання крові, обмін вуглеводів і ліпідів, бере участь у синтезі різних амінокислот. Застосовується в медицині при лікуванні хворих на такі хвороби, як хронічна анемія, алкоголізм, тривала лихоманка, поліневрит, радикуліт, невралгія (у т.ч. невралгія трійчастого нерва), гіпотрофія, фунікулярний мієлоз, травми периферичних нервів, бічний аміотрофічний склероз, дитячий церебральний параліч, хвороба Дауна. Шкірні захворювання (псоріаз, фотодерматоз, герпетиформний дерматит, атопічний дерматит), а в профілактичних цілях - при призначенні бігуанідів, аскорбінової кислоти у високих дозах, патології шлунка і кишечника з порушенням всмоктування вітаміну B₁₂ (резекція частини шлунка, тонкої кишки, хвороба Крона, целиакія, синдром мальабсорбції), злякисні утворення підшлункової залози і кишечника, променевої хвороби, стресовий стан і інфекція (при довгостроковому протіканні), дієта, патологія нирок [2].

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.04 КР ПЗ			
Розроб.		Мичкодан М. І.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Стабніков В. П.					5	81 ₇
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

Вітамін широко використовується в промисловості, як кормові добавки для тварин, птахів.

У тваринному організмі відіграє значну роль в процесі кровотворення, роботі червоного кісткового мозку і біосинтезі нуклеїнових кислот. У своєму складі містить кобальт. За допомогою вітаміну В₁₂ здійснюється ресинтез в організмі незамінної амінокислоти метіоніну. Цей вітамін впливає на ріст тварин, активізацію білкового обміну, сприяє засвоєнню амінокислот.

У дорослої великої рогатої худоби та овець спостерігається поява злоякісної анемії та її наслідків при порушенні мікробного синтезу вітаміну В₁₂ в преджелудках, коли тварини отримують корми, бідні кобальтом.

Хорошим джерелом вітаміну В₁₂ є корми тваринного походження, водорості, сапропель. У кормах рослинного походження цей вітамін відсутній. Тому в комбікорми і раціони тварин з однокамерним шлунком і птиці додають кристалічний ціанкобаламін [3].

Найбільш перспективним методом отримання ціанкобаламіну є мікробіологічний синтез. Хімічний спосіб зараз не використовується, тому що він дуже складний і включає багато стадій (понад 70), тому він не є актуальним на сьогодні.

Новизна теми. В даній роботі передбачається використання мутанта (дикий штам) *Pseudomonas denitrificans*. Цей штам було отримано шляхом мутації. Такий прийом дозволив збільшити вихід вітаміну В₁₂ (з 60 мг/л до 214,3 мг/л.) [4].

РОЗДІЛ 1.ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

Вітамін В₁₂ (також відомий як кобаламін) - це вітамін групи В, який відіграє важливу роль у клітинний метаболізм, особливо при синтезі ДНК, метилюванні та мітохондріальному метаболізмі [5].

Є важливим вітаміном, який надходить в організм з їжею. Рівень його залежить не тільки від надходження, але і від стану шлунково-кишкового тракту (ШКТ) і гепатобіліарної системи. Недолік призводить до розвитку порушень кровотворення, ураження нервової системи, атрофічних змін епітелію ШКТ, атеросклерозу, жирового гепатозу, метилмалонової ацидурії. У дітей з наявністю генетичного дефекту ферментів, необхідних для перетворення вітаміну В₁₂, може розвиватися мегалобластна анемія при нормальному рівні вітаміну в крові.

Вітамін В₁₂ є кофактором ферменту гомоцистеїнметилтрансферази, що бере участь у перетворенні гомоцистеїну в метіонін, який важливий для синтезу фосфоліпідів і мієлінової оболонки нейронів. Тому дефіцит вітаміну В₁₂ супроводжується неврологічною симптоматикою (психічні розлади, поліневрити, фунікулярний мієлоз - ураження спинного мозку)[6].

Вітамін В₁₂ існує у декількох формах і містить мінерал кобальт, тому сполуки з активністю вітаміну В₁₂ спільно називають «кобаламінами». Метилкобаламін та 5-дезоксиаденозилкобаламін – це форми вітаміну В₁₂, які активні в метаболізмі людини [7].

Це кристалічний порошок темно-червоного кольору, без запаху, гігроскопічний, важкорозчинний у воді, розчинний у спирті, практично нерозчинний в етері, хлороформі, ацетоні. При 300–320 °С починає плавитися з розкладанням [8].

Вітамін В₁₂ (C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P) за хімічною будовою належить до класу кориноїдів; його молекула складається з двох частин — кобальтвмісної

					НУХТ БТЕК 04.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мичкодан М. І.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Стабніков В. П.					7	81
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

порфіриноподібної (хромофорної) та нуклеотидної структури:

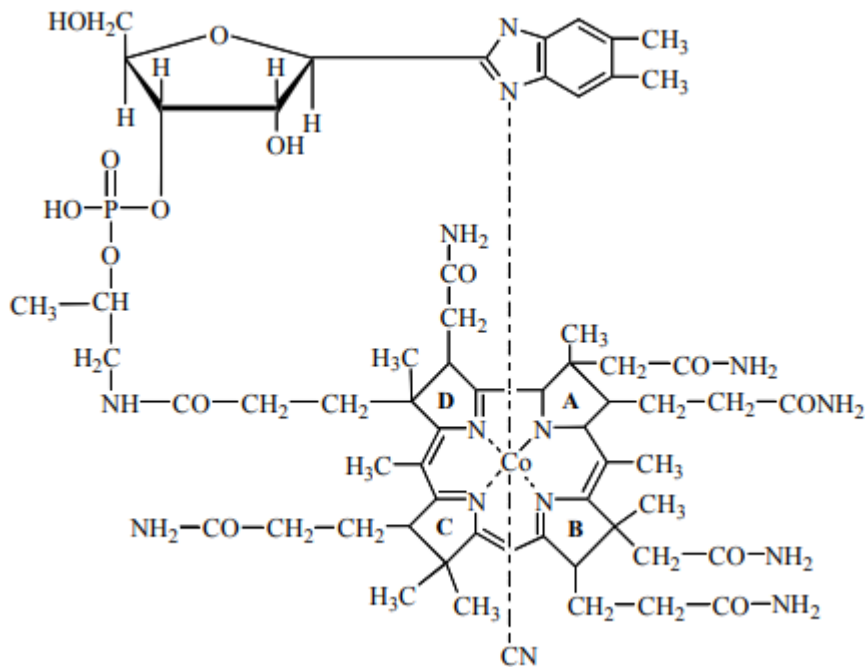


Рис. 1.1. Структура вітаміну В₁₂ (ціанокобаламін)

Атом Co^+ , що міститься в центрі ядра хромофорної структури, в комерційних препаратах вітаміну В₁₂ сполучений із ціанідною групою (ціанокобаламін). У разі заміщення ціаногрупи на інші радикали утворюються такі похідні вітаміну В₁₂, як гідроксикобаламін (вітамін В_{12В}), нітрокобаламін (вітамін В_{12С}); в організмі людини синтезуються коферментні форми вітаміну — метилкобаламін (міститься в цитоплазмі) і 5-дезоксиаденозилкобаламін (мітохондріальна форма коферменту).

Біологічні властивості та механізм дії. Коферментні форми вітаміну В₁₂ беруть участь в каталізі біохімічних реакцій такими ферментами:

– метилмалоніл-КоА-мутазою (ферментом, що каталізує реакцію перетворення метилмалоніл-КоА на сукциніл-КоА); коферментом є 5-дезоксиаденозилкобаламін (механізм реакції розглянутий у главі 18). Реакція має значення для метаболізму метилмалоніл-КоА, що утворюється при розщепленні амінокислот із розгалуженими ланцюгами — L-валіну, L-лейцину, L-ізолейцину та β -окисленні жирних кислот з непарною кількістю вуглецевих атомів;

– гомоцистеїн-метилтрансферазою (в реакції синтезу метіоніну з гомоцистеїну); коферментом є метилкобаламін, що переносить метильну групу на гомоцистеїн з N⁵-метилтетрагідрофолату. Біохімічне значення реакції полягає в продукуванні

метіоніну, який є головним донором метильних груп у реакціях синтезу фізіологічно активних сполук, метилюванні нуклеотидів нуклеїнових кислоти тощо [9].

Вітамін В₁₂ є важливим мікроелементом, оскільки організм людини не здатний виробляти вітамін, і його потрібно поглинати з білків тваринного походження. Вживаний вітамін В₁₂ проходить складний процес всмоктування та засвоєння. Продукти тваринного походження містять достатню кількість В₁₂, найбільше його в печінці. Можливий синтез мікрофлорою кишечника. Всмоктування вітаміну відбувається в тонкому кишечнику за участю глікопротеїну (внутрішнього фактора Кастла), щ синтезується обкладковими клітинами шлунку. Тому при недостатності шлункової секреції, а також після часткової резекції шлунку можливий прояв гіповітамінозу [10].

Ціанокобаламін необхідний для клітинної функції. Дефіцит вражає 15% пацієнтів старше 65 років і призводить до гематологічних та неврологічних розладів. Низький рівень вітаміну В₁₂ також може бути незалежним фактором ризик розвитку ішемічної хвороби серця. Високий рівень вітаміну В₁₂ пов'язаний із запаленням і є поганим прогнозом для критично хворих пацієнтів. Лікування дефіциту вітаміну В₁₂ є простим, але може бути довічним[10].

Пацієнтам із запальними захворюваннями кишечника (ВЗК) зазвичай рекомендується вживати різні типи вітаміну В₁₂, оскільки вітамін В₁₂ як правило, всмоктується в товстій кишці [11].

Ціанкобаламіну не притаманна коензимна активність, і після введення в організм людини він повинен трансформуватися в свою коензимну форму [12].

Після 10 років досліджень, у яких брали участь понад 100 вчених, повний хімічний синтез вітаміну В₁₂ здійснено у 1973 р. Р. Вудвордтом і А. Ешенмозером. Хімічний синтез досить складний і має 70 етапів, тому на сьогодні основним способом одержання вітаміну В₁₂ є мікробіологічний синтез. Щорічно у світі виробляється понад 10-12 т цього вітаміну[13].

У природі вітамін В₁₂ синтезується в деяких бактеріях та археях, використовуючи один із двох альтернативних шляхів: аеробний шлях

(представлений *Pseudomonas denitrifians*) та анаеробний шлях (представлений *Salmonella typhimurium*) [14].

Вітамін В₁₂ все ще є предметом інтенсивних досліджень, і, зокрема, його роль у запобіганні цим незворотним неврологічним ураженням залишається незрозумілою [15].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.

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

У 1972 р. було здійснено повний хімічний синтез кориноїдної структури. Для хімічного синтезу кориноїду необхідні 37 послідовних етапів. У зв'язку зі складністю такого синтезу мікробіологічний метод досі залишається єдиним промисловим способом одержання вітаміну В₁₂. Продуцентами цього вітаміну є *Pseudomonas denitrificans* SC510, *Pseudomonas denitrificans* M-2436, *Pseudomonas denitrificans* MB 580 (табл. 2.1) [12].

У табл. 2.1, наведені мікроорганізми, які здатні синтезувати високий вміст кобаламіну, проте тривалість культивування штамів, як і склад поживних середовищ є різним. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента розраховуємо вартість поживних середовищ для культивування вибраних мікроорганізмів (табл. 2.2).

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, середовище для культивування *Pseudomonas denitrificans* SC510, є набагато дешевшим, ніж для *Pseudomonas denitrificans* MB 580, *Pseudomonas denitrificans* M-2436 відповідно. Проте різниця у ціні, у *Pseudomonas denitrificans* SC510, і *Pseudomonas denitrificans* M-2436 є несуттєвою.

Тому для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розраховуємо умовну вартість 1 г продукту (табл. 2.3). Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що умовна вартість В₁₂, синтезована штамом *Pseudomonas denitrificans* SC510, є найнижчою (0,0075 грн/г), а кількість утворення В₁₂ за 1 год – найвищою (1,26).

Переваги у використанні бактерії *Pseudomonas denitrificans* SC510 як продуцента ціанкобаламіну в наступному:

- вихід продукту за допомогою цієї бактерії є найбільшим в порівнянні з

іншими продуцентами;					НУХТ БТЕК 04.02.04 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Мичкодан М. І.			Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Стабніков В. П.				11	81
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В. П.					
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.							

- бактерія розповсюджена в природі;
- росте на доступних субстратах за близького до нейтрального рН (рН=7,3-7,4, а в метаногенних бактерій – рН = 5,0-5,2);
- органічних факторів росту не потребують, тому легко вирощувати[16].

Порівняльна характеристика продуцентів вітаміну В₁₂

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Концентрація продукту, мг/л	Умови культивування	Використана література
	компонент	концентрація, г/л			
1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas denitrificans</i> SC510	цукробурякова мел яса	50	214,3	pH 7,3-7,4; 170 год	Larissa Balabanova, LiudmilaAverianova, Maksim Marchenok, Oksana Son and Liudmila Tekutyeva. <i>Microbial and Genetic Resources for Cobalamin (Vitamin B₁₂) Biosynthesis: From Ecosystems to Industrial Biotechnology</i>. Academic Editor: Georg A. Sprenger <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 2021 , 22(9), 4522; https://doi.org/10.3390/ijms22094522
	кукурудзяний екстракт	10			
	KH ₂ PO ₄	5			
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,3			
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,7			
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,2			
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,5			
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,02			
	CoCl ₂ · 7H ₂ O	0,02			
	5,6 ДМБ	0,0045			

<p><i>Pseudomonas denitrificans</i> M-2436</p>	<p>Цукробурякова меляса Дріжджовий екстракт (NH₄)₂HPO₄ MgSO₄·7H₂O MnSO₄·H₂O CoNO₃ ZnSO₄·7H₂O Na₂MoO₃</p>	<p>100 2 5 3 0,2 0,188 0,020 0,005</p>	<p>60</p>	<p>pH 7,4; 90 год</p>	<p>М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.</p>
<p><i>Pseudomonas denitrificans</i> MB 580</p>	<p>Глюкоза Лактоза Дріжджовий екстракт Сірчаноокислий амоній Хлористий кобальт 5,6-ДМБ</p>	<p>30 10 70 2 0,01 25</p>	<p>150</p>	<p>pH 7; 170 год</p>	<p>Marie Sych, J., Lacroix, C., & Stevens, M. J. A. (2016). Vitamin B₁₂ - Physiology, Production and Application. Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants, 129–159. doi:10.1002/9783527681754.ch6</p>

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів В₁₂

Біологічний агент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas denitrificans</i> SC510	Цукробурякова м'яса	50	18	0,9	1
	Кукурудзяний екстракт	10	25	0,25	2
	KH ₂ PO ₄	5	57	0,28	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,3	60	0,138	2
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,7	18,6	0,014	3
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,5	10,2	0,015	3
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,2	33	0,0066	1

	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2	2700	0,0054	2
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	30	0,0006	1
	5,6 ДМБ	0,0045	921,2	0,0041	4
		Вартість 1 л середовища – 1,613 грн			
<i>Pseudomonas denitrificans</i> M-2436	Цукробурякова меляса	100	18	1,8	1
	Дріжджовий екстракт	2	700	1,4	3
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	5	18,6	0,093	3
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3	23	0,069	3
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2	33	0,0066	1
	CoNO_3	0,188	29	0,005452	2
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,020	30	0,0006	1
	Na_2MoO_3	0,005	510	0,00285	1
		Вартість 1 л середовища – 3,36 грн			
	Глюкоза	30	57	1,71	1
	Лактоза	10	58,50	0,585	1

<i>Pseudomonas denitrificans</i> MB 580	Дріжджовий екстракт	70	700	49	3
	Сірчаноокислий амоній	2	22	0,044	2
	Хлористий кобальт	0,01	990	0,0099	3
	5,6-ДМБ	0,025	921,2	0,024	4
Вартість 1 л середовища – 51,46 грн					

Примітка. * - Ціни наведено станом на січень 2021 р. 1 - <https://flagma.ua>, 2 - <https://prom.ua>, 3 - <https://www.systopt.com.ua>, 4 - <https://www.sigmaaldrich.com.ua>

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г В₁₂, синтезованих на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація В ₁₂ , мг/л	Тривалість культивування, год	К-сть утворених В ₁₂ за годину, г/год	Вартість 1л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas denitrificans</i> SC510	214,3	170	1,26	1,613	0,0075
<i>Pseudomonas</i>	60	90	0,67	3,36	0,056

<i>denitrificans</i> M-2436					
<i>Pseudomonas denitrificans</i> MB 580	150	170	0,88	51,46	0,343

Отже, можемо зробити висновок, що біологічний агент вибраний правильно, адже він дозволяє виробляти цільовий продукт з меншими затратами ресурсів, часу та коштів, а також є більш екологічно безпечним, ніж наприклад використання будь-якого іншого агенту і утворювати велику кількість вітаміну, порівняно з іншими продуцентами.

Але прогрес не стоїть на місці, проводять нові дослідження і відкриття і все може змінитися з відкриттям нових мікроорганізмів.

2.2. Морфолого-культуральні ознаки

Pseudomonas denitrificans SC510 - це паличкоподібні, аеробні, гетеротрофні [17], грамнегативні [18], види бактерій зі здатністю виробляти вітамін В₁₂[17]. Прямі або злегка вигнуті, але не спіральні палички 0,5-1 x 1,5- 5 мкм. Клітини в культурах часто об'єднуються в невеликі грудочки або зерна, оточені товстою слизовою оболонкою. Чохлів не утворює, стадії спокою не відомі. Рухаються за рахунок одного або кількох полярних джгутиків (один або цілий пучок на одній або обох кінцях клітини); в окремих випадках нерухомі. В деяких видів можливе також утворення латеральних джугитків з коротшою довжиною хвилі [19]. Колонії *P. denitrificans* SC510 не флуоресцирують, і вони набувають гладкий, майже біло-коричневий вигляд [20].



Рис. 3.1. *P. Denitrificans* бактерії

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки

Хімічний склад клітинної стінки бактерій постійний і, як правило, не змінюється на різних стадіях розвитку культури або при виникненні мутацій. Відсоток Г + Ц (гуанін - цитозин) в ДНК коливається в межах 58-69% [17]. Оптимальна температура росту становить 25°C [20]. Органічних факторів росту не потребує. За типом живлення - хемоорганотроф (деякі види – факультативні автотрофи, здатні використовувати в якості джерела енергії Н₂ або СО₂) [18]. *Pseudomonas denitrificans* SC510 природно стійкі до пеніциліну і більшості бета-лактамових антибіотиків, але чутливі до таких антибіотиків як піперацилін, імпенем, тобраміцин та цiproфлоксацин. Клітинна стінка містить поріни. Цей мікроорганізм широко поширені в природі. Бактерію можна зустріти в повітрі, ґрунті, морських і

прісних водоймах, стічних водах та мулі, нафти і на газових родовищах [21]. Псевдомонади були виявлені на харчових продуктах, тілах тварин, рослинах, а також у гнійних ранах і екскрементах хворих ссавців [22].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Pseudomonas denitrificans* SC510 наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [23].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас – *GammaProteobacteria*

Порядок: *Pseudomonadales*

Родина – *Pseudomonadaceae*

Рід – *Pseudomonas*

Вид – *Pseudomonas denitrificans*

Штам – *Pseudomonas denitrificans* SC510

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕОБҐРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільовому продукті

Вітамін В₁₂ це кристалічний, гігроскопічний порошок темно-червоного кольору, без запаху. Ціанокобаламін має високу біологічну активність і бере участь у вуглеводному, білковому, ліпідному обміні. Підвищує регенерацію тканин, нормалізує кровотворення, функції печінки та нервової системи, активує систему згортання крові, знижує вміст холестерину в крові (при атеросклерозі). В організмі (переважно в печінці) перетворюється на кофактор - кобамід, що входить до складу численних ферментів, в тому числі до складу редуктази.

Зважаючи на свої властивості ціанокобаламін широко використовують в сільськогосподарській промисловості. У багатьох фермерських господарствах тверді корми, у раціоні тварин, представлені сіном та соломою низької якості та невисокої поживності. Це не дозволяє повністю реалізувати потенціал тварин, через що господарство щороку втрачає практично третину можливих надоїв молока. Вважається що введення в раціон вітаміну В₁₂ для тварин може збільшити надої молока більше, ніж на 10%, і жирність молока на 16%. Це все пояснюється тим що вітамін В₁₂ не міститься в рослинних кормах, як і низка інших вітамінів В-комплексу, а виробляється тільки шляхом зв'язування кобальту дріжджовим або бактеріальним синтезом, нестача ціанокобаламіну в організмі призводить до збільшення вмісту метилмалонової кислоти яка є основним інгібітором синтезу жирних кислот.

Отже додаткове введення вітаміну В₁₂ у раціон тварин підвищує рентабельність їхнього утримування та дає можливість для покращення показників сільськогосподарської промисловості. Внесення вітаміну у раціон тварин можна проводити наступними методами:

1. ін'єкційне введення препаратів ціанокобаламіну у дозі 5-10 мкг/кг маси

		ТІЛА;			НУХТ БТЕК 04.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мичкодан М. І.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Стабніков В. П.					21	81
Реценз.								23
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В. П.						

2. додавання захищених форм вітаміну B₁₂ у премікси чи комбікорми;
3. вводити в раціон сировину, багату на вітаміни групи B, зокрема B₁₂, наприклад висівки, коренеплоди (особливо морква), дріжджі.

Серед вище наведених методів можна зазначити що використання ін'єкційного препарату може призвести до виникнення ін'єкційного стресу, який є небажаним та в порівнянні з іншими двома методами він є більш складнішим і в результаті недоцільним. Використання ціанокобаламіну в якості кормової добавки є найперспективнішим варіантом серед наведених так як він є менш затратним ніж введення в раціон тварин природньої сировини збагаченої вмістом цього вітаміну.

3.2. Розрахунок річної потреби

Визначивши сферу застосування ціанокобаламіну розрахуємо потребу в даному вітаміні. Для розрахунку візьмемо статистичні дані поголів'я корів в Україні, згідно яких станом на 2021 рік поголів'я крупної рогатої худоби становить приблизно 3,1 млн. голів, про це свідчать дані Державної служби статистики України [24]. Враховуючи велику кількість худоби і той факт що не всі власники худоби будуть використовувати ціанокобаламін в якості кормової добавки, для подальших розрахунків візьмемо 10 % від данної кількості.

$$3\ 100\ 000 \times 10\ \% = 310\ 000\ \text{голів}$$

Для визначення кількості спожитого вітаміну необхідно розрахувати приблизну вагу даної кількості крупної рогатої худоби, враховуючи що середня вага однієї худоби становить приблизно 500 кг [25].

$$310\ 000\ \text{голів} \times 500\ \text{кг} = 155\ 000\ 000\ \text{кг (загальна вага)}$$

Дізнавшись середню вагу загальної кількості худоби вираховуємо кількість кормової добавки, яку потрібно додавати в раціон худоби. Різні виробники пропонують різну кількість внесення добавки, приймемо найменшу необхідну кількість згідно з інструкції [26], яка становить 60-80 мг / 100 кг живої маси за добу.

$$155\ 000\ 000\ \text{кг} \times 60\ \text{мг} / 100\ \text{кг} = 93\ \text{кг}$$

Також потрібно визначити скільки потрібно даного кормової добавки для даної кількості худоби за рік.

$$93 \text{ кг} \times 365 \text{ днів} = 33\,945 \text{ кг}$$

Зважаючи на той факт що кормова добавка містить тільки 1 % вітаміну в своєму складі потрібно визначити загальну кількість ціанокобаламіну який використається впродовж року.

$$33\,945 \text{ кг} \times 1 \% = 339,45 \text{ кг}$$

Необхідно врахувати що на ринку присутні і інші виробники кормових добавок які створюють конкуруючі умови тому для визначення загальної потреби прийmemo 10 % від загальної кількості вітаміну.

$$339,45 \text{ кг} \times 10 \% = 33,945 \text{ кг (річна потреба ціанокобаламіну)}$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.

Розрахувавши річну потребу яка становить 33,945 кг прийmemo кількість робочих трудоднів $T_{рд} = 330$ днів.

Розрахуємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = 24 \times T_{рд} / T_{цф} = 24 \times 330 / 175 = 45,3, \text{ прийmemo } N_{цк} = 46$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (168 год) та час підготовки ферментера до роботи (7 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,3$. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість продукту за цикл, л/цикл:

$$V_{цк} = V_{нт} / N_{цк} = 33,945 \text{ кг} / 46 = 0,738$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл), л:

$$V_{кр} = K_1 \times V_{цк} \times P_{гп} / P_{кр} (1 - E_{св}) = 1,2 \times 0,738 \times 99 / 0,02143 \times 0,8 = 5\,114$$

Визначаємо робочий об'єм ферментера, $V_{ф}$, л:

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 5\,114 / 0,9 = 5\,682,2$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, л:

$$V_{\text{пф}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{ф}} = 5\,682,2 / 0,6 = 9\,470,3$$

Вибираємо найближчий стандартизований за об'ємом ферментер, м³

$$V_{\text{рф}} = 10$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{\text{уф}}$, частка:

$$K_{\text{уф}} = V_{\text{ф}} / V_{\text{рф}} = 5\,682,2 / 10\,000 = 0,568$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.

За виробничий цикл отримуємо $V_{\text{пц}} = 5\,114$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини враховуємо її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\text{ф}}$), які становлять 10%.

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

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{5\,114}{1 - 0,1} = 5\,682,2 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$), що становить:

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{5\,682,2}{0,6} = 9\,470,3 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ф}} = 10 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{ф}}} = \frac{5\,682,2}{10\,000} = 0,568$$

Враховуючи дані які наведені в статті виробничий біосинтез буде відбуватись з внесенням підживлювального розчину, співвідношення підживлювального розчину до поживного середовища становить 4,56% отже загальний об'єм розчину буде становити:

$$5\,682,2 \times 4,56\% = 259 \text{ л}$$

Отже для подальших розрахунків потрібно врахувати об'єм підживлювального розчину який буде вноситись в процесі виробничого біосинтезу, тому потрібно від робочого об'єму відняти кількість підживлювального розчину:

$$5\,682,2 \text{ л} - 259 \text{ л} = 5\,423,2 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi 1}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + E_{\phi 1}} = \frac{5\,423,2}{1 + 0,1} = 4\,930,2 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 5\,423,2 - 4\,930,2 = 493 \text{ л}$$

Для одержання 493 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 2}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{493}{1 - 0,1} = 547,8 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить:

$$V_{\phi 1} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{547,8}{0,6} = 913 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\phi 1} = 0,1 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\phi 1}} = \frac{547,8}{1\,000} = 0,55$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi 2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + E_{\phi 2}} = \frac{547,8}{1 + 0,1} = 498 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 547,8 - 498 = 49,8 \text{ л}$$

Для одержання 49,8 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 3}$), які

становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ф3}}} = \frac{49,8}{1 - 0,1} = 55,3 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$), що становить:

$$V_{\text{ф2}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{55,3}{0,6} = 92,2 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ф2}} = 0,01 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{ф2}}} = \frac{55,3}{100} = 0,55$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\text{ф3}}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + E_{\text{ф3}}} = \frac{55,3}{1 + 0,1} = 50,3 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 55,3 - 50,3 = 5 \text{ л}$$

Для одержання 5 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\text{ф3}}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{1 - E_{\text{ф3}}} = \frac{5}{1 - 0,1} = 5,5 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$), що становить:

$$V_{\text{ф4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{5,5}{0,6} = 9,2 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\text{ф4}} = 10 \text{ л}$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\text{ф4}}} = \frac{5,5}{10} = 0,55$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\text{ф4}}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1 + E_{\text{ф4}}} = \frac{5,5}{1 + 0,1} = 5 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 5,5 - 5 = 0,5 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм4}} = 0,5$ л можна одержати культивуванням *Pseudomonas denitrificans* колбах на качалці. Для цього використовуємо качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становить:

$$N = \frac{V_{\text{пм3}}}{V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}} = \frac{500}{750 * 0,2} = 3,3$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу ціанокобаламіну у ферментері об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 відбудуватиметься у чотири етапи (табл. 3.1.).

Таблиця 3.1

Узагальнені дані розрахунку техніко-економічного обґрунтування

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л
1	10 000	0,54	5 423,2	4 930,2	493
2	1 000	0,55	547,8	498	49,8
3	100	0,55	55,3	50,3	5
4	10	0,55	5,5	5	0,5

5	0,750	0,2	0,2	0,5	0,05
---	-------	-----	-----	-----	------

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування умов і способу культивування

Процес отримання ціанкобаламіну здійснюють методом глибинної ферментації. Ферментацію здійснюють на круговій качалці в колбах Ерленмейєра. На першій стадії накопичується біомаса, культуру зберігають у ліофілізованому стані, а потім пересівають в пробірку з щільним середовищем. Інкують 4 доби і потім переносять на нове поживне середовище того ж складу і в літрову колбу Ерленмейєра і інкують 3 доби на качалці. Далі клітини переносять в ферментер і культивують 170 годин. Виділення, очистку ціанкобаламіну із культуральної рідини здійснювали за допомогою методів ультрафільтрації, екстракції та осадження[27].

Як продуцент використовується культура *Pseudomonas denitrificans*, яку вирощують на поживному середовищі, яке містить: вуглець, азот, магній, натрій. При цьому джерела вуглецю і азоту вносять по мірі їх вичерпування в поживному середовищі. Подальше культивування проводять підтримуючи рН в середовищі 7,2-7,4, на протязом 170 год до досягнення максимальної кількості ціанкобаламіну в середовищі. Культивування в таких умовах дозволяє стабільно отримати високий вихід ціанкобаламіну (214,3 мг/л).

Глибинне культивування мікроорганізмів є найбільш складним і тонким процесом одержання продуктів мікробного синтезу. Біосинтез синтезованих мікроорганізмом речовин залежить від таких факторів, як температура, рН середовища, концентрація розчиненого кисню, тривалість культивування, конструкція й матеріал устаткування, у якому відбувається процес. При глибинному способі культуру вирощують на рідкому середовищі при перемішуванні і примусовій аерації в асептичних умовах [28].

					НУХТ БТЕК 04.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мичкодан М. І.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Стабніков В. П.					28	81
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

Асептичне глибинне культивування має ряд переваг перед поверхневим і передбачає:

- скорочення виробничих площ;
- збільшити обсяги виробництва;
- повністю автоматизувати і механізувати процес;
- виключення важкої ручної праці;
- перехід на безперервний спосіб культивування;
- раціональне використання поживних речовин, що дає можливість значно скоротити відходи виробництва і одержати продукт вищої якості;
- покращити санітарно-гігієнічні умови праці .

Процес культивування проводиться в асептичних умовах при інтенсивній аерації середовища та інтенсивному перемішуванні. Під час культивування необхідно проводити контроль кількості розчиненого кисню та концентрацію CO₂ у вихідному газі; підтримувати умови навколишнього середовища біореактора (температура, рН середовища, швидкість мішалки, витрата повітря)[29].

Отже, обраний глибинний спосіб культивування, при якому раціональніше використовуються поживні речовини середовища. Це дозволяє значно зменшити кількість відходів виробництва і отримати продукт з меншим вмістом домішок та вищою питомою активністю.

4.1.2. Вибір типу ферментера

Культивування *Pseudomonas denitrificans* передбачається здійснювати глибинним способом в ферментерах. Основними вимогами до ферментерів є можливість проведення процесу культивування продуцента в асептичних умовах при інтенсивній аерації середовища. Існуючі промислові ферментери за способом підведення енергії на аерацію та перемішування можна розділити на три групи: апарати з механічним перемішуванням та барботажем (комбінований підвід енергії); з ежекційною системою аерації (підвід енергії до рідкої фази) та барботажні (підвод енергії до газової фази).

Передбачено використання ферментеру з механічним перемішуванням

барботажного типу об'ємом 10 м³. Проведення культивування *Pseudomonas denitrificans* на середовищах із мелясою (джерело вуглецю) передбачає забезпечення інтенсивного перемішування та аерації середовища. В обраному ферментері достатній рівень масообміну досягається встановленням закритих та відкритих турбінних мішалок та повітря, яке подається через барботер. Застосування відкритої турбінної мішалки розташованої над барботером також забезпечує високий рівень диспергування повітря, сприяючи збільшенню поверхні контакту фаз та коефіцієнту масо передачі [30].

На відміну від барботажних та барботажно - ерліфтних ферментерів, запропонований для використання апарат має високі масообмінні характеристики по кисню, в ньому можна легко варіювати режими перемішування та масообміну, суттєво меншими є витрати стерильного повітря, порівняно велика величина робочого об'єму, забезпечується рівномірний розподіл мікроорганізмів та компонентів поживного середовища (забезпечується оптимальний рівень гомогенізації).

Для забезпечення стерильності процесу ферментації в обраному ферментері передбачено використання торцевих ущільнень валу перемішуючого пристрою з паровим захистом. За допомогою застосування такої конструкції вдається практично повністю запобігти потраплянню атмосферного повітря в апарат, що є дуже важливим для збереження асептичних умов культивування.

Ферментер цього типу являє собою вертикальний апарат, циліндричної форми, виготовлений із сталі 12X18H10T чи біметалу з еліптичною кришкою і днищем. Відношення висоти до діаметру становить 2,6:1. На кришці апарату розміщений привід перемішуючого пристрою, штуцери для завантаження поживного середовища, посівного матеріалу, подачі і відведення повітря, оглядові вікна та штуцери для пристроїв візуального контролю [31].

По заповненню ферментеру середовищем і перевірці температури, яка повинна бути не вищою 32°C, у ферментер із посівного апарата спускають по трубопроводу посівну культуру. Кожне місце введення посівної культури в трубопровід і кожний вихід з нього у ферментер захищені паровими пробками.

Після того, як внесли посівну культуру, починається процес вирощування продуценту. Вирощування проводять при постійній аерації. Необхідна для вирощування температура (32°C) підтримується подачею води в сорочку.

Основним призначенням аеруючого обладнання в ферментері є забезпечення умов для максимального розчинення кисню повітря, щоб в середовищі при вирощуванні культури знаходився вільний розчинений кисень. Оптимальна температура культивування 32 °C, рН 7,3-7,4.

Одним із головних параметрів процесу культивування є температура середовища, яка повинна підтримуватись на рівні 32 °C. Вирощування за більш високих температур (більше 36 °C) призводить до зменшення швидкості росту клітин, зменшення активності біосинтезу білкових речовин, і як результат, зниження економічного коефіцієнта засвоювання субстрату. Перебіг процесу за занадто низьких температур (нижче 28 °C) також призводить до зниження швидкості росту, тобто відбувається зниження продуктивності.

Даний ферментер забезпечує специфічні особливості кінетики накопичення біомаси за умови інтенсивного перемішування та достатню аерацію середовища, що веде до високого виходу ціанокобаламіну (214,3 мг/л).

4.1.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Виробниче культивування *P. denitrifican* відбувається за аеробних умов, тому необхідно передбачити стадію підготовки аераційного повітря. Підготовка аераційного повітря буде здійснюватися в окремих будівлях (компресорних відділеннях), оскільки витрати повітря будуть великі.

Стадії підготовки аераційного повітря такі:

- Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці Н ~ 15 м (висота поверху – 5 м, кількість поверхів – 2, висота поверхів – 10 м, разом з косим дахом будівлі (+3 м) – 13, відбір повітря повинен відбуватися на 2-3 метри вище найвищої точки), де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;

- очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- стиснення повітря в компресорах або турбоповітродувках (при цьому повітря нагрівається до температури 120 – 200°C);
- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси» для конденсації вологи;
- видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері, який також зменшує пульсації руху повітря, які можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;
- стабілізація тиску та температури підігріванням до 45–50 °C паром у відповідних теплообмінниках;
- очищення в головних ємнісних набивних фільтрах, установлених поблизу ферментаційних відділень, до ступеня очищення $E=95\%$;
- очищення в індивідуальних фільтрах ($E=99,99\%$), установлених на ферментері, повітря до яких подається безпосередньо від головних фільтрів через трубопроводи (колектори).

Повітря в боксах і лабораторіях, де працюють з посівною культурою, стерилізують за допомогою УФ-ламп.

4.1.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Усі мийчі та дезінфікуючі засоби повинні відповідати загальним вимогам нормативних документів. Нормативні вимоги до мийних засобів визначені постановою Кабінету Міністрів України від 20.08.2008 р. № 117 «Про затвердження Технічного регламенту на засоби для чищення». Цим технічним регламентом визначено вимоги до мийних та поверхнево-активних речовин у його складі. Вимоги цього технічного регламенту не поширюються на: тверде мило, косметику, поверхнево-активні речовини з дезінфікуючими властивостями, мийні засоби з вмістом поверхнево-активної речовини не більше 0,2% [32].

Всі мийчі та дезінфікуючі засоби повинні відповідати таким вимогам:

- ❖ бути стійкими при зберіганні;
- ❖ бути безпечними для довкілля та повністю розпадатися на нешкідливі сполуки;
- ❖ бути нетоксичними або малотоксичними;
- ❖ бактерицидно діяти, щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів у присутності органічних речовин, солей та мікроорганізмів у біоплівках;
- ❖ повністю змиватись при змитті;
- ❖ не виявляти агресивну дію, щодо конструкційних матеріалів, які використовують для виготовлення технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари підприємств;
- ❖ не мати стійкого запаху і бути безбарвними;
- ❖ виявляти високу мийну здатність;
- ❖ добре розчинятися у воді;
- ❖ забезпечувати повне змочування поверхонь із різних конструкційних матеріалів;
- ❖ не знижувати активності протягом тривалого часу;
- ❖ не викликати подразнюючу дію на шкіру рук;
- ❖ мати широкий спектр протимікробної активності [33].

Для ретельного та ефективного очищення та дезінфекції необхідно розуміти типи забруднень або залишків, які необхідно усунути. Вони можуть бути органічними і неорганічними за своєю природою. Слід зазначити, що очищення та дезінфекція – це два різні процеси. Ефективне очищення полягає в тому, щоб повністю видалити забруднення і залишки з поверхні, потім провести візуальне очищення, а потім перейти до наступного етапу – дезінфекції. Якщо його не продезінфікувати, на поверхні не залишиться бруду, але мікроорганізми залишаться.

Робоча схема очищення: видалити залишки бруду, застосувати професійні миючі засоби, нейтралізувати їх водою, продезінфікувати очищену поверхню: дати час для роботи дезінфектанта та змити його [34].

Мийний засіб - будь-яка речовина або препарат, що містять мило та/або інші поверхнево-активні речовини, призначені для прання або очищення та використання в побуті і промисловості, у формі рідини, порошку, пасти, бруска, плитки, таблетки тощо [35].

До них відносять миючі, відбілюючі і водопом'якшуючі засоби [36].

Миючі засоби повинні бути:

- ❖ нешкідливим для здоров'я людини і не надавати токсичну, алергічне і шкірно-резорбтивна дія, а компоненти, що входять до складу миючих засобів не чинити на організм мутагенну, тератогенну, канцерогенну, ембріотоксичну дію;
- ❖ добре розчинятися у воді;
- ❖ володіти високими миючими властивостями;
- ❖ легко і швидко змиватися з посуду, інвентарю тощо;
- ❖ біологічно руйнуватися у воді (більше 80%), тому що вони негативно впливають на процеси природного самоочищення і водні організми.

Миючі засоби не повинні:

- ❖ кумулюватися (накопичуватися) в організмі людини;
- ❖ мати різкий і стійкий запах;
- ❖ впливати на якість продуктів;
- ❖ надавати шкідливої дії на миючіся об'єкти [37].

Вибір мийного засобу залежить від ступеня і роду забруднень, а також від поверхні, на якій засіб будуть використовувати. Для правильного вибору концентрату для очищення потрібно знати, на якій поверхні він буде застосовуватися, із яким типом забруднення потрібно працювати, при цьому не забуваючи уважно читати інструкцію перед використанням [38].

Важливим моментом у процесі очищення є використання адекватної кількості мийного розчину. Використання дуже великої кількості мийного засобу веде за собою більш високі виробничі витрати і можливі проблеми зі стоками, адже хімікати повинні бути належним чином нейтралізовані. У таких випадках використання дозувальних систем є гарним рішенням. Якщо потрібно використовувати пінний розчин, необхідно мати якісний піногенератор.

Деякі мийні засоби можна автоматично дозувати і контролювати їх концентрацію за допомогою обладнання. В іншому випадку якість розчину перевіряється за допомогою тест-смужки. Поверхня є чистою, якщо на ній не залишилося мікроскопічних залишків бруду, а також залишків мийних засобів [34].

Дезінфекція - це комплекс заходів, спрямованих на знищення збудників інфекційних захворювань і руйнування токсинів на об'єктах зовнішнього середовища.

Дезінфекція зменшує кількість мікроорганізмів до прийняттого рівня, але цілком може їх і не знищити. Є одним з видів незараження.

Розрізняють профілактичну, поточну і заключну дезінфекції [39].

Виділяють п'ять основних методів дезінфекції:

- ❖ Хімічний;
- ❖ Фізичний;
- ❖ Механічний;
- ❖ Біологічний;
- ❖ Комбінований.

Кожен з цих методів використовується в практиці як окремо, так і в комбінації з іншими.

Хімічний метод. Це основний метод дезінфекції, який полягає в застосуванні різних хімічних речовин та їхніх сполук для знищення патогенних й умовно патогенних мікроорганізмів на поверхнях, всередині об'єктів і предметів навколишнього середовища, а також в повітрі й різних субстратах.

Основні способи проведення дезінфекції із застосуванням хімічних дезпрепаратів:

- ❖ зрошення об'єктів обробки за допомогою спеціальної дезінфекційної техніки
- ❖ нанесення аерозолю дезінфекційного засобу на об'єкти обробки за допомогою розпилювача
- ❖ занурення в робочий розчин дезінфекційного засобу посуду, медичних виробів, манікюрного інструментарію, предметів догляду за хворими, інвентарю і т. д.

- ❖ протирання різних поверхонь серветкою, змоченою робочим розчином дезінфекційного засобу.

Препарати, які використовуються для дезінфекції повинні відповідати ряду вимог, серед яких: широкий спектр антимікробної активності, безпека для людини та навколишнього середовища, хороша розчинність в воді, ефективність при взаємодії з органічними забрудненнями, нейтральний запах тощо.

Фізичний метод. Дезінфекцію фізичним методом проводять за допомогою впливу на об'єкт знезараження різних фізичних факторів: кип'ятіння, випалювання, використання дії ультрафіолетового опромінення тощо.

Основа фізичного методу – термообробка. Більшість патогенних мікроорганізмів гинуть при температурі 60-70 ° С, проте їх спори здатні витримати й більш високі температури.

Підбір конкретного методу залежить від багатьох факторів, включаючи мету знезараження, тип оброблюваного об'єкта, вид збудника, умови, в яких здійснюється дезінфекція та інших.

Механічний метод. Механічна дезінфекція проводиться з метою зменшення концентрації мікроорганізмів на об'єктах навколишнього середовища. До механічних методів належить вологе прибирання, миття рук, видалення зараженого шару ґрунту, фільтрація води, прибирання приміщень пилососом тощо.

Варто зазначити, що механічна дезінфекція не знищує мікроби, а лише частково видаляє їх з об'єктів знезараження, виконуючи допоміжну функцію. Цей метод застосовується також для санітарної обробки людей, фільтрації повітря, води та інших рідин і т. д.

Усі механічні прийоми застосовуються для:

- ❖ очищення оброблюваних об'єктів від бруду, жиру та білкових частинок;
- ❖ видалення певної кількості мікроорганізмів, що знаходяться на поверхні рук людини, предметах, в повітрі і в воді.

Якість механічної дезінфекції залежить від устаткування, яке використовується для цієї мети. Наприклад, вологе прибирання з використанням ганчірок та щіток дає значно кращі результати, ніж сухе прибирання.

Біологічний і комбінований методи. Біологічний метод дезінфекції полягає у знищенні збудників інфекційних захворювань мікробами-антагоністами.

Антагонізм мікроорганізмів – тип взаємодії мікроорганізмів, при якому один штам повністю знищує або уповільнює ріст іншого.

У сучасній дезінфекції цей спосіб не застосовують через його трудомісткість.

Комбінований метод ґрунтується на поєднанні декількох вище вказаних методів дезінфекції [40].

4.1.4.1. Обґрунтування вибору дезінфікуючих засобів для виробництва ціанкобаламіну

Генеральне прибирання проводять перед початком виробничого процесу, а щоденне – перед кожною робочою зміною (1 - 3 рази на добу), з урахуванням трудоднів – 330 разів.

Виробництво ціанкобаламіну *Pseudomonas denitrificans* SC510 здійснюється протягом 330 днів, що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 10 м³, інокулятори об'ємом 1 м³, 100 л, лабораторний ферментер об'ємом 10 л, реактори та збірники для підготовки компонентів поживного середовища, качалки, бокс та лабораторне устаткування, становить 80 м² (10 м*8 м).

Висота стін – 2,5 м. Загальна площа стін становить (10 м * 2,5 м + 8 м * 2,5 м) * 2 = 90 м². Площа підлоги становить 10 м * 8 м = 80 м². Необхідно визначити площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезінфікувати.

Таблиця 4.1

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва ціанкобаламіну

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період

	об'єкту, м ² (м ³)	період виробництва	виробництва, м ² (м ³)
Обладнання, інвентар, комунікації	28	82	2 296
Підлога	80	330	26 400
Стіни, двері, вікна	90	11	990

Для того, щоб обрати мийний (для обладнань та комунікацій) і дезинфікувальний (для підлоги, стін, вікон, дверей) засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м² затрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезинфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Підготовка виробничих приміщень включає в себе ряд заходів: вологе прибирання, дезінфекцію і ультрафіолетове опромінення підлоговими та настінними світильниками стін, підлог, стель, поверхні обладнання та комунікацій з метою забезпечення чистоти.

Об'єми робочих розчинів для миття приблизно складають 50% від загального об'єму. Тоді один цикл на миття ферментеру, інокуляторів, ректорів-змішувачів і збірника йтиме:

$$28 * 0,5 = 14 \text{ м}^3$$

Тоді за весь час виробництва препарату буде використано наступну розчину для миття та дезінфекції:

$$14 * 82 = 1 148 \text{ м}^3$$

Підлогу необхідно мити та дезинфікувати кожного дня (загалом 330 разів), а стіни, двері, вікна 1 раз на місяць (загалом 11 разів).

Вартість концентратів мийних та дезінфекційних засобів та їх витрати під час виробничого процесу наведені у *табл. 4.2*.

Каустична сода- це хімічно чиста сніжно-біла кристалічна речовина[41].

Властивості каустичної соди:

- ❖ Розчиняється у воді і спиртових настоянках, але не в ацетоні;
- ❖ Утворює вибухонебезпечний газ, який може загорітися в реакції з аміаком;
- ❖ Має максимальну температуру кипіння, плавлення;
- ❖ Негорюче;
- ❖ Швидко прибирає органічні забруднення, нейтралізує жири;
- ❖ Руйнівню впливає на скло;
- ❖ Активно контактує з цинком, алюмінієм;
- ❖ Не реагує на пластик, гуму, чавун, сталь.

Каустик відносять до другого класу небезпеки, через що при його використанні необхідно дотримуватися певних апобіжних заходів.

Концентрація каустичної соди у мийному розчині не повинна перевищувати:

- 0,2 % – при ручному митті обладнання;
- 2,0 % – при механічному митті обладнання.

Працюючи з отруйним лугом, користувачеві треба мати спецодяг, маску, окуляри, гумові рукавички. Її треба використати тільки в добре провітрюваному приміщенні, а зберігати в темному, недоступному місці [42].

Біомой являє собою порошок світлого кольору (від білого до світло-жовтого), який має помірний запах використаної сировини. Розчинність у воді становить не менше 30 г/дм³ при 20°C. Водні розчини біомою безбарвні, прозорі, виявляють мийні, емульгуючі та диспергуючі властивості, легко видаляють білково-жирову плівку з поверхонь технологічного обладнання, легко змиваються, не залишають нальоту.

Біомой виявляє високу мийну активність при температурі не вище 40±5°C. Розчини біомою не пошкоджують об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю, емалі. Не сумісні з катіонними поверхово-активними речовинами.

Біомой належить до класу мало небезпечних речовин (4 клас небезпек згідно з ГОСТ 12.1.007). При потрапленні у шлунок та на шкіру не виявляє кумулятивних,

шкірних подразнюючих і сенсебілізуючих властивостей. У концентраціях рекомендованих до застосування не подразнює слизову оболонку очей [43,44].

Кальцинована сода являє собою білий дрібнокристалічний порошок, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості.

Концентрація кальцинованої соди у мийному розчині не повинна перевищувати:

- 0,5 % – при ручному митті обладнання;
- 2,0 % – при механічному митті обладнання.

Засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). У нативному вигляді та концентрованих розчинах подразнює шкіру і слизову оболонку очей [45].

Вінсепт– це безспиртовий дезінфекційний засіб для обробки рук та вологостійких поверхонь. Прозора рідина без запаху.

Ефективний проти бактерій (у т.ч. мікобактерій туберкульозу), вірусів, грибків. Має пролонговану антимікробну дію, що зберігається не менше 6 годин. Зручний розпилювач-тригер дозволяє проводити швидку дезінфекцію поверхонь.

Склад: полігексаметиленгуанідинугідрохлорид 1% , гліцерин, пантенол, вода.

Режим використання засобу:

- ❖ Гігієнічна дезінфекція рук – відібрати порцію засобу в долоню, втирати засіб у кісті рук 30 сек. до повного висихання засобу.
- ❖ Об'єкти обробки протирають ганчіркою з засобом, зрошують засобом, занурюють у засіб, або заповнюють засобом.

Термін придатності засобу: 3 роки з дати виготовлення[46].

Гембар-датонал – економічний препарат для дезінфекції поверхонь, інвентарю і посуду. Не містить лугу, альдегиду, фенолу, окислювальних і хлорпохідних сполук.

Виробництво - Україна. ТУ У 24.2-21643506.002-01. Свідоцтво про реєстрацію №000821 від 17.05.2011 р. Висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи №05.03.02-4/49244 від 17.05.2011 р.

Активно діюча речовина: гуанідинова полімерна сполука, яка є синтетичним аналогом природних гуанідинових сполук.

Препаративна форма: розчин (25% концентрат).

Мікробіологія: Препарат має пролонговану бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію. Інактивує мікроби, в тому числі туберкульозу, грибки, віруси, у тому числі повно-, адено-, гепатиту Б, герпеса, енцефалітний, грипу, ВІЛ та інше.

Властивості:

- ❖ препарат не токсичний;
- ❖ має широкий спектр дії і високу біологічну активність;
- ❖ надає надійну дію при наявності білка, сироватки, крові;
- ❖ активність препарату мало змінюється під впливом різних умов зовнішнього середовища;
- ❖ не має запаху;
- ❖ не леткий (дозволяє проводити дезінфекцію в присутності людей, а обслуговуючому персоналу при роботі з робочими розчинами не застосовувати традиційних засобів індивідуального захисту очей та слизових оболонок);
- ❖ не агресивний до всіляких матеріалів (не знебарвлює тканини, не викликає корозію, не ушкоджує полімерні, латексні й інші матеріали);
- ❖ добре розчинний у воді;
- ❖ не володіє алергенними, шкірно-дратівливими і шкірно-резорбтивними властивостями;
- ❖ немає інших побічних ефектів.

Немає шкірно-дратівних, шкірно-резорбтивних, кумулятивних, мутагенних і канцерогенних властивостей. "Гембар" не має виборчої органоспецифічності гонадотропної, ембріо-токсичної дії. Не має дратівної дії на слизові оболонки верхніх дихальних шляхів.

Застосовується для поточної, заключної та профілактичної дезінфекцій.

Рекомендується використовувати 5,0% розчини гембару-датанолу для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю та санітарно-технічного обладнання.

Термін придатності препарату: концентрат – 5 років.

Робочі розчини: 6 місяців з дати приготування [47].

БАЦИЛЛОЛ АФ– прозорий безбарвний розчин зі спиртовим запахом. Розчин готовий до застосування. Відносна густина (20°C) – 0,853-0,857 г/см³, показник заломлення – 1,373-1,379, значення рН – близько 6,0. Температура займання 25°C. Засіб добре змішується з водою, добре змочує поверхні, швидко висихає, не утворюючи залишку. Засіб не пошкоджує об'єкти, що виготовлені з металу, скла, гуми, має миючі властивості, добре розчиняє та видаляє білкові, жирові та інші органічні забруднення.

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас %:
діючі речовини: 1-пропанол – 45,0; 2-пропанол – 25,0; етанол – 4,7; допоміжні речовини: 2-бутанон, вода – до 100,0.

Засіб БАЦИЛЛОЛ має:

- ❖ бактерицидні властивості;
- ❖ фунгіцидні властивості;
- ❖ віруліцидні властивості.

Термін та умови зберігання засобу. Термін придатності засобу – 5 років. Засіб належить до легкозаймистих розчинів. Зберігати в упаковці виробника у приміщеннях, що добре провітрюються, захищених від прямих сонячних променів при температурі не вище +25°C, подалі від джерел вогню та тепла [48].

Узагальнена характеристика основних мийних та дезінфікуючих засобів

Назва мийного/дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість обочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода[1]	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	2 296	1 148	40,90	93,9
Біомой[2]	Обладнання, інвентар, комунікації	0,2	2 296	1 148	200	459,2
Кальцинована сода [3]	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	2 296	1 148	17	39,03
Вінсепт[4]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,2	24 390	2439	83,2	2029,2
Гембар-датонал[5]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	24 390	2439	275	4707,2
БАЦИЛЛОЛ АФ[6]	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5	24 390	2439	350	6536,5

Примітка: ціни вказані станом на грудень 2021 р.

1. https://divada.com.ua/p736629423-soda-kausticheskaya-cheshuya.html?gclid=CjwKCAiAksyNBhAPEiwAIDBeLOeXIZHT01SyO2wmFRnTmRgGswsYCBZWssEFfQnXwjqnjSu0vBwydhoCLCoQAvD_BwE

2. <https://prom.ua/ua/p496257934-biomoj-skidka-kazhdomu.html>

3. <https://prom.ua/ua/p1445556067-soda-kaltsinovana-natrij.html?&primelead=Mt43Mw>

4. <https://dez.ck.ua/bezspirt-vinsept-5l/>

5. <https://spilna-meta.com.ua/p257133961-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-gembar.html>

6. <https://prom.ua/ua/p1328426014-batsillol.html>

Проаналізувавши дані таблиць, можна зробити висновок, що для миття обладнання, інвентарю та комунікацій найкраще застосовувати кальциновану соду, адже її ціна є найменшою, а також даний засіб є помірно небезпечним.

Отже вибираємо її для миття.

Для миття та дезинфекції підлоги, стін, дверей та вікон найкраще застосовувати Вінсепт, адже він є найдешевшим засобом, помірно небезпечним. Отже його використання буде доцільним для дезінфекції.

4.1.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Вирощування посівного матеріалу для виробничого біосинтезу вітаміну В₁₂ за допомогою *P. denitrificans* SC510 відбувається на поживному середовищі з наступним складом (г/л):

Цукробурякова меляса–50;

Кукурудзяний екстракт – 10;

KH₂PO₄ – 5;

(NH₄)₂SO₄ – 2,3;

(NH₄)₂HPO₄ – 0,7;

MnSO₄×H₂O – 0,2;

MgSO₄× 7H₂O – 1,5;

ZnSO₄ × 7H₂O – 0,02;

CoCl₂× 6H₂O – 0,02;

5,6-Диметилбензімідазол – 0,0045[31,32]

Виробничий біосинтез відбувається в ферментері об'ємом 10 м³. Інокулянт отримують у чотири етапи: у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 10 л, 100 л та 1 000 л.

4.1.5.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокулянту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Pseudomonas denitrificans* SC510, ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації):

Композиція А: цукробурякова меляса, кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, T = 112 °С).

Композиція Б: MgSO₄×7H₂O, MnSO₄×H₂O, ZnSO₄×7H₂O, CoCl₂×6H₂O, 5,6-диметилбензімідазол (режим стерилізації: P = 0,15 МПа, τ = 60 хв, T = 131 °С).

Композиція В: KH₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄ (режим стерилізації: P = 0,15 МПа, τ = 60 хв, T = 131 °С).

Цукробурякова меляса і кукурудзяний екстракт (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі композицій Б і В стерилізують окремо за стандартної для солей температури.

4.1.5.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Композиція А: цукробурякова меляса, кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: $P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, $T = 112$ °С).

Композиція Б: $MgSO_4 \times 7H_2O$, $MnSO_4 \times H_2O$, $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $CoCl_2 \times 6H_2O$, 5,6-диметилбензімідазол (режим стерилізації: $P = 0,15$ МПа, $\tau = 60$ хв, $T = 131$ °С).

Композиція В: KH_2PO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ (режим стерилізації: $P = 0,15$ МПа, $\tau = 60$ хв, $T = 131$ °С).

Цукробурякова меляса і кукурудзяний екстракт (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі композицій Б і В стерилізують окремо за стандартної для солей температури.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Стерилізація поживного середовища, необхідного для цієї стадії, здійснюється у відповідних посівних апаратах, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: цукробурякова меляса, кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: $P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, $T = 112$ °С).

Композиція Б: KH_2PO_4 , $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \times 7H_2O$, $MnSO_4 \times H_2O$, $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $CoCl_2 \times 6H_2O$, 5,6-диметилбензімідазол (режим стерилізації: $P = 0,15$ МПа, $\tau = 60$ хв, $T = 131$ °С).

Стерилізація композиції Б відбувається в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції А. Солі розчиняють в окремому реакторі, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація япри рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 000 л

Для посівного апарата 1 м³ необхідно 498 л поживного середовища, поділ композицій відбувається як і для 100 л посівного апарата.

Композиція А: цукробурякова меляса, кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: P = 0,05 Мпа, τ = 30 хв, T = 112 °С).

Композиція Б: KH₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄×7H₂O, MnSO₄×H₂O, ZnSO₄×7H₂O, CoCl₂×6H₂O, 5,6-диметилбензімідазол (режим стерилізації: P = 0,15 МПа, τ = 60 хв, T = 131 °С).

Стерилізація композиції Б відбувається в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції А. Солі розчиняють в окремому реакторі, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

4.1.5.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Максимальний синтез вітаміну B₁₂ (214,3 мг/л) досягається за умов росту мікроорганізму *P. denitrificans* SC510 на поживному середовищі з наступним складом (г/л):

Цукробурякова меляса - 130

Сахароза – 20

C₅H₁₁NO₂ – 6

(NH₄)₂SO₄ – 1,3

MgSO₄× 7H₂O – 1,5

ZnSO₄ × 7H₂O – 0,08

CoCl₂× 6H₂O – 0,14

5,6-Диметилбензімідазол – 0,075

Враховуючи, що на стадію виробничого біосинтезу потрібно 4930,2 л поживного середовища, такий його об'єм доцільніше стерилізувати в установці безперервної стерилізації. Обираємо УБС-5 з продуктивністю 5 м³/год (час

стерилізації становитиме 0,99 год). Температура стерилізації – 131°C, тривалість – 6 хв.

Також виробничий біосинтезу відбувається з внесенням підживлювального розчину починаючи з 45 год культивування і до 140 год, з швидкістю 2,72 л/год.

Підживлювальний розчин має наступний склад (г/л):

Глюкоза – 150;

$C_5H_{11}NO_2$ – 39;

$CoCl_2 \times 6H_2O$ – 0,3;

5,6-Диметилбензімідазол – 0,3.

Зважаючи на компоненти підживлювального розчину можна зазначити, що поділ компонентів буде відбуватись наступним чином

Композиції А: Глюкоза та триметилгліцин(режим стерилізації: Р = 0,05 Мпа, τ = 30 хв, Т = 112 °С).

Композиції Б: $CoCl_2 \times 6H_2O$ та 5,6-диметилбензімідазол (режим стерилізації: Р = 0,15 МПа, τ = 60 хв, Т = 131 °С).

4.1.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Проаналізувавши та поділивши компоненти поживного середовища на композиції можна зазначити про необхідність внесення у технологічну схему етапу підготовки титрувальних агентів: 6% розчину NaOH та 6% розчину HCl.

Для приготування поживного середовища необхідно простерилізувати композиції з яких буде складатися ПС. Для унеможливлення випадіння осадів фосфорних солей Магнію, Феруму та Мангану, під час нагрівання розчину солей в апараті, необхідно перед стерилізацією внести 6 %-ий розчин хлоридної кислоти і враховуючи що оптимальним значенням рН для *Pseudomonas denitrificans* є 7,3 необхідно перед внесенням посівного матеріалу підлужнити поживне середовище за допомогою 6 %-го розчину NaOH.

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту та особливості приготування розчинів та стабілізації рН середовища

Об'єм	NaOH(6%)	HCl (6%)
-------	----------	----------

середовища, л	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість Зарієстрування
0,5	-	-	-	-
5	-	-	-	-
50,3	100,6	у колбі на 2 л	100,6	у колбі на 2 л
498	996		996	
4930,2	-	-	-	-

л. 4.3

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу вітаміну В₁₂.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр панельний ФВП-99-48-G4, фільтрувальний матеріал – хімволокно (поліестер), зафіксований на сітці, знаходиться в рамці з товщиною 48 мм; продуктивність – 7600 м ³ /год; E = 90 % [49]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий Comrag F-3710; продуктивність 5,5 м ³ /хв, робочий тиск – 10 бар, габарити: 1400*1000*1500 мм; потужність приводу – 37 кВт [50]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач RDX 65, продуктивність 6,5 м ³ /хв, робочий тиск 14 бар, потужність приводу – 1,1 кВт [51]
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 6000/8, об'єм – 6 м ³ , сталь, робочий тиск – 0,8 МПа [52]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник AVS 160, габарити: 265x290x304 мм; продуктивність 430 м ³ /год, оцинкована сталь, потужність 7,46 кВт [53]
Ф-7	Фільтр головний	1	Фільтр комірковий ФВК-3-592-592-(300/600)-6-(F9); фільтрувальний матеріал – Meltblown, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; продуктивність – 3400 м ³ /год; E = 95 % [54]
ФІ-8 ФІ-13 ФІ-19 ФІ-29	Фільтр індивідуальний	4	Фільтр МКР-305x610x78-Н14, фільтрувальний матеріал – поліестер, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; площа фільтрування – 5,4 м ² , продуктивність – 260 м ³ /год; E = 99,995 % [55]
ІН-9	Інокулятор для вирощування посівного матеріалу	1	Об'єм апарату – 10 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; модель - BLBIO-10SJ; висота – 1600 мм, довжина – 890 мм; ширина - 660; перемішування забезпечується механічною мішалкою; обладнаний датчиками температури, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [56]
Н-10 Н-23	Насос перистальтичний для перекачування розчину від ІН-9 у інокулятор ІН-14	2	Перистальтичний насос Kronos. Максимальний тиск – до 6 бар, продуктивність 25 л/год [57]

НУХТ БТЕК 04.02.04 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Мичкодан М. І.						
Керівник		Стабніков В. П.					50	81
Реценз.								52
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						Кафедра БТМ

P-11 P-18	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації розчину компонентів	2	Реактор сталевий емальований об'ємом 10 л, виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); довжина – 420 мм; висота - 500 мм; ширина – 350 мм; оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв; потужність двигуна 0,75 кВт [58]
P-12	Реактор-змішувач для розчинення розчину солей	1	Реактор з нержавіюча сталь 316L об'ємом 5 л; виробник – Тирит; діаметр 450 мм, висота 1430 мм; оснащений сорочкою та якірною мішалкою [59]
ІН-14	Інокулятор для вирощування посівного матеріалу	1	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; модель - РФ-100; виробник - тм ПРОМВИТ; висота – 1600 мм, довжина – 1300 мм; ширина - 700; витримує тиск до – 0,3 МПа; перемішування забезпечується турбінною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [60]
Д-15 Д-17 Д-21 Д-25	Об'ємно-ваговий дозатор	3	Дозатор ваговий ВДІП. Мінімальна межа дозування – 0,2 кг, максимальна – 30 кг. Розміри: 1200 x 1000 x 1950 мм; дискретність відліку 0.005 г. [61]
P-16	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації розчину компонентів	1	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання якірної мішалки – 50 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 508 мм, висота – 2335 мм; виробник – ТД Красный Октябрь [62]
ІН-20	Інокулятор	1	Об'єм апарату – 1 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виробник - БИОТЕХНО; висота – 3260 мм, діаметр - 1438; витримує тиск до – 0,3 МПа; перемішування забезпечується механічною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [63]
P-22	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації підживлювального розчину	1	Реактор сталевий емальований об'ємом 400 л, виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); довжина – 1380 мм; висота - 2550 мм; ширина – 1380 мм; оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв; потужність двигуна 0,75 кВт [58]
Д-24	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий автоматичний АД-2000-2БЦ. Мінімальна межа дозування – 300 кг, максимальна – 2000 кг. Розміри: 1900*1400*3200 мм; дискретність відліку 1 кг. [64]

Закінчення таблиця 5.1

Р-26	Реактор-змішувач для приготування розчину компонентів	1	Об'єм апарату – 5 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання турбінної мішалки– 200-400 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» [65]
Н-27	Насос відцентровий для перекачування розчину від Р-23 до УБС-25	1	Відцентровий насосНЦ-60/125. Максимальна продуктивність 60м ³ /год [66]
УБС-28	Установка безперервної стерилізації	1	Продуктивність – 5 м ³ /год; тиск пари – 0,5 МПа; ширина – 1500 мм, довжина – 2000 мм; висота – 2500 мм [67]
Ф-30	Ферментер	1	Об'єм апарату – 10 м ³ ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.»; висота – 7297 мм, діаметр - 2750; витримує тиск до – 0,6 МПа; перемішування забезпечується механічною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [65]

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ ЦІАНОКОБАЛАМІНУ

Технологічна схема синтезу ціанокобаламіну штамом *Pseudomonas denitrificans* SC510 включає в себе допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних агентів та підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну та апаратурну схему біосинтезу ціанокобаламіну наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрезабірником (ПЗ-1) у найвищій точці Н = 15 м.

ДР 1.2. Очистка від грубих домішок

Попередню очистку повітря здійснюють на тканинному фільтрі грубого очищення (Ф-2). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю $E = 90\%$, затримуються частинки $\delta > 50$ мкм.

ДР 1.3. Компресіювання повітря

Для забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря стискають укомпресорі (К-3), відбувається нагрівання до 120-200 °С, тиск становить 1,0 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

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

					НУХТ БТЕК 04.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мичкодан М. І.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ ЦІАНОКОБАЛАМІНУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Стабніков В. П.					53	855
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря (від ДР 1.4) нагрівають до температури 45-50 °С у теплообміннику-нагрівачі (Т-6). Вологість повітря має становити 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить на головний фільтр (Ф-7), установлений біля ферментаційних відділень. Ступінь очищення повітря має становити 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ФІ-8, ФІ-13, ФІ-19, ІФ-29) кожного біореактора (до ТП 5.4, ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 6.1). Ступінь кінцевої очистки повітря становить $E = 99,995\%$ та $KУО = 0$.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівних апаратах

Потрібно приготувати 1096,6 мл розчину 6%-ї хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища на стадії приготування ПС в інокуляторах об'ємом 100 л та 1000 л.

Для цього в колбу об'ємом 2 л наливають 996 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 100,6 мл 36%-ї HCl, відміряної мірним циліндром. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівних апаратах

Для приготування 1096,6 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду, який буде використаний на етапах нейтралізації середовища при приготуванні ПС для інокуляту в посівних апаратах об'ємом 100 л та 1000 л, на технічних терезах зважують 65,8 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 2 л і додають 1096,6 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 60 хв.

ДР 3 Приготування та стерилізації підживлювального розчину на виробничий біосинтез

ДР 3.1. Приготування підживлювального розчину

Під час виробничого біосинтезу потрібно вносити підживлювальний розчин. Для одержання 259 л підживлювального розчину, через об'ємно ваговий дозатор (ДЗ-21), у реактор об'ємом 400л (Р-22), подають 38 850 г глюкози та 10 101 г триметилгліцину та через лічильник додають 258 л питної води. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 200 об/хв. Потім приготовлений розчин стерилізують у тому ж реакторі при 112°С упродовж 30 хв.

Також в даному розчині повинні бути наступні елементи $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 5,6-Диметилбензімідазол зважаючи на невелику кількість даних розчинів для зменшення економічних витрат приготуємо і простерилізуємо дані компоненти в колбі, та в подальшому внесемо отриманий стерильний розчин до стерильного розчину глюкози та триметилгліцину.

Отже на технічних вагах зважують 77,7 г $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ та 77,7 г 5,6-Диметилбензімідазол, наважки поміщають в колбу об'ємом 2,5 л та вносять 1 л питної води, компоненти перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С, 60 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу на качалочних колбах необхідно приготувати 500 мл поживного середовища. Вміст компонентів для середовища наведено в таблиці 4.1.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 500 мл поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 500 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Цукробурякова меляса	50	25	А	0,2
Кукурудзяний екстракту	10	5		
Вода		0,2 л		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	0,75	Б	0,2
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,2	0,1		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	0,01		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,02	0,01		
5,6-диметилбензімідазол	0,0045	0,00275		
Вода		0,2 л		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,7	0,35	В	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,3	1,15		
KH ₂ PO ₄	5	2,5		
Вода		0,1 л		
Разом:				0,5

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 25 г цукробурякової меляси, 5 г кукурудзяного екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, і додають 200 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На аналітичних вагах зважують 0,75 г MgSO₄·7H₂O, 0,1 г MnSO₄·H₂O, 0,01 г ZnSO₄·7H₂O, 0,01 г CoCl₂·6H₂O та 0,00275 г 5,6-диметилбензімідазол. Наважки композиції поміщають у колбу об'ємом 500 мл, і додають 200 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,35 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,15 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 2,5 г KH_2PO_4 . Наважку поміщають у колбу об'ємом 200 мл, і додають 100 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л.

Для вирощування інокуляту потрібно 5 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено в таблиці 4.2

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 5л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Цукробурякова меляса	50	250	А	2
Кукурудзяний лікер	10	50		
Вода		2 л		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	7,5	Б	1,5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2	1		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	0,1		
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02	0,1		
5,6-диметилбензімідазол	0,0045	0,0275		
Вода		1,5 л	В	1,5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,7	3,5		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,3	11,5		
KH_2PO_4	5	25		
Вода		1,5 л		
Разом:				5

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 250 г цукробурякової меляси, 50 г кукурудзяного екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, і додають 2 л води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На аналітичних вагах зважують 7,5 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 г $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,1 г $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 г $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ та 0,0275 г 5,6-диметилбензімідазол. Наважки композиції поміщають у колбу об'ємом 2,5 л, і додають 1,5 л водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 3,5 г $(NH_4)_2HPO_4$, 11,5 г $(NH_4)_2SO_4$ та 25 г KH_2PO_4 . Наважку поміщають у колбу об'ємом 2,5 л, і додають 1,5 л водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 50,3 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в таблиці 4.3.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 45,7 л.

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 50,3 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 50,3л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л

Цукробурякове мясо	50	2515	А	7,7
Кукурудзяний лікер	10	503		
Вода		7,7 л		
Конденсат		0,8 л		0,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	75,45	Б	30
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,2	10,06		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	1		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,02	1		
5,6- диметилбензіміда зол	0,0045	0,226		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,7	35,21		
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,3	115,69		
KH ₂ PO ₄	5	251,5		
Вода		38 л		
Конденсат		3,8 л		
Разом:				

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

У реактор-змішувач об'ємом 10 л (Р-11) за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 2 515 г цукробурякової меляси, 503 г кукурудзяного екстракту, та додають 7,7 л питної води, для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв. Стерилізація відбувається в реакторі при температурі 112 °С впродовж 30 хв.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 75,45 г MgSO₄·7H₂O, 10,06 г MnSO₄·H₂O, 1 г ZnSO₄·7H₂O, 1 г CoCl₂·6H₂O та 0,226 г 5,6-диметилбензімідазол, 35,21 г (NH₄)₂HPO₄, 115,69 г (NH₄)₂SO₄ та 251,5 г KH₂PO₄. Наважку поміщають в реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-12) додають 3 л питної води та перемішують для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей, після розчинення компонентів розчин подають в посівний апарат об'ємом

100л (ІН-14), додають 35 л питної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°C (0,15 МПа) упродовж 60 хв.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 498 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в таблиці 4.4.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 452,7 л.

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 498 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 498 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Цукробуряковамеляс а	50	24 900	А	80
Кукурудзяний лікер	10	4 980		
Вода		0,2 л		
Конденсат		25 л		8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	747	Б	372,7
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,2	99,6		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	9,96		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,02	9,96		
5,6-диметилбензімідазол	0,0045	2,241		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,7	348,6		
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,3	1145,4		

КН ₂ РО ₄	5	2490		
Вода		0,1 л		
Конденсат		20,3 л		37,3
Разом:				498

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

У реактор-змішувач об'ємом 100 л (Р-16) за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 24 900 г цукробурякової меляси, 4 980 г кукурудзяного екстракту та додають 80 л питної води, для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв. Стерилізація відбувається в реакторі при температурі 112 °С впродовж 30 хв.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

У реактор-змішувач об'ємом 20 л (Р-18) за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 747 г MgSO₄·7H₂O, 99,6 г MnSO₄·H₂O, 9,96 г ZnSO₄·7H₂O, 9,96 г CoCl₂·6H₂O та 2,241 г 5,6-диметилбензімідазол, 348,6 г (NH₄)₂HPO₄, 1145,4 г (NH₄)₂SO₄ та 2 490 г КН₂РО₄, та додають 17,7 л питної води та перемішують для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей, після розчинення компонентів розчинсамоплином подають в посівний апарат об'ємом 1 м³ (ІН-20), та додають 355 л питної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°C (0,15 МПа) упродовж 60 хв.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³

Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³ (Ф-30), потрібно приготувати 4 930,2 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено у таблиці 4.5.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (20%), оскільки стерилізація ПС проходить в установці безперервної стерилізації. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 4 108,5 л.

ДР 4.5.1. Приготування композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-24) у реактор-змішувач об'ємом 5 м³(Р-26) вносять 640 926 г цукробурякової меляси, 98604 г сахарози, 29 581,2 г триметилгліцину, 6 409,3 г (NH₄)₂SO₄, 7 395,3 г MgSO₄·7H₂O, 394,4 г ZnSO₄·7H₂O, 690,2 г CoCl₂· 6H₂O та 369,8 г 5,6-диметилбензімідазол. За допомогою об'ємно-вагового дозатора додають 4 108,5л води, для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв.

Таблиця 6.5.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4 930,2л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 930,2 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Цукробурякова меляса	130	640926	А	4 108,5
Сахароза	20	98 604		
C ₅ H ₁₁ NO ₂	6	29 581,2		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3	6 409,3		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	7 395,3		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,08	394,4		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,14	690,2		
5,6-диметилбензімідазол	0,075	369,8		
Вода		4 108,5 л		
Конденсат		821,7 л		821,7
Разом:				4 930,2

ДР 4.5.2. Стерилізація композицій А в УБС

Отриману суспензію (від ДР 4.5.1) подають відцентровим насосом (Н-27) в УБС (УБС-28), де відбувається стерилізація гострою парою за температури 131 °С упродовж 5-7 хвилин.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Pseudomonas denitrificans* SC510 зберігають у пробірках на скошеному агаризованому середовищі (МПА – м'ясо пептонний агар). Пересіви здійснюють кожні 3 – 4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 5.2 Отримання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з м'ясо пептонним агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 28 – 30 °С (36 год).

Отримані ізольовані колонії пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при температурі 30 °С (36 год).

ТП 5.3. Вирощування культури в колбах на качалках.

У колбу з стерильною композицією А (від ДР 4.1.1) в асептичних умовах вносять композицією Б (від ДР 4.1.1), композицію В (від ДР 4.1.3). Розчин компонентів перемішують та розливають в 4 качалочні колби.

У пробірку з робочою культурою *Pseudomonas denitrificans* SC510, вирощену на МПА, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержаної з однієї пробірки. Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках проводять за наступних умов: частота обертання 220 об/хв, температура 32 °С упродовж 24 год. Після закінчення процесу культивування здійснюють мікробіологічний контроль.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л.

В інокулятор, в асептичних умовах вносять попередньо простерилізовані композицію А (від ДР 4.2.1) композицію Б (від ДР 4.2.2) композицію В (від ДР 4.2.3) і через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 5.3).

Температура культивування становить 32 °С, рН 7,3, швидкість перемішування – 220 об/хв. Тривалість культивування становить 36 год.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для визначення концентрації біомаси та здійснюють мікробіологічний контроль.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л.

В інокулятор з композицією Б (від ДР 4.3.2) вносять композицію А (від ДР 4.3.1), рівень рН доводять до значення 7,36%-м NaOH (від ДР 2.2). Далі подають посівний матеріал (через трубу перетискування від ТП 5.4).

Температура культивування становить 32 °С, рН 7,3 швидкість перемішування – 220 об/хв. Тривалість культивування становить 36 год.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для визначення концентрації біомаси та здійснюють мікробіологічний контроль.

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1000 л.

В інокулятор з композицією Б (від ДР 4.4.2), подають композицію А (від ДР 4.4.1), рівень рН доводять до значення 7,3 6%-м NaOH (від ДР 2.2). Далі подають посівний матеріал (через трубу перетискування від ТП 5.5).

Температура культивування становить 32 °С, рН 7,3, швидкість перемішування – 220 об/хв. Тривалість культивування становить 36 год.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для визначення концентрації біомаси та здійснюють мікробіологічний контроль.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³

У ферментер об'ємом 10 м³ (Ф-30) подається простерилізоване в УБС (УБС-28) середовище (від ДР 4.5.2). Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал (від ТП 5.6). Температура культивування становить 32 °С, швидкість перемішування – 220 об/хв. Впродовж виробничого біосинтезу починаючи з 45 год культивування починається подача підживлювального розчину (від ДР 3.1) з швидкістю 2,72 л/год, подача підживлювального розчину закінчується на 140 год культивування.

Виробничий біосинтез триває до концентрації ціанокобаламіну 214,3 мг/л впродовж 168 год.

Періодично (кожні 12 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси та цільового продукту.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

7.1.1. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом розсіву культуральної рідини на агаризовані середовища та мікроскопіюванням. Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, із сусло-агаром (СА) – для дріжджів і грибів [68].

Мікроскопіюють зразок з імерсією, використовуючи препарат «роздавлена крапля» та об'єktiv 90x. За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Pseudomonas denitrificans* SC510 (рис. 7.1) – грамнегативні паличкоподібні бактерії, прямі або злегка вигнуті (але не спіральні) палички 0,5-1 x 1,5-5 мкм. Колонії *P. denitrificans* SC510 не флуоресціюють і набувають гладенького, майже біло-коричневого вигляду [20].

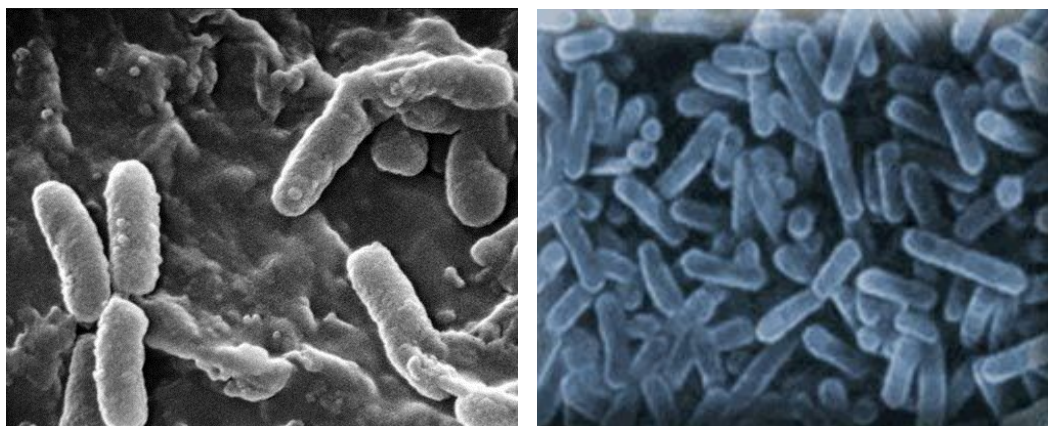


Рис. 7.1. Вигляд *Pseudomonas denitrificans* SC510 під мікроскопом

7.1.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Контроль здійснюється шляхом відбору проби простерилізованого поживного середовища із подальшим її висівом на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, із сусло-агаром (СА) – для дріжджів і грибів. Чашки ставлять у термостат та інкубують за температури 28–30 °С протягом 1–2 діб (МПА) та 24–26 °С протягом 3–5 діб (СА або ГКА) [68].

7.2. Визначення концентрації біомаси

					НУХТ БТЕК 04.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мичкодан М. І.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Стабніков В. П.					66	88
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

Концентрацію біомаси визначають непрямим методом за оптичною густиною клітинної суспензії із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком.

Суть методу полягає в тому, що суміш культуральної рідини та дистильованої води збовтують та після чого наливають у кювету. Потім за допомогою фотоелектроколориметру, вимірюють оптичну густина при довжині хвилі 540 нм. В результаті чого за значенням оптичної густини проводять перерахунок в суху біомасу за допомогою калібрувального графіку.

У пробірки із 9 мл дистильованої води вносимо по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина (при 540 нм), отримані дані перераховують за калібрувальним графіком.

7.3. Визначення концентрації джерел Карбону та Нітрогену

7.3.1. Визначення концентрації джерела Карбону

Джерелом Карбону в поживному середовищі є меляса, тому визначають вміст залишкових редукуючих речовин (глюкоза, фруктоза) колориметричним методом з використанням 3,5-динітросаліцилової кислоти (ДНСК-реагент).

Хід роботи: Концентрацію глюкози і фруктози визначають з надосадової рідини після осадження біомаси. Для цього в центрифужні пробірки відбирають культуральну рідину та центрифугують при 8 000 об/хв протягом 15 хв . До 120 мкл надосадової рідини після осадження біомаси додати 1200 мкл дистильованої води і 600 мкл ДНСК. Витримати проби 10 хвилин при 100 °С, потім 5 хв при 0 °С. Після цього додати в усі проби по 6 мл дистильованої води і виміряти оптичну щільність при 540 нм. В якості контролю використовувати поживне середовище [69].

7.3.2. Визначення концентрації джерела Нітрогену (сульфат амонію)

Одним із джерел Нітрогену в поживному середовищі є амонію сульфат, концентрацію якого визначають методом з реактивом Неслера. Суть даного методу полягає в утворенні колоїду, забарвленого в червоно-бурий колір, при взаємодії аміаку і амонійних солей з лужним розчином меркурій йодиду калію (реактивом Неслера). *Хід роботи.* 100 мкл супернатанту після відділення біомаси змішують з 50 мл дистильованої води, потім додають 1 мл реагенту Неслера, інкубують 10 хв за

температури 25 °С. Утворений забарвлений розчин поглинає випромінювання в широкому діапазоні довжини хвиль і в певних умовах інтенсивність забарвлення пропорційна кількості амонію. Фотометрувати при 400-430 нм (для кількості $\leq 0,2$ мг NH_3) і при 550-580 нм (для ≈ 1 мг). При вимірюванні на спектрофотометрі межа концентрацій може бути розширена до 1,25 мг (при 580 нм) [70].

7.3.3. Визначення концентрації джерела Нітрогену (кукурудзяний екстракт)

Джерелом Нітрогену в поживному середовищі також є кукурудзяний екстракт, тому визначають кількість амінного азоту мідним способом. Суть даного методу полягає в тому, що до супернатанту (отриманого після відділення біомаси та підлужнення 0,1 М розчином натрію гідроксиду) додають надлишок суспензії ортофосфату міді $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні сполуки, які відділяють від нерозчинного ортофосфату міді фільтруванням. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді. Для визначення кількості іміді, яка брала участь в реакції, до розчину додають йодид калію. В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а отже, і Нітрогену амінокислот, який відтитрують розчином тіосульфату натрію, після чого обчислюють кількість амінного азоту в мг/л, врахувавши, що 1 мл 0,01 М розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту.

7.4. Визначення концентрації цільового продукту

Вміст вітаміну B_{12} визначали методом ВЕРХ.

До культуральної рідини (25 мл), додають 2,5 мл 8%-ного NaNO_2 та 2,5 мл крижаної оцтової кислоти, кип'ятять протягом 30 хв. Потім суміш фільтрують через мембранний фільтр 0,45 мкм та до 1 мл водної фази додають 20 мкл 10%-ного NaCN для перетворення коферментних форм вітаміну B_{12} у ціанокобаламін. Отриману верхню фракцію водну відбирали для аналізу.

Дослідження виконували на хроматографі Shimadzu LC-20 Prominence оснащений детектором на діодній матриці. Поділ суміші проводили на обернено-фазовій колонці C18 (Supelco), 250×4,6 мм, 5 мкм. Як рухливу фазу використовували суміш 250 mM фосфорної кислоти (компонент А) та ацетонітрилу

(компонент В). Елюювання проводили лінійним градієнтом від 0 до 70% компонента В. Тривалість аналізу становила 15 хв., швидкість потоку рухомої фази 1,7 мл/хв., температура термостату 30 °С. Детектування здійснювали за довжини хвилі 361 нм. Правильність ідентифікації з'єднання підтверджують збігом часу утримання піка вітаміну в пробі та стандартному розчині ціанокобаламіну (Sigma Aldrich). При аналізі результатів експериментів використовували загальноприйняті методи статистичної обробки даних. [71].

7.5. Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1 Забір атмосферного повітря К _Т	повітрозабірник висота повітрезабірника	–	під час купівлі та встановлення	H = 15 м
ДР 1.2 Очистка від грубих домішок К _Т	повітря після проходження фільтра грубої очистки ступінь очистки	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	E = 90 %
ДР 1.3 Компресіювання повітря К _Т	стиснене повітря після проходження компресора тиск, температура	манометр, термометр	після проходження через компресор	P = 1,0 МПа t° = 120 – 200 °С
ДР 1.4 Охолодження повітря та видалення вологи К _Т	охоложене повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після охолодження	t° = 25–30 °С W = 60–70 %
ДР 1.5 Нагрівання повітря К _Т	нагріте повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після нагрівання	t° = 45–50 °С W = 50 %

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
ДР 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі К _Г	повітря після проходження головного фільтра ступінь очищення	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	E = 95 %
ДР 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі К _Г	повітря після проходження індивідуального фільтра ступінь очищення	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	E = 99,995 %
ДР 2.1 Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівних апаратах К _Г	розчин хлоридної кислоти концентрація	за густиною розчину	після приготування розчину	$\rho(6\% \text{ HCl}) =$ 1,0279 г/мл
ДР 2.2 Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівних апаратах К _Г , К _М	розчин натрію гідроксиду концентрація, тиск, час, стерильність	визначення концентрації за густиною розчину, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація – після приготування розчину, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	$\rho(6\% \text{ NaOH}) =$ 1,0648 г/мл P = 0,15 МПа t = 60 хв стерильність
ДР 3.1.1, 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А К _Г , К _М	композиція А тиск, час, стерильність	манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,05 МПа t = 30 хв стерильність

1	2	3	4	5
<p>ДР 3.1.2, 3.2.2</p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p> <p>K_T, K_M</p>	<p><i>композиція Б</i></p> <p>тиск, час, стерильність</p>	<p>манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>$P = 0,15$ МПа</p> <p>$t = 60$ хв</p> <p>стерильність</p>
<p>ДР 3.1.3, 3.2.3</p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції В</i></p> <p>K_T, K_M</p>	<p><i>композиція В</i></p> <p>тиск, час, стерильність</p>	<p>манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>$P = 0,15$ МПа</p> <p>$t = 60$ хв</p> <p>стерильність</p>
<p>ДР 3.3.1, 3.4.1</p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції А</i></p> <p>K_T, K_M</p>	<p><i>композиція А</i></p> <p>температура розчинення, частота обертання мішалки, час і температура стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>манометр, датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура розчинення та швидкість перемішування підтримуються автоматично, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t° (розчинення) = 40 °С</p> <p>$n = 50$ об/хв</p> <p>$P = 0,05$ МПа</p> <p>$t^\circ = 112$ °С</p> <p>$t = 30$ хв</p> <p>стерильність</p>
<p>ДР 3.3.2, 3.4.2</p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p> <p>K_T, K_M</p>	<p><i>композиція Б</i></p> <p>рН, температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>датчик рН, датчик температури, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>рН – перед стерилізацією, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>рН = 4,5</p> <p>$P = 0,15$ МПа</p> <p>$t^\circ = 131$ °С</p> <p>$t = 60$ хв</p> <p>стерильність</p>
<p>ДР 3.5.1</p> <p><i>Приготування композиції А</i></p> <p>K_T</p>	<p><i>композиція А</i></p> <p>температура розчинення, частота обертання мішалки</p>	<p>датчик температури, тахометр</p>	<p>Температура, частота обертання мішалки підтримуються автоматично</p>	<p>t° (розчинення) = 40 °С</p> <p>$n = 50$ об/хв</p>

1	2	3	4	5
<p>ДР 3.5.2</p> <p>Стерилізація</p> <p>композиції А в УБС</p> <p>К_т, К_м</p>	<p>композиція А</p> <p>температура, час,</p> <p>стерильність</p>	<p>термометр технічний,</p> <p>годинник,</p> <p>мікробіологічний</p> <p>контроль</p>	<p>температура, час –</p> <p>безперервно під</p> <p>час стерилізації,</p> <p>мікробіологічний</p> <p>контроль – після</p> <p>стерилізації</p>	<p>t° = 131 °С</p> <p>t = 5–7 хв</p> <p>стерильність</p>
<p>ТП 4.1</p> <p>Підтримання</p> <p>колекційної</p> <p>культури</p> <p>К_т, К_м</p>	<p>колекційна культура</p> <p><i>Pseudomonasdenitrificans</i></p> <p>температура,</p> <p>мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури,</p> <p>мікробіологічний</p> <p>контроль</p>	<p>Температура –</p> <p>безперервно при</p> <p>зберіганні,</p> <p>мікробіологічний</p> <p>контроль – кожні</p> <p>3-4 місяці</p>	<p>t° = 2-6 °С</p> <p>мікробіологічна</p> <p>чистота</p>
<p>ТП 4.2</p> <p>Одержання робочої</p> <p>культури на</p> <p>агаризованих</p> <p>середовищах</p> <p>К_т, К_м</p>	<p>робоча культура</p> <p><i>Pseudomonasdenitrificans</i></p> <p>температура, час,</p> <p>мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури,</p> <p>годинник,</p> <p>мікробіологічний</p> <p>контроль</p>	<p>Температура</p> <p>визначається під</p> <p>час вирощування</p> <p>в термостаті,</p> <p>мікробіологічний</p> <p>контроль – після</p> <p>вирощування</p>	<p>t° = 30 °С</p> <p>t = 36 год</p> <p>мікробіологічна</p> <p>чистота</p>
<p>ТП 4.3</p> <p>Вирощування</p> <p>культури в колбах</p> <p>на качалках</p> <p>К_т, К_м</p>	<p>посівний матеріал</p> <p>температура, час,</p> <p>швидкість</p> <p>перемішування,</p> <p>мікробіологічна чистота</p>	<p>термометр технічний,</p> <p>годинник, тахометр,</p> <p>мікробіологічний</p> <p>контроль</p>	<p>Температура</p> <p>контролюється під</p> <p>час</p> <p>культивування,</p> <p>мікробіологічний</p> <p>контроль – після</p> <p>культивування</p>	<p>t° = 32 °С</p> <p>t = 24 год</p> <p>n = 220 хв⁻¹</p> <p>мікробіологічна</p> <p>чистота</p>

1	2	3	4	5
<p>ТП 4.4, 4.5, 4.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 л, 100 л та 1 м³ К_т, К_м</p>	<p>посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, витрата аераційного повітря, рН, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, датчик рН, годинник, тахометр, ротаметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, швидкість перемішування та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси та мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування</p>	<p>рН = 7,3 t° = 32 °С t = 36 год v = 1 л/(л*хв) n = 220 хв⁻¹ мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом м³ К_т, К_м</p>	<p>культуральна рідина температура, час, швидкість перемішування, витрата аераційного повітря, рН, концентрація ціанокобаламіну, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, датчик рН, годинник, тахометр, ротаметр, спектрофотометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, швидкість перемішування та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, концентрація ціанокобаламіну, мікробіологічний контроль – кожні 12 год</p>	<p>рН = 7,3 t° = 32 °С t = 168 год v = 1 м³/(м³*хв) n = 220 хв⁻¹ С(ціанокобааміну) = 214,3 мг/л мікробіологічна чистота</p>

Список використаної літератури

1. Methodist Debakey Cardiovasc Supplemental Vitamins and Minerals for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment J. Jul-Sep 2019;15(3):179-184. doi: 10.14797/mdcj-15-3-179.
2. Škrovánková, S. *Seaweed Vitamins as Nutraceuticals. Advances in Food and Nutrition Research*, (2011). 357–369. doi:10.1016/b978-0-12-387669-0.00028-4
3. Вітамін В₁₂ кормовий. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ukrfeed.com.ua/?product=%D0%B2%D1%96%D1%82%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD-%D0%B212-%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9>
4. О.В. Мосин. Микробиологический синтез витамина В₁₂// Журнал "Самиздат". -2006. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://zhurnal.lib.ru/o/oleg_w_m/cdocumentsandsettingsolegmoidokumentymikrobiologicheskij sintez witaminaw121rtf.shtml
5. Green, R., Allen, L. H., Børke-Monsen, A.-L., Brito, A., Guéant, J.-L., Miller, J. W., ... Yajnik, C. Vitamin B12 deficiency. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17040. doi:10.1038/nrdp.2017.40
6. Ціанокобаламін (вітамін В₁₂). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dila.ua/labdir/288.html>
7. Clarke, R. (2008). *B-vitamins and prevention of dementia. Proceedings of the Nutrition Society*, 67(01), 75–81. doi:10.1017/s0029665108006046
8. Фармацевтична енциклопедія. Ціанокобаламін. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/159/cianokobalamin>
9. Губський Ю.І. Г93 Біологічна хімія: Підручник.— Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. –508 с. ISBN 966-7364-41-0
10. Romain, M., Svirij, S., Linton, D. M., Stav, I., & van Heerden, P. V. (2016). *The Role of Vitamin B12 in the Critically Ill—a Review. Anaesthesia and Intensive Care*, 44(4), 447–452. doi:10.1177/0310057x16044400410

НУХТ БТЕК 04.02.04 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.		Мичкодан М. І.			
Керівник		Стабніков В. П.			
Реценз.					
Н. Контр.					
Затверд.		Стабніков В. П.			
Список використаної літератури					
			Літ.	Арк.	Аркушів
			74	816	
Кафедра БТМ					

11. Zhu, X., Xiang, S., Feng, X., Wang, H., Tian, S., Xu, Y., ... Han, J. (2018). Вплив ціанокобаламіну та метилкобаламіну на запальну хворобу кишечника та склад мікробіоти кишечника. *Журнал сільськогосподарської та харчової хімії*. doi: 10.1021 / acs.jafc.8b05730
12. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія : Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 306 с. ISBN 978-966-612-083-3
13. М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко, В.В. Бородай, Ю.В. Коломієць Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.
14. Fang, H., Li, D., Kang, J., Jiang, P., Sun, J., & Zhang, D. (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for *de novo* biosynthesis of vitamin B₁₂. *Nature Communications*, 9(1). doi:10.1038/s41467-018-07412-6
15. Scott, J. M., & Molloy, A. M. (2012). *The Discovery of Vitamin B₁₂*. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(3), 239–245. doi:10.1159/000343114
16. Д. А. Новиков Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Методическое пособие / авт.: Д.А. Новиков – Минск.: БГУ, 2014. – 256 с.
17. Ainala, S. K., Somasundar, A., & Park, S. (2013). Complete Genome Sequence of *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867. *Genome Announcements*, 1(3), e00257–13. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00257-13>
18. Zhou, S., Ashok, S., Ko, Y., Kim, D.-M., & Park, S. (2014). Development of a deletion mutant of *Pseudomonas denitrificans* that does not degrade 3-hydroxypropionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4389–4398. doi:10.1007/s00253-014-5562-5
19. Морфологія і структура клітин прокариот. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://d-learn.pnu.edu.ua/data/users/10128/Тема_1_Морфологія.pdf
20. Environment and Climate Change Canada. “Final Screening Assessment.” Environment and Climate Change Canada - Evaluating Existing Substances - Final Screening Assessment for *Pseudomonas* Sp. ATCC 13867, 27 May 2016, www.ec.gc.ca/ese-ees/default.asp?lang=En&n=85DBF9F0-1#toc5222.

21. Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., & Velázquez, E. (2018). *The current status on the taxonomy of Pseudomonas revisited: An update. Infection, Genetics and Evolution*, 57, 106–116. doi:10.1016/j.meegid.2017.10.026
22. Sharma, A., Sangwan, N., Negi, V., Kohli, P., Khurana, J. P., Rao, D. L. N., & Lal, R. (2015). Pan-genome dynamics of *Pseudomonas* genes complemented across hexachlorocyclohexane dumpsite. *BMC Genomics*, 16(1). doi:10.1186/s12864-015-1488-2
23. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
24. В Україні знизилось поголов'я всіх основних видів в животних [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://latifundist.com/novosti/54799-v-ukraine-snizilos-pogolove-vseh-osnovnyh-vidov-selhoz-zhivotnyh>
25. Сколько весит корова живым весом [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://anvisel34.ru/info/articles/skolko-vesit-korova-zhivym-vesom/>
26. Инструкция по применению кормовой добавки [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://kormovit.ru/wp-content/uploads/2020/05/instrukciya-orffa-vitamin-v12-01-orffa.pdf>
27. Li, K.-T., Liu, D.-H., Chu, J., Wang, Y.-H., Zhuang, Y.-P., & Zhang, S.-L. (2008). *An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin B12 by Pseudomonas denitrificans. Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(6), 605–610. doi:10.1007/s00449-008-0209-5
28. Егоров Н.С. Биотехнология: проблемы и перспективы. - М.: Высшая школа, 1997. - 240 с.
29. Загальна біотехнологія. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://knowledge.allbest.ru/biology/3c0b65625a2bc78a5d43a88521216c27_1.html
30. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування: Навчальний – Львів: «Інтелект-Захід», 2008, – 736 с. 29.

- 31.Калуныяц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Обладнання мікробіологічних виробництв - М.: Агропромиздат, 1987. - 398с.
- 32.Постанова № 117 «Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів» Кабінету Міністрів України від 20 серпня 2008 року. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/717-2008-%D0%BF#Text>.
- 33.Засєкін Д., Пушкова А., Димко Р. Сучасні вимоги до мийно-дезінфікуючих засобів для санітарної обробки доїльного обладнання та молочного інвентаря. Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції пам'яті професора Петра Столярчука «Управління якістю в освіті та промисловості: досвід, проблеми та перспективи». - Л.: НУЛП, 2017, 74 с.
- 34.Очищення і дезинфекція в харчовій промисловості. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.bettaservice.com.ua/novyny-kompanii/item/1172-ochistki-i-dezinfektsiya-v-pishchevoy-promyshlennosti.html>
- 35.КАБІНЕТ МІНІСТРІВ УКРАЇНИ. ПОСТАНОВА.від 20 серпня 2008 р. № 717. Київ. Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/717-2008-п#Text>.
- 36.Види миючих засобів та їх хімічний склад. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://obuchonok.com.ua/node/756>
- 37.Гігієнічні вимоги до мийних засобів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://medbib.in.ua/gigienicheskie-trebovaniya-moyuschim.html>
- 38.Класифікація миючих засобів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://spicetech.com.ua/klasifikaciya-miyuchix-zasobiv/>
- 39.Дезінфекція. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://centrdez.com.ua/ua/blog/8>
- 40.МЕТОДИ ДЕЗІНФЕКЦІЇ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.interdez.com.ua/press/metody-dezinfektsii.html>
- 41.КАУСТИЧНА СОДА. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ukr.sciencedevices.com/chto-takoe-kausticheskaya-soda-a-715472>

42. Сода каустична — сфера застосування, властивості, закупівля. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://publish.com.ua/budivnytstvo/soda-kaustichna-sfera-zastosuvannya-vlastivosti-zakupivlya.html>
43. БИОМОЙ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.farmakos.ua/bimoj.html>
44. Биомой, методические рекомендации (инструкция по применению). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dezmed.com.ua/ru/instruktsiia/item/bimoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/>.
45. Кальцинована сода. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://him-element.com.ua/uk/news/84>
46. Засіб дезінфекційний без спиртовий "Вінсепт". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dez.ck.ua/bezspirt-vinsept-51/>
47. Гембар-датонал. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://datonal.org/?m0prm=3&m1prm=4&showItem=25>
48. БАЦИЛЛОЛ АФ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/batsillol-af-instruktsiya-po-primeneniyu-metodicheskie-ukazaniya/>
49. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/gruboy-ochistki/klass-g4-eu4/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-fyap-vp-klass-ochistki-g2-g5-iz-him-volokna/#tabs-tehnicheskie_harakteristiki
50. Винтовой компрессор Comprag F-3710 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.compressortyt.ru/stanciya/kompr/vintovye/comprag/f-3710/>
- 51.осушувач rdx-65 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://kms-market.com.ua/p504451339-osushitel-rdx.html>
52. Ресивер для компрессора на 6000 литров 8 бар вертикальный [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://drobesfera.ru/product/resiver-dlya-kompressora-na-6000-litrov-8-bar-vertikalnyy>

53. Водяные теплообменники Salda. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.realvent.ru/catalog/ventilyaciya/teploobmenniki/vodyanye-nagrevateli/salda/avs-160-71372/>
54. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/tonkoy-ochistki/klass-f9-eu9/filtr-vozdushnyj-karmannyj-fvk-fyak-tonkoj-ochistki-f5-f9-na-lente/>
55. Фильтр воздушный абсолютной очистки HEPA МКР: класс очистки H11, H13, H14, цена, фото, характеристики [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-absolyutnoj-ochistki/filtr_vozdushnyj_absolyutnoj_ochistki_hepa_mkr_klass_ochistki_h11_h13_h14/
56. Ферментеры из нержавеющей стали с механической мешалкой от 10 до 1000 литров и более [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(laboratornyie-i-promyishlennyye\)/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-\(-kitaj\)/fermenteryi-iz-nerzhaveyushhej-stali-s-mexanicheskoy-meshalkoj-ot-10-do-1000-litrov-i-bolee.html](https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-(laboratornyie-i-promyishlennyye)/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-(-kitaj)/fermenteryi-iz-nerzhaveyushhej-stali-s-mexanicheskoy-meshalkoj-ot-10-do-1000-litrov-i-bolee.html)
57. Перистальтический насос Kronos [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://logrus.ua/ru/peristaltic-pump-kronos/>
58. Аппараты стальные эмалированные с механическим перемешивающим устройством [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_emal_mexanicheskim_perem_ustroystvom_ru.php
59. Лабораторный реактор с гомогенизатором [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://tirit.org/reactor_him/lab_steel_gomo.php
60. Реактор-ферментер РФ-100 для биологических препаратов [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://promvit.com.ua/reactor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-l/>

61. АгроВектор [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://agrovektor.com/ua/physical_product/2960519-dozator-vesovoy-vd1p-ot-02-do-30-kg.html
62. Реактор нержавеющей с мешалкой V=0,063 - 0,25 м³ [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://tdredoctober.com/catalog/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy-v0063-m3-025-m3.html>
63. Промышленный ферментер 1000-2000 л [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/fermentyery/promyshlennyy-fermenter-biotechno-obemom-1000-2000-l/>
64. Дозатор весовой автоматический [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://vesmaster.com.ua/images/dozators/doz3.html>
65. Реакторы химические с перемешивающим устройством. [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_perem_ustroystvom_ru.php
66. ЦЕНТРОБЕЖНЫЙ ВОДЯНОЙ НАСОС НЦ-60/125 [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://globaltehsevis.all.biz/centrobezhnyj-vodyanoj-nasos-nc-60125-g23884323?utm_currency=UAH&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=shopping_ua_personal&utm_content=260745&gclid=Cj0KCQIA7oyNBhDiARIsADtGRZZvfwix0QT_wo8SZqj8fWrJeez3nBCXMUhjHQRx1UdpuWPysOAz29saAp33EALw_wcB
67. Стерилизационные системы непрерывного действия. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://sdlcentrifuge.ru/9-continuous-sterilization-system/192767/>
68. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Электронный ресурс] : конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ – 2019. – 252 с.

69. [Электронный ресурс] // Режим доступа:
<https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-istochnika-ugleroda-na-sintez-biomassy-i-ekzopolisaharidov-bakteriyami-paenibacillus-mucilaginosus/viewer>.
70. Методы определения азотсодержащих веществ. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200115428>
71. М. В. МАРЧЕНОК, А. Б. ПОДВОЛОЦКАЯ, Е. С. ФИЩЕНКО. Изучение возможности использования «диких» штаммов бактерий как возможных продуцентов витамина В₁₂ (кобаламина)* doi: 10.24411/0235-2451-2020-10719 УДК 636.085.16. [Электронный ресурс] // Режим доступа: blob:https://xn--80affa3aj0al.xn--80asehdb/5e7f4a25-185e-4dc8-989c-4f85dc54613b