

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»
Директор факультету
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__» __ червня 2025 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__» __ червня 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природохоронна
на тему: Біосинтез лактобіонової кислоти *Pseudomonas taetrolens*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 3

ЗИМОВЕЦЬ Нікіта Юрійович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти
(ім'я та прізвище) (підпис)
(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Роман КУЧЕРУК
(ім'я та прізвище) (підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

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
« 01 » березня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЗИМОВЦЯ Нікити Юрійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез лактобіонової кислоти *Pseudomonas taetrolens*

керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна, к.б.н., доц.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-к

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи Продукт: лактобіонова кислота. Продуцент:
Pseudomonas taetrolens. Об'єм ферментера: 10 м³. Коефіцієнт заповнення:
0,6.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Характеристика лактобіонової кислоти. Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента. Техніко-економічне обґрунтування.
Біосинтез лактобіонової кислоти. Обґрунтування вибору технологічної
схеми. Специфікація обладнання. Опис технологічної схеми біосинтезу
лактобіонової кислоти. Основні етапи виділення та очищення
лактобіонової кислоти. Контроль виробництва лактобіонової кислоти.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема формату А1 (1 лист). Технологічна схема формату А1 (1
лист).

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика лактобіонової кислоти	01.03.25 – 10.03.25	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.03.25 – 20.03.25	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	21.03.25- 07.04.25	
4.	Біосинтез лактобіонової кислоти	08.04.25- 11.04.25	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	12.04.25 – 15.04.25	
6.	Специфікація обладнання	16.04.35 – 25.04.25	
7.	Опис технологічної схеми біосинтезу лактобіонової кислоти	26.04.25 – 30.04.25	
8.	Основні етапи виділення та очищення лактобіонової кислоти	01.05.25 – 09.05.25	
9.	Контроль виробництва лактобіонової кислоти	10.05.25 - 13.05.25	
10.	Виконання графічної частини та оформлення роботи	14.05.25 - 28.05.25	

Здобувач

_____ (підпис)

Нікіта ЗИМОВЕЦЬ

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Оксана СКРОЦЬКА

_____ (ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of a scheme for the biosynthesis of lactobionic acid using a promising and highly productive strain *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683, which has the highest concentration of the target product (178 g/l) and optimal economic synthesis indicators, which makes it the best producer among those considered.

The use of lactobionic acid in anti-aging facial peeling is proposed. The annual need for lactobionic acid in the peeling to ensure the share of the female population in Ukraine is calculated. To obtain 101105 kg of lactobionic acid, the fermenter volume should be 10 m³ with a filling factor of 0.6.

The technological scheme for obtaining lactobionic acid when growing the biological agent *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683 provides for auxiliary stages (preparation of aeration air, preparation and sterilization of nutrient media) and the technological process - growing the inoculum and production biosynthesis of the target acid in a 10 m³ fermenter.

Detergents and disinfectants were also selected, their quantities and economic feasibility were calculated. The scheme for isolating and purifying lactobionic acid includes centrifugation, treatment with activated carbon, microfiltration, evaporation, precipitation, crystallization and freeze-drying.

The qualification work consists of an introduction, nine sections, a list of used literary sources (90 sources), technological and equipment schemes - A1 format. The total work volume is 114 pages, 18 tables and 10 figures are presented.

Keywords: lactobionic acid, skin aging, peeling, *Pseudomonas taetrolens*, lactose, biosynthesis, fermenter, HPLC, lyophilization.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню схеми біосинтезу лактобіонової кислоти з використанням перспективного та високопродуктивного штаму *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683, який має найбільший показник концентрації цільового продукту (178 г/л) та оптимальні економічні показники синтезу, що робить його найкращим продуцентом серед розглянутих.

Запропоновано використання лактобіонової кислоти в складі антивікового пілінгу для обличчя. Розраховано річну потребу в лактобіоновій кислоті в складі пілінгу для забезпечення частки населення жінок в Україні. Для отримання 101 105 кг лактобіонової кислоти об'єм ферментера має становити 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Технологічна схема одержання лактобіонової кислоти при вирощуванні біологічного агента *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683 передбачає допоміжні стадії (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес – вирощування посівного матеріалу та виробничий біосинтез цільової кислоти у ферментері 10 м³.

Також підібрано миючі та дезінфікуючі засоби, розраховано їхні кількості та економічну доцільність. Схема виділення та очищення лактобіонової кислоти включає центрифугування, обробку активованим вугіллям, мікрофільтрацію, випарювання, осадження, кристалізацію та ліофільне висушування.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, дев'яти розділів, списку використаних джерел (90 джерел), технологічної та апаратурної схем - формати А1. Загальний обсяг роботи – 114 сторінок, представлено 18 таблиць і 10 рисунків.

Ключові слова: лактобіонова кислота, старіння шкіри, пілінг, *Pseudomonas taetrolens*, лактоза, біосинтез, ферментер, ВЕРХ, ліофілізація.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТОБІОНОВОЇ КИСЛОТИ	11
1.1. Фізико-хімічні властивості	11
1.2. Сфери застосування	13
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	17
2.1. Обґрунтування вибору продуцента лактобіонової кислоти.....	17
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища	21
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Pseudomonas taetrolens</i>	23
2.4. Таксономічний статус <i>Pseudomonas taetrolens</i>	26
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	28
3.1. Потреба у лактобіонової кислоті.....	28
3.2. Розрахунок потужності виробництва лактобіонової кислоти	32
3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера.....	34
3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 10 м ³	35
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЛАКТОБІОНОВОЇ КИСЛОТИ	39
4.1. Катаболізм ростового субстрату у <i>Pseudomonas taetrolens</i>	39
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у лактобіонову кислоту	41
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	45
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	45
5.2. Обґрунтування етапу підготовки аераційного повітря	47
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	49
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних засобів	49
5.3.2. Обґрунтування вибору дезінфікуючих засобів.....	52
5.3.3. Розрахунки витрат мийних та дезінфікуючих засобів	61
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для синтезу лактобіонової кислоти.....	69
5.4.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці	69
5.4.2. Підготовка і стерилізація поживного середовища інокуляту в посівних апаратах об'ємом 10, 100 та 1000 л	71

5.4.3. Підготовка і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м ³	74
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	77
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЛАКТОБІОНОВОЇ КИСЛОТИ	81
РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛАКТОБІОНОВОЇ КИСЛОТИ	89
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЛАКТОБІОНОВОЇ КИСЛОТИ	93
9.1. Мікробіологічний контроль	93
9.2. Визначення концентрації лактобіонової кислоти	95
9.3. Визначення концентрації джерела вуглецю	97
9.4. Визначення концентрації джерела азоту	97
9.5. Визначення концентрації біомаси	99
ЛІТЕРАТУРА	101
ДОДАТКИ	113

ВСТУП

Біотехнологія - це широке поле, що охоплює використання живих систем та організмів для вирішення проблем і створення корисних продуктів. Ось деякі ключові області біотехнології:

Генна-інженерія: Модифікація генетичного матеріалу організмів для створення нових ознак або виробництва корисних речовин. Це може включати створення трансгенних рослин, генно-модифікованих організмів, розробку нових ліків і терапій.

Промислова біотехнологія: Використання мікроорганізмів або клітин для виробництва хімічних речовин, палива, біополімерів, фарбників, антибіотиків та інших продуктів.

Фармацевтична біотехнологія: Виробництво ліків, вакцин, серологічних продуктів із застосуванням біологічних систем та рекомбінантних білків.

Сільське господарство та харчова біотехнологія: Розробка сортів рослин, що мають високий урожай або стійкість до шкідників, а також виробництво функціональних продуктів і добавок, таких як пробіотики.

Екологічна біотехнологія: Застосування біологічних систем для очищення води, видалення токсинів, біоремедіації забруднених місць або знищення відходів.

Медична біотехнологія: Розробка діагностичних методів, терапій, тканинної інженерії, штучних органів та біоматеріалів.

Синтетична біотехнологія: Використання біологічних систем для створення нових живих систем або реорганізації існуючих для досягнення специфічних цілей.

					НУХТ БТЕК 04.03.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Зимовець Н.Ю.					8	3
Перевір.		Скороцька О.І.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Ці області змішуються і взаємодіють, відкриваючи нові можливості для наукового дослідження, інновацій та вирішення важливих проблем сучасного світу.

- Сполучені Штати Америки (США)

Велика кількість великих біотехнологічних компаній базується там, також тут активно ведуться дослідження в області генної технології та фармацевтики.

- Європейські країни (зокрема Німеччина, Велика Британія, Франція, Швейцарія):

Вони відомі своїми дослідницькими лабораторіями та науковими інститутами, що активно працюють у сфері біотехнології та медичних досліджень.

- Японія:

Висока концентрація передових технологій, особливо у сфері біотехнології та фармацевтики.

- Канада:

Має сильний науковий потенціал у сфері біотехнології та медичних досліджень.

- Ізраїль :

За розміром країни має вражаючу кількість стартапів та дослідницьких лабораторій, що займаються біотехнологічними проектами.

Україна активно розвиває своє біотехнологічне напрямки, але точне місце країни в світовому рейтингу біотехнологій складно оцінити через багатофакторність. Україна має значні наукові потенціали у біотехнологічних дослідженнях, та її розвиток в цій галузі часто обмежується фінансуванням, наявністю передового обладнання та доступом до сучасних технологій.

Наприклад, українські науковці працюють над проектами у сфері генної інженерії, створенням біотехнологічних продуктів, розробкою нових медичних препаратів та дослідженням біологічних систем.

Однак, багато інших країн, таких як США, країни Європи, Японія чи Канада, мають більше інвестицій, розвиненіше наукове співтовариство та лабораторії, які можуть забезпечити більший обсяг досліджень та розробок у сфері біотехнологій. Україна має потенціал стати більш впливовою в цій сфері, але це може зайняти час та вимагатиме більшого фокусу на науковій та технологічній інновації.

Варто відзначити українські підприємства в сфері біофармацевтичних розробок, які мають певні досягнення та перспективи у виробництві біофармацевтичних препаратів ЗАТ "Біофарма" (м. Київ), ПАТ "Фармак" (м. Київ), корпорацію "Артеріум" (м. Київ), ЗАТ Фармацевтична фірма "ДАРНИЦЯ", ПАТ НВЦ "Борщагівський хімікофармацевтичний завод" (м. Київ), ЗАТ "Біолік" (м. Харків), ПАТ "Лекхім" (м. Харків), ТОВ "Біостимулятор" (м. Одеса) та ін

Актуальність

Бактерія *Pseudomonas taetrolens* вивчається у зв'язку з її унікальними властивостями, а також можливим використанням у біотехнології і медицині. Вона відома своєю здатністю до окислення ароматичних речовин, метаболізму вуглеводів і жирів. Оскільки *Pseudomonas taetrolens* виявляє певний рівень толерантності до забруднень та здатність до біодеградації деяких забруднювачів, цей вид бактерій може використовуватись у біоремедіації, очищенні відходів та мікробіологічному контролі в навколишньому середовищі.

Більш того, деякі види *Pseudomonas* застосовуються у медицині для біосинтезу певних корисних сполук та ферментів, а також вивчаються для їхньої можливої ролі у створенні антимікробних речовин чи нових медичних препаратів.

В кінцевому підсумку, актуальність *Pseudomonas taetrolens* полягає у його потенційному застосуванні у сфері біотехнології.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТОБІОНОВОЇ КИСЛОТИ

Лактобіонова кислота - це дисахарид, утворений з глюконової кислоти та галактози, що отримується шляхом окислення лактози. Ця органічна кислота є сполукою з високою доданою вартістю. Він широко застосовується в медицині, фармацевтичній, харчовій, хімічній та косметичній промисловості завдяки своїм чудовим властивостям, таким як антиоксидантна активність, біосумісність, нетоксичність, хелатоутворення, здатність до біологічного розкладання та амфіфільність [1].

Унікальні властивості лактобіонової кислоти разом з її широким діапазоном використання обумовлюють стратегічну роль даної сполуки у виробництві нових промислово важливих продуктів. Таке зростаюче комерційне значення призвело до того, що біотехнологічне виробництво лактобіонової кислоти є вигідною довготривалою альтернативою дороговартісному та вкрай енергоємному хімічному способу її виробництва [1].

1.1. Фізико-хімічні властивості

Молекулярна формула лактобіонової кислоти - $C_{12}H_{22}O_{12}$.
Молекулярна маса – 358,30 г/моль [2].

Синонімічні назви лактобіонової кислоти: 4-О-бета-D-галактопіранозил-D-глюконова кислота; 4-(бета-D-галактозидо)-D-глюконова кислота.

IUPAC назва: (2R,3R,4R,5R)-2,3,5,6-tetrahydroxy-4-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyhexanoic acid.

					НУХТ БТЕК 04.03.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика лактобіонової кислоти	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Зимовець Н.Ю.					11	6
Перевір.		Скроцька О.І.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

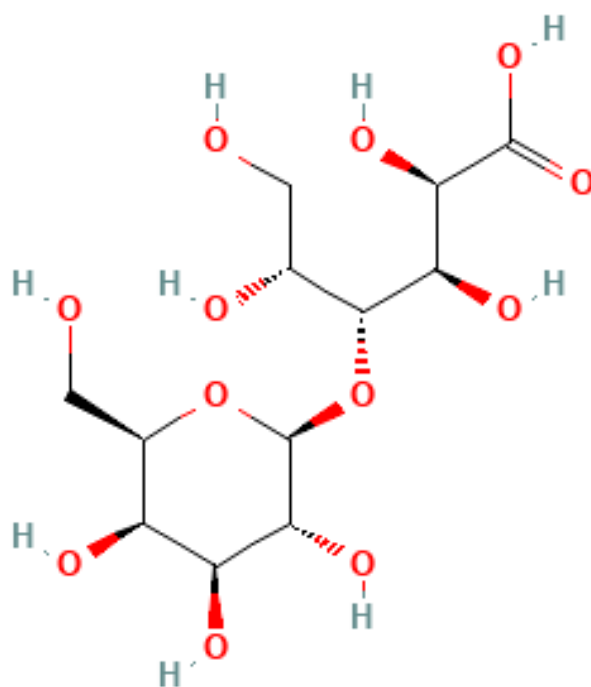


Рис.1.1. Структурна формула лактобіонової кислоти [2].

Лактобіонова кислота є цукровою кислотою. Подібно іншим кислотам, лактобіонова кислота може утворювати солі з мінеральними катіонами, такими як кальцій, калій, натрій і цинк [3].

Лактобіонову кислоту описано як природну поліолову кислоту з формульною вагою 358,30 Дальтон та рКа 3,8. Вона розчиняється у воді у вигляді вільної кислоти або солі. Молекула має багатофункціональні групи і, таким чином, діє як хелатор іонів металу та може секвеструвати кальцій. Лактобіонова кислота пригнічує утворення гідроксильних радикалів завдяки своїй залізохелатній здатності та функціонує як антиоксидант у тканинах. Ця кислота має солодкий смак, незважаючи на слабку кислотність. Лактобіонову кислоту можна дегідратувати до лактону. Лактобіонова кислота гігроскопічна і з атмосферною вологою утворює гель, що містить близько 14% води. Концентровані розчини утворюють гелі та плівки. Її чудова водоутримувальна здатність обумовлює цінність використання даної кислоти в косметичці. Основні напрямки застосування лактобіонової кислоти пов'язані з її важливими хелатуючими та емульгуювальними властивостями [4].

1.2. Сфери застосування

1) Системи доставки ліків

Поточна зростаюча поширеність захворювань печінки стала рушійною силою для розробки нових терапевтичних методів лікування, заснованих на системах доставки ліків для клінічної хіміотерапії раку печінки. Так, системи доставки ліків на основі лактобіонової кислоти можуть успішно націлюватися на гепатоцити завдяки наявності на їх поверхні азіалоглікопротеїнових рецепторів (ASGPR), оскільки лактобіонова кислота працює як ліганд цих рецепторів. Ці рецептори є переважними мішенями для потенційних втручань у печінку, оскільки терапевтичний ефект будь-якого препарату часто обмежений труднощами доступу до певних ділянок. Цей рецептор додатково забезпечує зв'язування активного центру з мембраною для взаємодії між клітинами. Таким чином, зроблений значний акцент на поверхневій модифікації полісахаридів галактозилізованими групами з лактобіонової кислоти, націлених на ASGPR, досягаючи посиленого зв'язування з клітинною поверхнею гепатоцитів. Така біофункціоналізація з лактобіоновою кислотою може додатково забезпечити успішну опосередковану рецептором трансфекцію клітин у цільових специфічних тканинах, таких як епітеліальні клітини [5].

2) Наночасткова діагностика

Останні досягнення в синтезі та модифікації поверхні наночастинок з використанням лактобіонової кислоти проявляють перспективність в отриманні нових діагностичних інструментів для біомедицини. Зокрема, такі біофункціональні наночастинки демонструють ключові переваги, порівняно з традиційними терапевтичними інструментами – покращена здатність до біологічного розкладання, біосумісність, чутливість виявлення, розчинність у воді, триваліша стабільність і нижча цитотоксичність.

Наночастинки з лактобіоновою кислотою використовуються для біодетектування, лікування раку, магнітно-резонансної томографії, біологічного маркування тощо.

Покриття поверхні наночастинок лактобіонової кислоти сприяє підвищенню фізико-хімічної стабільності, а також збільшенню ступеня поглинання гепатоцитів. Показано, що лактобіонова кислота, кон'югована з флуоресцентними наночастинками, проявляє ефективність в якості зонда для виявлення та ідентифікації клітин раку печінки в таких складних клітинних матрицях як кров [5].

3) Тканинна інженерія

Хоча лактобіонова кислота не сприяє безпосередньому росту будь-якої тканини чи біоматеріалу, ця органічна кислота може сприяти прикріпленню та захопленню гепатоцитів, а також конструюванню біосумісних каркасів для тканинної інженерії печінки. Результатом реалізації цих підходів є розробка безлічі нових галактозилізованих полімерів, які стали багатообіцяючими біоматеріалами в галузі інженерії печінкової тканини. Зокрема, включення функціональних груп, таких як фрагменти галактози, в полімерний скелет дозволяє покращити його функціональні властивості, демонструючи більш високі рівні підтримки специфічної функції печінки з точки зору секреції альбуміну або синтезу сечовини. Взаємодія між ASGPR і галактозними лігандами, що являють собою каркаси на основі лактобіонової кислоти, має фундаментальне значення для посилення адгезії гепатоцитів, їх агрегації, довгострокової підтримки специфічних функцій печінки та механічної стабільності [5].

4) Косметична галузь

Як універсальна речовина в косметиці, лактобіонова кислота використовується як засіб проти старіння та кератинізації в космецевтичних рецептах, таким чином сприяючи біосинтезу глікозаміногліканів або колагену для покращення товщини та пружності шкіри. Бар'єрний гомеостаз та функціональність рогового шару явно

покращуються при місцевому застосуванні лактобіонової кислоти. Дана кислота фактично є інгібітором розпаду ферментів матриксної металопротеїнази внаслідок хелатування металів, зменшуючи появу фотостаріння та зморшок. На додаток до антиоксидантної ролі лактобіонової кислоти, ця речовина також демонструє потужні зволожуючі та ексфоліативні властивості, що розширює її комерційну значимість у косметичній сфері [5].

5) Харчова промисловість

Не менш важливо, що нещодавно були розроблені нові напої та сири, що містять лактобіонат кальцію. Зокрема, введення лактобіонової кислоти в харчові продукти може стимулювати всмоктування йонів кальцію та інших мінеральних речовин у кишечнику, що має сприятливий вплив на здоров'я. Досліджено, що засвоєння кальцію у щурів, до дієти яких було введено лактобіонову кислоту, було вище у порівнянні з показниками для контрольної групи тварин, які не споживали лактобіонову кислоту [5].

Додавання лактобіонової кислоти індукує коагуляцію сиру при виробництві без використання заквасок та/або сичужного ферменту, тим самим зменшуючи потребу в цих дорогих додаткових інгредієнтах. В 2011 році Уолтер і Беглі також повідомили про новий підсилювач смаку на основі лактобіонової кислоти для харчових продуктів і напоїв. Розроблено антиоксидантну композицію, що містить лактобіонову кислоту і сидерофори як ключові елементи для уповільнення окислення ліпідів у харчових продуктах.

Крім цього, було повідомлено про роль лактобіонової кислоти як вологоутримуючого агента в м'ясних продуктах, що піддаються процесам розморожування та/або варіння, що призводить до підвищення ефективності обробки м'ясних продуктів. Лактобіонова кислота проявляє потенційний пребіотичний ефект як біологічно активний інгредієнт у функціональних харчових продуктах, оскільки ця органічна кислота стійка до травних ферментів, погано всмоктується в тонкому кишечнику і може

бути ферментована мікрофлорою шлунково-кишкового тракту. Використання як лактобіонату кальцію (E-399) вже схвалено Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів (FDA) у США [5].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору продуцента лактобіонової кислоти

Лактобіонова кислота володіє антиоксидантними, протимікробними, хелатуючими, стабілізуючими, підкислювальними та зволожуючими властивостями, що дозволяє її використовувати в харчовій, медичній, фармацевтичній, косметичній та хімічній промисловості. Синтезувати дану кислоту спроможні представники виду *Pseudomonas taetrolens*, розглянемо більш детально декілька продуцентів [6, 7]. Порівняльна характеристика продуцентів лактобіонової кислоти наведена в табл.2.1.

При вирощуванні *Pseudomonas taetrolens* LMG 2336 на кислій молочній сироватці, яка є відходом молочного виробництва, синтезує 40 г/л лактобіонової кислоти за 72 год культивування [8].

При вирощуванні даного ж штаму (*P. taetrolens* LMG 2336) на солодкій сироватці з внесенням підживлювального розчину лактози, концентрація синтезованої лактобіонової кислоти збільшується майже в 2,5 рази, та становить 100 г/л за 48 год культивування [9].

Pseudomonas taetrolens ATCC 4683 характеризується таким же часом культивування як і *P. taetrolens* LMG 2336 вирощуваний на сироватці з лактозою (48 год), але демонструє значно кращі показники кінцевої концентрації лактобіонової кислоти 178 г/л [10], що в 1,78 та 4,45 рази більше в порівнянні з *Pseudomonas taetrolens* LMG 2336, при рості на сироватці та сироватці з лактозою, відповідно.

					НУХТ БТЕК 04.03.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Зимовець Н.Ю.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скороцька О.І.					17	11
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 2.2

Характеристика продуцентів лактобіонової кислоти

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація лактобіонової кислоти, г/л	Умови культивування	Література
<i>Pseudomonas taetrolens</i> ATCC 4683	Лактоза – 200; Яловичий екстракт – 1; Дріжджовий екстракт – 2; Пептон – 5; NaCl – 5; CaCO ₃ – 30.	178	25 °C, 48 год, pH 6,0, 200 об/хв Рівень розчиненого кисню – 30 %	Kim J.-H., Jang Y.-A., Seong S.-B., Jang S. A. High-level production and high-yield recovery of lactobionic acid by the control of pH and temperature in fermentation of <i>Pseudomonas taetrolens</i> . <i>Bioprocess and Biosystems Engineering</i> . 2020. doi:10.1007/s00449-020-02290-z
<i>Pseudomonas taetrolens</i> LMG 2336	Кисла молочна сироватка – 100% (вміст лактози в сироватці 4,2%)	40	30 °C, 72 год pH 6,5, 350 об/хв Внесення 10 % інокуляту на початку культивування а також через 12 та 24 год культивування	Sarenkova I., Sáez-Orviz S., Ciprovica I. Lactobionic acid production by <i>Pseudomonas taetrolens</i> in a fed-batch bioreactor using acid whey as substrate. <i>International Journal of Dairy Technology</i> . 2022, 75(2): 361-371. doi: 10.1111/1471-0307.12841
<i>Pseudomonas taetrolens</i> LMG 2336	Сироватка – 100% Підживлювальний розчин лактози – 200 г/л	100	30 °C, 48 год pH 6,5, 350 об/хв Інокулят – 30%, Внесення підживлювального розчину лактози – 0,1 л з 10 до 16 годин (протягом 6 годин)	Alonso S., Rendueles M., Díaz M. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by <i>Pseudomonas taetrolens</i> . <i>Bioresource Technology</i> . 2015, 196, 314–323. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.092

Таблиця 2.2

**Розрахунок вартості поживних середовищ для біосинтезу
лактобінової кислоти**

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело*
<i>Pseudomonas taetrolens</i> ATCC 4683	Лактоза – 200	71,4	14,2	1
	Яловичий екстракт – 1	25	0,02	2
	Дріжджовий екстракт – 2	1800	3,6	3
	Пептон – 5	1059	5,3	4
	NaCl – 5	13,3	0,06	5
	CaCO ₃ – 30	7,2	0,21	6
Вартість 1 л середовища – 23,39 грн				
<i>Pseudomonas taetrolens</i> LMG 2336	Кисла молочна сироватка – 100% (лактози 42 г/л)	80	3,36	7
	Вартість 1 л середовища – 3,36 грн			
<i>Pseudomonas taetrolens</i> LMG 2336	Сироватка	12,9	12,9	8
	Лактоза – 200	80	16	7
	Вартість 1 л середовища – 28,9 грн			

Примітка * - ціни представлено станом на лютий 2024 року:

- 1 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-laktoza>
- 2 - <https://flagma.ua/rubec-zheludok-govyazhiy-o7117881.html>
- 3 - <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- 4 - <https://flagma.ua/pepton-fermentativniy-o13622945.html>
- 5 - https://rodon-agro.com.ua/ua/p2034842219-sol-tehnicheskaya-meshkah.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=EAIaIQobChMInJ69sMWthAMV8gcGAB3DXg6ZEAQYCCABEGlCAfD_BwE
- 6 - https://www.systopt.com.ua/item-krejdakormova?gad_source=1&gclid=EAIaIQobChMizPTC8MWthAMVGbVoCR1rlg2sEAQYDyABEGIoLPD_BwE
- 7 - https://ukrhim.com.ua/ua/p616828798-laktoza.html?gad_source=1&gclid=EAIaIQobChMIm5PVrcathAMV2S0GAB35BwxXEAQYBCABEGKsN_D_BwE
- 8 - <https://greenferma.com.ua/sirovatka-kislomolochna-ama-1kg>

Згідно розрахунків, поданих в таблиці 2.2, для штаму *P. taetrolens* LMG 2336, тривалість вирощування якого складає 48 год, середовище

культивування має найбільшу вартість – майже 29 грн, у той час як за культивування цього ж біологічного агента протягом 72 годин на сироватці з 4,2 % лактози затрати на поживне середовище складають всього 3,36 грн за 1 л і є найменшими серед порівняних.

Однак спираючись на дану інформацію остаточний вибір найкращого продуцента лактобіонової кислоти здійснювати недоцільно, тому далі обрахуємо економічні показники та показники синтезу кожного з біологічних агентів. Результати наведено у таблиці 2.3.

Таблиця 2.3.

Показники економічності та синтезу лактобіонової кислоти

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація лактобіонової кислоти, г/л	Умовна вартість 1 г кислоти, грн/г	Тривалість вирощування, год	Кількість кислоти за годину, г/год
<i>Pseudomonas taetrolens</i> ATCC 4683	23,39	178	0,13	48	3,7
<i>Pseudomonas taetrolens</i> LMG 2336	3,36	40	0,08	72	0,5
<i>Pseudomonas taetrolens</i> LMG 2336	28,9	100	0,28	48	2,08

Таким чином, дані таблиці 2.3 засвідчують, що штами ATCC 4683 та LMG 2336 (48 год) характеризуються високими показниками утворення кислоти за годину. Однак при цьому 1 г лактобіонової кислоти, синтезований *P. taetrolens* LMG 2336 протягом 48 годин, має найвищу умовну ціну, яка становить 0,28 грн, що удвічі вище, порівняно з аналогічним фактором вибору для продуцента *P. taetrolens* ATCC 4683.

Тому розглянувши дані наведені в таблицях 2.1-2.3 можна зробити висновок, що серед представлених продуцентів лактобіонової кислоти для виробничого синтезу найкращим біологічним агентом буде *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683, через найбільший показник концентрації цільового продукту (178 г/л) та оптимальні економічні показники синтезу.

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування 48 год, концентрація лактобіонової кислоти в культуральній рідині складає 178 г/л [10], приймаємо концентрацію три 1,8 г/л [4].

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу лактобіонової кислоти

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 100 г лактобіонової кислоти. Молекулярна маса лактобіонової кислоти ($C_{12}H_{22}O_{12}$) становить 358,3. Отже, у 358,3 г кислоти міститься $12 \times 12 = 144$ г Карбону, а в 358,3 г кислоти $(144 \times 100) / 358,3 = 40,2$ г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах лактози міститься 40,2 г Карбону, враховуючи, що вміст Карбону у лактозі становить 42 %. Отже, у 100 г лактози міститься 42 г Карбону, а 40,2 г Карбону міститься у $(40,2 \times 100) / 42 = 95,7$ г лактози.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах? Яким є і лактоза, близько 40 % субстрату окиснюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, тоді вміст глюкози у середовищі становитиме $(95,7 \times 0,4) + 95,7 = 133,98$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси

У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 1,8 г біомаси становить $1,8 \times 0,5 = 0,9$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(0,9 \times 100) / 42 = 2,14$ г лактози.

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 1,8 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(2,14 \times 0,4) + 2,14 = 2,9$ г/л лактози.

Отже, загальний вміст лактози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси та лактобіонової кислоти у вищевказаних кількостях, становить $133,98 + 2,9 = 136,88$ г/л.

Однак така кількість субстрату не може бути внесена у середовище одразу, початкова концентрація лактози становитиме 40 г/л, а решта субстрату (160 г/л) вноситиметься у ході культивування порціями.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

У даному поживному середовищі азот представлений органічними сполуками – яловичим та дріжджовим екстрактами і пептоном.

В яловичому екстракті міститься близько 18% білка, до складу білка входить 15-17 % Нітрогену – для зручності розрахунків приймемо усереднене значення 16%.

У дріжджовому екстракті частка азоту становить близько 10%. Для пептона кількість азоту варіюється близько 10-14%, для розрахунків приймаємо частку 12%.

В 1 г яловичого екстракту міститься $(18 \times 1) / 100 = 0,18$ г білка.

А оскільки в складі білка знаходиться 16% Нітрогену, то його кількість буде: $(0,18 \times 16) / 100 = 0,03$ г.

В 2 г дріжджового екстракту міститься $(10 \times 2) / 100 = 0,2$ г Нітрогену.

В 5 г пептону міститься $(12 \times 5) / 100 = 0,6$ г Нітрогену.

Таким чином, сумарний вміст Нітрогену у джерелах органічного азоту становить: $0,03 + 0,2 + 0,6 = 0,83$ г.

Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 1,8 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 0,18 г.

Лактобіонова кислота не містить Нітроген, тому розрахованої кількості азоту, що вноситься у середовище з вищезазначеними органічними сполуками, буде достатньо для росту продуцента.

Розрахунок складу м'ясно-сольового підживлювального розчину

У вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести у процесі культивування продуцента лактобіонової кислоти 160 г/л

лактози. Приймаємо, що підживлення буде проходити в режимі подачі кожних 8 год.

Тоді кількість порцій підживлення становить $(48-8) / 8 = 5$. Отже, з кожною порцією підживлення у середовище має додаватись $160/5 = 32$ г/л лактози.

Розрахунок інших компонентів середовища

Джерелами таких необхідних для росту продуцента лактобіонової кислоти елементів, як Магній, Кальцій, Фосфор і Ферум є яловичий та дріжджовий екстракти і пептон.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

Pseudomonas taetrolens

Мікроорганізми роду *Pseudomonas* — це широко розповсюджені бактерії, які зустрічаються в ґрунті, на рослинах, у прісноводних і морських середовищах існування. Багато штамів можуть рости при низьких температурах (психрофільні штами), у процесі свого росту можуть забруднювати їжу або фармацевтичні засоби, що зберігаються в холодильнику. Так, бактерія *Pseudomonas taetrolens* спричиняє псування яєць [11].

Морфологія

Грамнегативні, неспорогенні, короткі палички із заокругленими кінцями, зустрічаються поодинокі, парами та короткими ланцюжками. Виявляють рухливість, мають від одного до п'яти полярних джгутиків [12].

Культуральні особливості

Колонії круглі, злегка підняті, гладкі, цільні, внутрішньої структури аморфної форми. Щільне поживне середовище: рясний ріст, коричневий колір, середньо затемнені. Рідке поживне середовище: спостерігається каламутність; наявна тонка масляниста плівка та осад. У середовищах, в яких росте цей організм, з'являється сильний затхлий запах. *Pseudomonas taetrolens* - аероб. Оптимальна температура росту від 23 до 25 °С. Наявний слабкий ріст при 33 і 10 °С. Відсутність росту при 4 або 41 °С.

Середовище: соєвий триптиказник агар $\pm$ 5% овечої крові, середовище Кінга A & B [12].

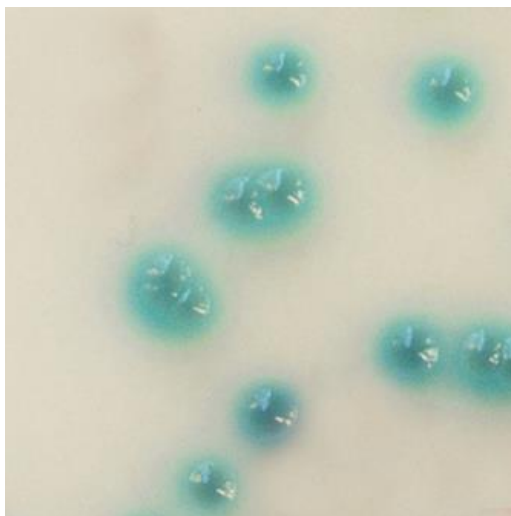


Рис. 2.1. Колонії *Pseudomonas* [11].

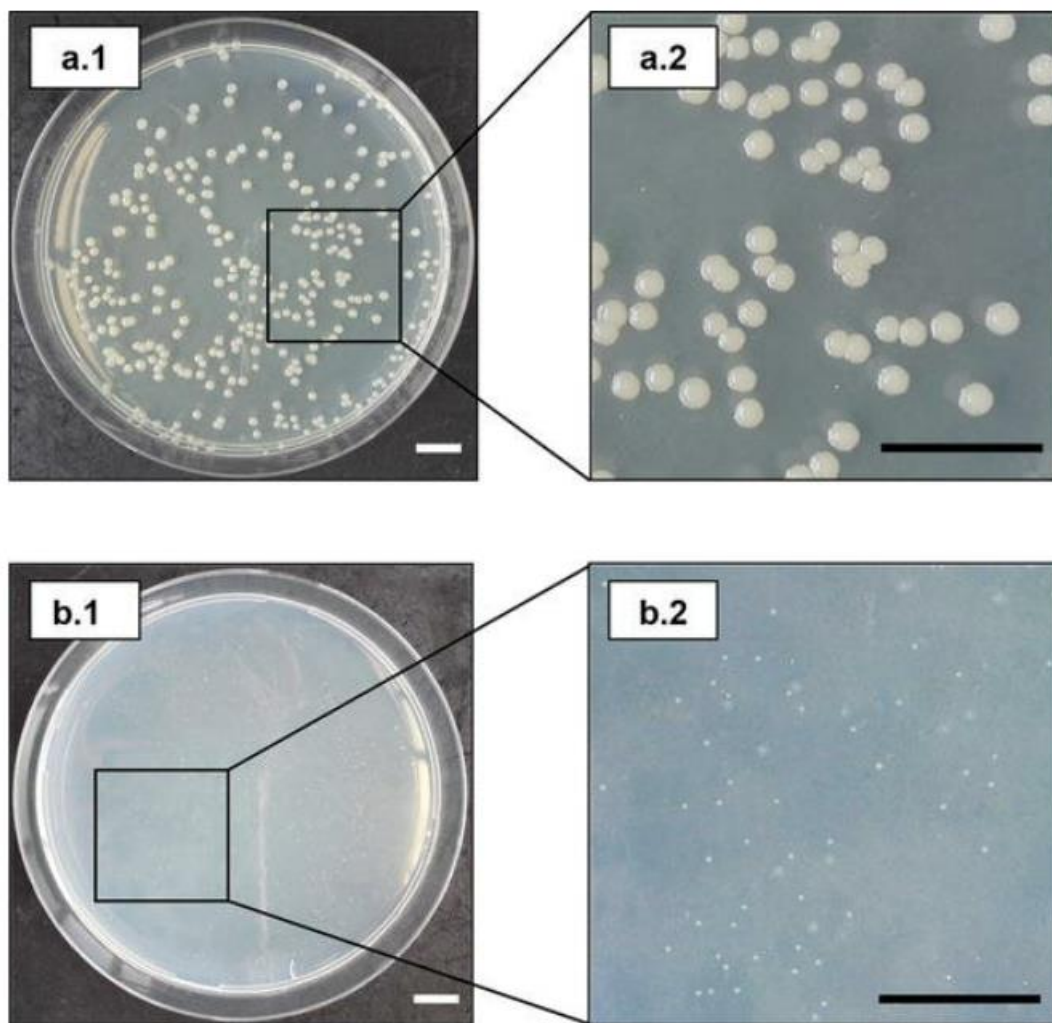


Рис. 2.2. Колонії *P. taetrolens* на агаризованому середовищі NB;

a.1, a.2 – чиста культура, b.1, b.2 – культура *P. taetrolens*, змішана з *Lactobacillus casei* [13].

Існують тісні спорідненості між видами *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas taetrolens*, *P. aureofaciens* і *P. chlororaphis*, між *P. fluorescens*, *P. putida* і *P. ovalis*, а також між видами *Aeromonas* [14].

Центральна група роду через *P. taetrolens* пов'язана з *P. synxantha*, яка є сполучною ланкою до роду *Aeromonas*. Ця основна лінія характеризується перш за все зміною від повністю окисного псевдомонадного до повністю ферментативного аеромонадного шляху утилізації глюкози.

Зв'язок між *P. aeruginosa* та *P. taetrolens* полягає в наявності аргініндигідролази, оксидази та в нездатності виробляти кислоту з інозиту, фруктози та мальтози в пептонному середовищі; зв'язок з *P. synxantha* прослідковується у виробленні кислоти з гліцерину, манози та маніту в пептонному середовищі в присутності орнітиндекарбоксилази та в незначному утворенні ацетоїну.

Глюкоза утилізується окислювально, газ з вуглеводів не утворюється. *Pseudomonas* добре ростуть у пептонних середовищах, більшість видів ростуть у визначених середовищах, у яких глюкоза або галактоза є єдиним джерелом вуглецю, а фосфат амонію єдиним джерелом азоту.

Pseudomonas можуть утворювати пігменти зеленого, синьо-зеленого, жовтого, оранжевого, світло- або темно-коричневого або флуоресцентного жовто-зеленого кольору; пігменти в основному розчинні в середовищі.

Цитрат, як правило, використовується як єдине джерело вуглецю. Може утворюватися аргініндигідролаза, орнітиндекарбоксилаза не утворюється. Ліполітичний. Індол не утворюється, крохмаль не гідролізується, ацетоїн не утворюється, целюлоза і пектин не атакуються. Тест на фенілаланін негативний.

Не чутливий до пеніциліну. Похідне птеридину 0/129 не діє бактеріостатично. З пептону утворюється аміак. Вирощують на середовищах з 10 і 40 % жовчі та на середовищі з 3 і 5 % NaCl. Утворюється оксидаза і каталаза. Зростання відбувається при оптимальній температурі 18-30°. Спостерігається ріст при початковому рН 5,5–8,5 [15].

Біохімічні ознаки

Спостерігали позитивні результати для каталази, виробництва сірководню, реакції Фогеса-Проскауера, виробництва кислоти з глюкози, лактози, галактози, манози, фруктози, рамнози, ксилози, гліцерину та маніту. Молоко зменшилось і згорнулося через 2 тижні з кислотним кільцем на поверхні. Може використовуватися як єдине джерело вуглецю: молочна кислота, сечова кислота та лимонна кислота [12].

Негативні результати зафіксували щодо гідролізу желатину, виробництва індолу, відновлення нітратів до нітритів, гідролізу крохмалю, виробництва кислоти з: ескуліну, амідгалакту, арабітолу, декстрину, дульцитолу, глікогену, інуліну, мальтози, мелізитози, пектину, рафінози, саліцину, сорбіту, крохмалю, сахарози, ксилану, арабінози, еритритолу і трегалози. Не може використовувати як єдине джерело вуглецю: оцтову кислоту, щавлеву кислоту, сульфанілову кислоту, винну кислоту, саліцилову кислоту та мурашину кислоту [12].

2.4. Таксономічний статус *Pseudomonas taetrolens*

Філогенетичну класифікацію для *Pseudomonas taetrolens* представлено згідно бази даних назв прокаріотів, які мають номенклатурне положення (LPSN) [15]:

Царство	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Pseudomonadota</i>
Клас	<i>Gammaproteobacteria</i>
Порядок	<i>Pseudomonadales</i>
Родина	<i>Pseudomonadaceae</i>

Рід *Pseudomonas*

Вид *Pseudomonas taetrolens*

Pseudomonas taetrolens — це аеробна, мезофільна, рухлива бактерія, виділена із зіпсованого яйця [15].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у лактобіоновій кислоті

Старіння шкіри – це складний біологічний процес, на який впливає комбінація ендогенних або внутрішніх (генетика, клітинний метаболізм, гормональні та метаболічні процеси) та екзогенних або зовнішніх (хронічний вплив світла, іонізуюче випромінювання, хімічні речовини, токсини) факторів. Ці фактори разом призводять до кумулятивних структурних і фізіологічних змін та прогресуючих змін у кожному шарі шкіри, а також до змін у зовнішньому вигляді шкіри, особливо на ділянках, що піддаються впливу сонця. На відміну від тонкої та атрофічної з дрібними зморшками та сухої шкіри, шкіра передчасного фотостаріння зазвичай демонструє потовщений епідерміс, плямистість, глибокі зморшки, в'ялість, тьмяність і шорсткість [16].

Поступова втрата еластичності шкіри призводить до явища в'ялості. Уповільнення швидкості епідермального оновлення та подовження клітинного циклу збігається з уповільненням загоєння ран і менш ефективною десквамацією шкіри. Цей факт відіграє вирішальну роль при призначенні проходження курсу естетичних процедур [16, 17].

Старіння спричинене руйнуванням вільними радикалами білків, ліпідів, дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК), рибонуклеїнової кислоти (РНК), органел та інших життєво важливих структур. За нормальних умов пошкодження вільними радикалами відновлюються антиоксидантами, але, на жаль, з віком їх кількість зменшується, збільшуючи ймовірність постійного пошкодження [18].

					НУХТ БТЕК 04.03.16 КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата									
Розроб.		Зимовець Н.Ю.			РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування				Літ.	Арк.	Аркушів		
Перевір.		Скороцька О.І.									28	11	
Реценз.									Кафедра БТМ				
Н. Контр.													
Затверд.		Стабніков В.П.											

Окислювальний стрес виникає, коли відбувається втрата балансу між пошкодженням, спричиненим вільними радикалами або активними хімічними речовинами, і клітинним антиоксидантним самовідновленням [18].

Старіння шкіри впливає на її життєво важливі функції, такі як гомеодинамічна регуляція температури тіла, баланс рідини, втрата електролітів і білків, виробництво вітаміну D, імунний контроль, сенсорне сприйняття та захист інших органів від шкідливих факторів навколишнього середовища. Однак у складі косметичних засобів, що представляють групу продукції мас-маркету, налічуються шкідливі хімічні речовини, внаслідок проведених наукових досліджень також було встановлено токсичні властивості деяких компонентів таких anti-age косметичних засобів. Нещодавні дослідження показали потенціал і доцільність використання ресурсів природного походження для їх включення в косметичні антивікові засоби [19].

Разом з тим, попит на стратегії омолодження шкіри швидко зріс останнім часом – очікується, що світові щорічні витрати зростуть з 24,6 мільярдів доларів США до приблизно 44,5 мільярдів доларів США до 2030 року [20].

Дані клінічних досліджень на людях підтверджують, що до складу продуктів, що запобігають старінню, дозволено включати деякі сполуки. Розглянемо основні з них [21].

- Керамід: має захисну дію на шкіру від зовнішнього тиску, що може запобігти сухості шкіри та відігравати роль у регуляції функціонування шкірного бар'єру.
- Ретинол: покращує мікрооточення дермального позаклітинного матриксу (ECM), стимулює клітини шкіри виробляти ECM (наприклад, колаген типу I, фібронектин і еластин), може сприяти утворенню дермальних кровоносних судин і може стимулювати TGF- β /CTGF, який є основним регуляторним

фактором для підтримки стану позаклітинного матриксу. Ретинол у концентрації 3% є ефективним препаратом для лікування старіння шкіри.

- Гіалуронова кислота: найбільш очевидною клінічною ознакою фотостаріння є поява зморшок, це проявляється накопиченням аномального еластину в дермі та серйозною втратою колагенових волокон. Цілісність волокон еластину і колагену в дермі підтримується їх взаємодією з гіалуроновою кислотою і структурою протеогліканової мережі; отже, деградація гіалуронової кислоти може бути процесом, що передуює розкладу компонентів фібрил. Гіалуронова кислота збільшує вміст вологи в шкірі, зменшує глибину зморшок і підвищує еластичність та міцність шкіри.
- Астаксантин: має антиоксидантну та протизапальну дію, що сприятливо впливає на зменшення проявів фотостаріння шкіри. Астаксантин пов'язаний із різноманітними протизапальними механізмами, включаючи PI3k/Akt, Nrf2, NF-κB, Erk1/2, JNK, p38 MAPK і jak-2/stat-3. Дослідження вказують на те, що астаксантин сприяє зменшенню втрати вологи шкірою, покращенню текстури шкіри та запобігає процесам деградації шкіри, викликаним ультрафіолетовим світлом.
- Природний бакучіол: має сильну антиоксидантну активність, яка може значно знизити рівні простагландину E2 (PGE2) і фактора інгібування міграції макрофагів (MIF). Проявляє антивіковий вплив на шкіру, зокрема у пацієнтів з чутливою шкірою.
- Полі-L-молочна кислота (PLLA): не тільки підтримує збільшення транскрипційного фактора HIF-1α, але також сприяє синтезу колагену. Дослідження підтвердили

підвищення еластичності шкіри та вмісту вологи, а також значне зменшення пігментації, еритеми та розміру пор.

- 10-гідроксистеаринова кислота (10-HSA): є найефективнішим агоністом ядерного рецептора сімейства активаторів проліферації пероксисом PPAR α , підвищує рівень колагену типу I у первинних фібробластах людини. Показано, що 10-HSA може зменшити експресію старіючого білка p53, пригнічувати експресію гена матриксної металопротеїнази 1-го типу (MMP-1), зменшити пігментацію сенільних бляшок і покращити текстуру пор. Це свідчить про антивіковий ефект 10-HSA на шкіру.
- Гліколева кислота (GA): зменшити клітинне запалення та старіння, викликане УФ-світлом, регулювати експресію матриксних металопротеїназ і колагену, а також знижувати рівень експресії матриксної металопротеїнази MMP-9, індукованої ультрафіолетом. Гліколева кислота впливає на зморшки та запобігає старінню шляхом покращення стану шкіри [6].

Фактично використання хімічних пілінгів у косметичній галузі та дерматології продовжує зростати завдяки їх універсальності, передбачуваності, спрямованій на клінічну кінцеву точку, і сприятливому профілю ризику порівняно з лазерною терапією. Хімічний пілінг є загалом безпечним методом лікування деяких шкірних захворювань, а також для оновлення й омолодження шкіри [22].

Останнім часом все більше уваги привертають альфа-гідрокси- та полігідроксикислоти (АНА та РНА) завдяки їхнім чудовим зволожуючим і антиоксидантним властивостям. Ці сполуки дуже корисні з точки зору як косметичного, так і дерматологічного лікування. Завдяки своїй структурі альфа-АНА та РНА здатні зв'язувати велику кількість води та діяти як

потужні антиоксиданти через інгібування матриксних металопротеїназ та сильні хелатні властивості [23].

До класу альфа-гідроксикислот належить і лактобіонова кислота. Нещодавні дослідження засвідчують, що лактобіонова кислота у концентрації 10% в складі емульсії знижує рН поверхні шкіри без подразнення та порушення шкірного бар'єру [24].

Інші дослідження також підтверджують, що лактобіонова кислота у чистому вигляді та у складі емульсії на основі алкілполіглюкозиду демонструвала хорошу антиоксидантну активність, що обумовлює використання цієї кислоти як багатофункціонального космецевтичного засобу з м'яким ефектом для лікування й профілактики фотостаріння шкіри [25].

Лактобіонова кислота здебільшого застосовується у складі пілінгів. Останні наукові праці досліджували вплив на шкіру пілінгів з введенням лактобіонової кислоти у концентраціях 10 та 30%. Результати засвідчили значний ступінь зволоження шкіри за використання пілінгу з різними концентраціями лактобіонової кислоти [26].

Таким чином, запобігання та уповільнення старіння шкіри у сучасному світі є актуальним питанням, наукові дані підтверджують, що хімічні пілінги є чудовим альтернативним рішенням, у порівнянні з лазерною терапією. Зокрема, лактобіонова кислота проявляє значні перспективи у розрізі лікування й запобігання старіння шкіри, має потужні антиоксидантні й зволожуючі властивості.

3.2. Розрахунок потужності виробництва лактобіонової кислоти

Згідно даних Інституту демографії та проблем якості життя, в Україні станом на 2024 рік орієнтовно проживало трохи більше 34 мільйонів людей. Фахівці зауважують, що точна цифра населення України невідома, враховуючи повномасштабне вторгнення росії на території України [27].

На 1 січня 2022 року за розрахунками Державної служби статистики України вікова структура населення України становила [28]:

- діти віком до 14 років — 14,93 %;
- дорослі віком 15—64 роки — 67,43 %;
- особи похилого віку (65 років і старіші) — 17,64 %.

Лактобіонова кислота відноситься до хімічних пілінгів нового покоління. Лактобіоновий пілінг підходить для пацієнтів різних вікових груп, має високу біосумісність із шкірою людини. Завдяки мінімальному подразнюючому ефекту, із успіхом використовується для дуже чутливої шкіри [29].

Тому оберемо для забезпечення пілінгом жінок вікової групи 15-64 роки:

$$\frac{34\,000\,000 \times 67,43}{100} = 22\,926\,200 \text{ людей}$$

Приймаємо, що частка жінок складає 58,8% [30]:

$$\frac{22\,926\,200 \times 58,8}{100} = 13\,480\,605 \text{ жінок}$$

Оскільки цільовою групою є жінки зі зрілою шкірою, яка потребує омолодження, прийmemo, що лактобіоновим пілінгом будуть користуватись 30% від розрахованої чисельності жінок:

$$\frac{13\,480\,605 \times 30}{100} = 4\,044\,181 \text{ жінок}$$

Для розрахунків прийmemo, що витрата пілінгу на одне застосування складає 5 грамів. Виходячи з цього, для проведення однієї процедури пілінгу для цільової групи жінок потрібно лактобіонового пілінгу:

$$0,005 \times 4\,044\,181 = 20\,221 \text{ кг}$$

Загальний курс складає 7-10 процедур один раз на тиждень [31]. Приймемо, що курс застосування лактобіонового пілінгу становитиме 10 процедур на рік:

$$20\,221 \times 10 = 202\,210 \text{ кг}$$

Лактобіоновий пілінг 50% від ТМ Сосос містить 50% лактобіонової кислоти. Будемо орієнтуватись на цю концентрацію кислоти у складі пілінгу власного виробництва. Враховуючи це, в складі 202 210 кг міститиметься така кількість лактобіонової кислоти:

$$202\,210 \times 0,5 = 101\,105 \text{ кг}$$

Таким чином, розраховано річну потребу в лактобіоновій кислоті в складі пілінгу для забезпечення частки населення жінок в Україні.

При культивуванні *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683 отримували 178 г/л лактобіонової кислоти після 48 годин вирощування [10].

Розрахуємо, в якому обсязі культуральної рідини міститиметься 101 105 кг лактобіонової кислоти:

$$178 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3$$

$$101\,105 \text{ кг} - X$$

$$X = 568,005 \text{ м}^3 = 568\,005 \text{ л}$$

Врахуємо 20 % втрат лактобіонової кислоти на етапах її очистки:

$$V_{\text{кр}} = 568\,005 \times 1,2 = 681\,606 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Розрахуємо об'єм культуральної рідини за цикл культивування для подальшого розрахунку стадій приготування інокуляту [18]. Приймаємо кількість трудоднів – 320.

Тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 681\,606 / 320 = 2\,129 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 2\,129 \times 54) / 24 \approx 5\,600 \text{ л/цикл},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (6 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год,

охладження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год.

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{крц}}/K_{\text{зап}} = 5,6/0,6 = 9,3=10 \text{ м}^3,$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 5,6/10 = 0,56\text{-- не перевищує заданого значення [32].}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 10 м³

За один виробничий цикл виробляють 5,6 м³ культуральної рідини, згідно розрахунків, поданих в п.1.3. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{ϕ}), які становлять від 10 - 15%.

З урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} \times (1+E_{\phi}) = 5,6 \times 1,1 = 6,1 \text{ м}^3,$$

де E_{ϕ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 6,1 м³. За вибраного коефіцієнта заповнення 0,6 геометричний об'єм ферментера становить: $V_{\phi} = 6,1/0,6 = 10,1 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст1}} = 10 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{31} = 6,1/10 = 0,61$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65), отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

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

Для засіву $V_{\text{роб.1}} = 6,1 \text{ м}^3$ середовища необхідно приготувати

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} \times X_{\phi} = 6,1 \times 0,1 = 0,6 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу,}$$

де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} - V_{пм1} = 6,1 - 0,6 = 5,5 \text{ м}^3,$$

Врахуємо, що при одержанні $0,6 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті 10% культуральної рідини буде втрачено внаслідок крапливиносу через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} \times (1 + E_{\phi}) = 0,6 \times 1,1 = 0,66 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту $0,66 \text{ м}^3$ за коефіцієнта заповнення $0,6$ можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{па2} = 0,66 / 0,6 = 1,1 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{ст2} = 1 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з2} = 0,66 / 1 = 0,6$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів ($0,55-0,65$), отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву $V_{роб.2} = 0,66 \text{ м}^3$ необхідно приготувати

$$V_{пм2} = V_{роб.2} \times X_{\phi} = 0,66 \times 0,1 = 0,06 \text{ м}^3 = 60 \text{ л посівного матеріалу}$$

де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} - V_{пм2} = 660 - 60 = 600 \text{ л}$$

Врахуємо, що під час одержання 60 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок крапливиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} \times (1 + E_{\phi}) = 60 \times 1,1 = 66 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 66 л за коефіцієнта заповнення $0,6$ можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{па3} = 66 / 0,6 = 110 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний апарат $V_{ст3} = 100 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,3} = 66/100 = 0,6$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом 66 л необхідно:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} \times X_{\text{ф}} = 66 \times 0,1 = 6,6 \text{ л посівного матеріалу}$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пм3}} = 66 - 6,6 = 59,4 \text{ л}$$

Врахуємо, що під час одержання 6,6 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} \times (1 + E_{\text{ф}}) = 6,6 \times 1,1 = 7,3 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 7,2 л за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в інокуляторі об'ємом: $V_{\text{ін4}} = 7,2/0,6 = 12 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{ст4}} = 15 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,4} = 7,3/15 = 0,5$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм інокулятора обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву інокулятора необхідно підготувати

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} \times X_{\text{ф}} = 7,3 \times 0,1 = 0,7 \text{ л}$$

Тоді об'єм поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пм4}} = 7,3 - 0,7 = 6,6 \text{ л}$$

де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Об'єм інокуляту $V_{\text{пм4}} = 0,7 \text{ л}$ (700 мл) для засіву посівного апарата можна провести культивуванням продуцента лактобіонової кислоти у

колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Розрахуємо кількість колб для забезпечення процесу:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}) = 700 / (750 * 0,2) = 4 \text{ колби}$$

Отже, з метою забезпечення проведення біосинтезу лактобіонової кислоти необхідним є ферментер на 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6, інокулятори на 1 м^3 , 100 л та 15 л, а також потрібна підготовка 4-х качалочних колб.

Таблиця 3.1

Відомості щодо розрахунку підготовки інокуляту та біосинтезу
лактобіонової кислоти

№ стації	Тип апарата	Геометричний об'єм апарата $V_{\text{г}}, \text{л}$	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{з}}$, частка	Робочий об'єм апарата $V_{\text{роб}}, \text{л}$	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}, \text{л}$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}, \text{л}$	Найближчий об'єм апарата, л
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Колби, шт	4,0 шт	0,2	0,7	0,63	0,07	0,75
2.	Інокулятор 3	15	0,5	7,3	6,6	0,7	12
3.	Інокулятор 2	100	0,6	66	59,4	6,6	110
4.	Інокулятор 1	1000	0,6	660	600	60	1100
5.	Ферментер	10 000	0,61	6100	5500	600	10 100

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЛАКТОБІОНОВОЇ КИСЛОТИ

4.1. Катаболізм ростового субстрату у *Pseudomonas taetrolens*

За даними літератури, штам *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683 для синтезу лактобіонової кислоти культивують в поживному середовищі, що складається з таких компонентів, г/л [10]:

- Лактоза – 200;
- Яловичий екстракт – 1;
- Дріжджовий екстракт – 2;
- Пептон – 5;
- NaCl – 5;
- CaCO₃ – 30.

При цьому ростовим субстратом є лактоза.

За даними Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), лактоза перетворюється на α -D-глюкозу за впливу фермента лактаза-флоризин гідролази (КФ 3.2.1.108, 3.2.1.62) [33].

Таким чином, шляхом катаболізму утвореної глюкози у *Pseudomonas taetrolens* є гліколіз.

D-глюкоза за дії фосфоглюкомутази (КФ 2.7.5.1) перетворюється на глюкозо-6-фосфат, з якого ферментом глюкозо-6-фосфат ізомеразою (КФ 5.3.1.9) синтезується фруктозо-6-фосфат. Фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення фруктозо-6-фосфату у фруктозо-1,6-фосфат.

Далі під дією ферменту фруктозодифосфаталядолази (КФ.4.1.2.13) здійснюється перетворення фруктозо-1,6-дифосфату на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат. Фермент триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1) каталізує взаємне перетворення гліцеральдегід-3-фосфату та діоксиацетонфосфату.

					НУХТ БТЕК 04.03.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Біосинтез лактобіонової кислоти	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Зимовець Н.Ю.						
Перевір.		Скороцька О.І.					39	6
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід-3-фосфат, який під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) [34].

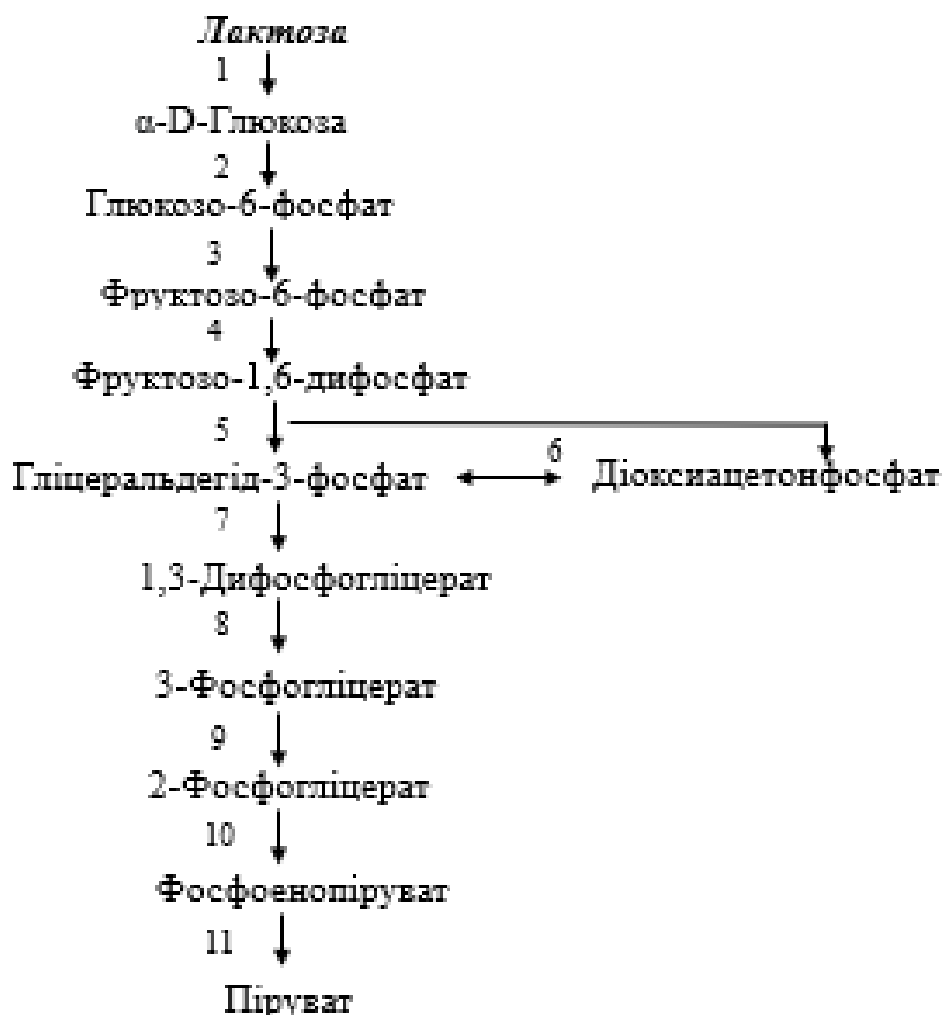


Рис. 2.1. Схема гліколітичного шляху у *Pseudomonas taetrolens* [35].

Ферменти:

- 1 – лактаза-флоризин гідролаза (КФ 3.2.1.108, 3.2.1.62);
- 2 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2);

- 3 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ.5.3.1.9.);
- 4 – фосфоглюкокіназа (КФ.2.7.1.11);
- 5 – фруктозодифосфатацьдолаза (КФ.4.1.2.13);
- 6 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1);
- 7 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12);
- 8 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3);
- 9 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12);
- 10 – енолаза (КФ.4.2.1.11);
- 11 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у лактобіонову кислоту

Біокаталітичне виробництво лактобіонової кислоти включає окислення лактози за допомогою спеціальних ферментів з використанням мікроорганізмів як біокаталізаторів. Джерелом вуглецю при вирощуванні *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683 є лактоза, яка перетворюється на проміжний продукт – лактобіоно- δ -лактон – за допомогою ферменту лактозооксидаза (КФ 1.1.99.18), після чого даний проміжний продукт перетворюється на лактобіонову кислоту при дії лактонази (КФ 3.1.1.25) [36].

Оскільки перетворення лактози як субстрату на цільовий продукт лактобіонову кислоту здійснюється у дві стадії, далі наведемо схему перетворення лактози через глюкозу на ряд інтермедіатів, які залучаються до циклу три карбонових кислот (ЦТК), що служить джерелом проміжних продуктів, необхідних для конструктивного метаболізму, а саме оксалоацетату, сукцинату, 2-оксоглутарату.

Лактоза перетворюється на α -D-глюкозу за впливу фермента лактаза-флоризин гідролази (КФ 3.2.1.108, 3.2.1.62) [33].

Далі α -D-глюкоза за дії фосфоглюкомутази (КФ 2.7.5.1) перетворюється на глюкозо-6-фосфат, з якого ферментом глюкозо-6-фосфат ізомеразою (КФ 5.3.1.9) синтезується фруктозо-6-фосфат.

Фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення фруктозо-6-фосфату у фруктозо-1,6-фосфат.

Далі під дією ферменту фруктозодифосфаталядолази (КФ.4.1.2.13) здійснюється перетворення фруктозо-1,6-дифосфату на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат. Фермент триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1) каталізує взаємне перетворення гліцеральдегід-3-фосфату та діоксиацетонфосфату. До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід-3-фосфат, який під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Наступною стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

У циклі трикарбонових кислот відбувається перетворення пірувату на оксалоацетат ферментом піруваткарбоксилазою (КФ 6.4.1.1.) через ацетил-Ко-А.

Оборотне взаємоперетворення цитрату, цис-аконітату та ізоцитрату відбувається під дією ферменту аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3.).

Перетворення ізоцитрату на 2-оксоглутарат каталізує ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42.), яка може бути НАД⁺– або НАДФ⁺– залежною. Під дією 2-оксоглутаратдегідрогенази (КФ 1.2.4.2.) з 2-оксоглутарату утворюється сукциніл-КоА, який при дії сукцинаттіокінази (КФ 6.2.1.5.) перетворюється на сукцинат. Даний процес спряжений з утворенням АТФ. Сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1.) окислює сукцинат до фумарату. Даний фермент здійснює перенесення електронів від сукцинату на флавінаденіндинуклеотид (ФАД).

Від ФАДН електрони надходять у дихальний ланцюг; НАД не використовується як акцептор електронів. Далі відбувається приєднання води до фумарату з утворенням малату за присутності ферменту фумарази (КФ 4.2.1.2.). Дегідрування малату до оксалоацетату здійснюється малатдегідрогеназою (КФ 1.1.1.37.). Усі реакції ЦТК оборотні, окрім утворення сукциніл-КоА. Утворення цитрату з оксалоацетату каталізує фермент цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1.).

Для поповнення у клітині втрат оксалоацетату та малату у даного продуцента функціонують анаплеротичні реакції – карбоксилювання утворених раніше пірувату та фосфоенолпірувату за участі ферментів піруваткарбоксилази, фосфоенолпіруваткарбоксилази та малатдегідрогенази декарбоксилювальної.

Ферменти

1 – лактозооксидаза (КФ 1.1.99.18); 2 – лактоназа (КФ 3.1.1.25); 3 – лактаза-флоризин гідролаза (КФ 3.2.1.108, 3.2.1.62); 4 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 5 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ.5.3.1.9.); 6 – фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 7 – фруктозодифосфатальдолоаза (КФ.4.1.2.13); 8 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 9 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 10 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 11 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 12 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 13 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40); 14 – фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.131); 15 – піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1); 16 – піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.4.1); 17 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 18 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 19 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42.); 20 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 1.2.4.2); 21 – сукцинаттіокіназа (КФ 6.2.1.5); 22 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 23 – фумараза (КФ 4.2.1.2); 24 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 25 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1).

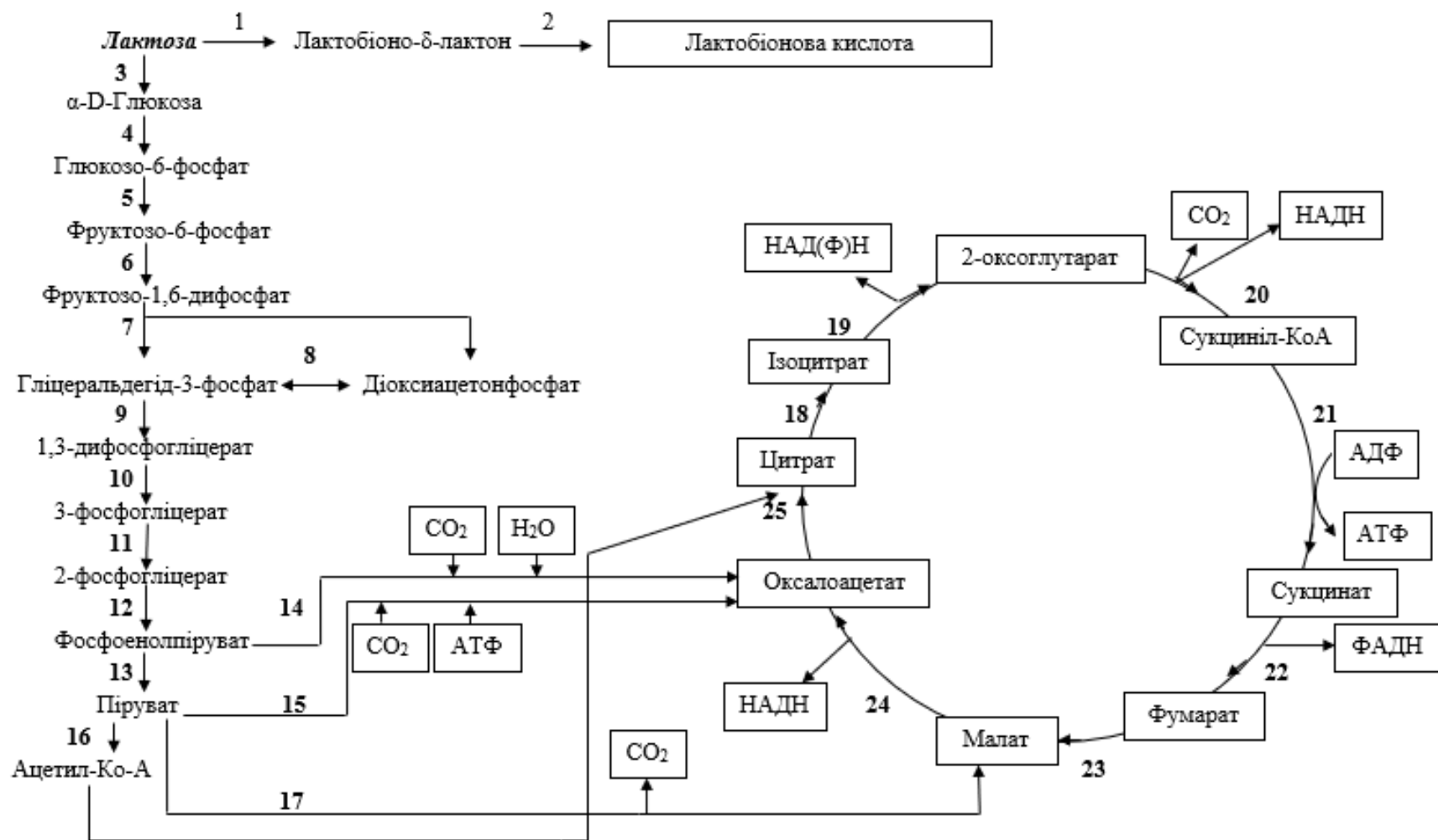


Рис. 4.1. Біосинтез лактобіонової кислоти *Pseudomonas taetrolens*, починаючи з реакцій катаболізму лактози.

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Згідно даних статті [10], для одержання лактобіонової кислоти при вирощуванні біологічного агента *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683, кількість розчиненого кисню упродовж процесу має підтримуватись на рівні 30 %. Це свідчить про те, що даний продуцент є аеробом і потребує повітря у процесі свого росту та синтезу цільового продукту.

Як відомо з літератури, культивування аеробів включає такі підходи:

- 1) культивування на поверхні щільних і рідких поживних середовищ;
- 2) культивування в тонкому шарі середовища;
- 3) глибинне культивування в рідких середовищах [37].

Оскільки лактобіонова кислота є екзометаболітом, тобто виділяється у культуральне середовище, доцільним у даному випадку є проведення процесу глибинного культивування обраного продуцента.

Всі способи глибинного культивування аеробних мікроорганізмів зводяться до збільшення поверхні зіткнення живильного середовища з киснем повітря. Слід мати на увазі, що при глибинному культивуванні в рідких середовищах мікроорганізми використовують розчинений кисень, але розчинність кисню у воді невелика. Тому, щоб забезпечити зростання аеробних мікроорганізмів в товщі середовища, його необхідно постійно аерувати [37].

Для кращої розчинності кисню в поживному середовищі використовують такий підхід як перемішування. В роботі [10] вказано, що перемішування культурального середовища проводили зі швидкістю 200 об/хв.

					НУХТ БТЕК 04.03.16 КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми				Літ.		Арк.	Аркушів	
Розроб.		Зимовець Н.Ю.										45	32
Перевір.		Скороцька О.І.											
Реценз.													
Н. Контр.													
Затверд.		Стабніков В.П.											
									Кафедра БТМ				

Зважаючи на характеристику глибинного способу вирощування мікроорганізмів, такий метод нам підходить.

Дані статті [10] свідчать, що оптимальна температура становила 25°C, а значення рН підтримували на рівні 6,0. Такі умови є сприятливими для розвитку сторонньої мікрофлори, представленої мезофільними мікроорганізмами та нейтрофілами. Враховуючи цей факт, слід проводити всі підготовчі та основні операції біосинтезу в асептичних умовах.

Асептичні умови створюють шляхом стерилізації допоміжного та ферментаційного обладнання, комунікацій, аераційного повітря, поживних середовищ, титрувальних розчинів, піногасників та інших допоміжних компонентів.

До промислових способів культивування мікроорганізмів належать періодичне, безперервне культивування та культивування іммобілізованих клітин. Найбільш поширений спосіб періодичного культивування. При даному способі інокулянт вносять у живильне середовище, яке містить задану кількість всіх необхідних поживних речовин. При цьому ні один з істотних компонентів живильного середовища не надходить у систему у процесі культивування, тобто це замкнута система. Під час культивування мікроорганізмів у безперервній культурі всі компоненти живильного середовища постійно надходять у систему і виводяться з неї. Це відкрита система [38].

Оскільки процес культивування продуцента тривав 48 год, а в кінці отримували необхідну кількість лактобіонової кислоти, варто обрати періодичний режим вирощування.

Отже, культивування *P. taetrolens* ATCC 4683 для одержання лактобіонової кислоти будемо здійснювати періодичним глибинним способом, із проведенням аерації та забезпеченням асептичних умов.

Спираючись на зазначені у попередньому підрозділі умови культивування, ферментер для мікробного синтезу лактобіонової кислоти має бути обладнаний відповідним додатковим оснащенням:

1) барботером для подачі стерильного аераційного повітря у товщу поживного середовища;

2) для кращої розчинності кисню в поживному середовищі в апарат встановлюють перемішуючий пристрій.

В промислових ферментерах зазвичай використовують механічні мішалки з обертальним рухом. Під час роботи таких мішалок виникає складний тривимірний рух рідини - тангенціальний, радіальний, аксіальний (осьовий) в якому переважає окружна складова швидкості. Перемішування рідкої фази відбувається за рахунок вихорів, що виникають на краях мішалки [39].

Оскільки продуцент не характеризується особливостями морфології, що можуть потенційно впливати на вибір перемішуючого пристрою, слід обрати механічну мішалку для даного ферментера.

3) з метою контролю рівня розчиненого кисню, температури та рН середовища встановлюють відповідні контролюючі датчики.

Так, для біосинтезу органічних кислот підходить ферментер об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Так, компанія Foshan Tongguang Intelligent Equipment Manufacturing Co., Ltd. має у своєму каталозі підходящий ферментер на 10 000 л. Габаритні розміри апарата становлять 2950x2200x2570 мм. Матеріал - нержавіюча сталь марки 316 або 304. Швидкість роботи перемішуючого пристрою має здатність регулюватись в діапазоні 0-1450 об/хв [40].

5.2. Обґрунтування етапу підготовки аераційного повітря

Згідно даних статті [10], для одержання лактобіонової кислоти при вирощуванні біологічного агента *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683, кількість розчиненого кисню упродовж процесу має підтримуватись на рівні 30 %. Це свідчить про те, що даний продуцент є аеробом і потребує повітря у процесі свого росту та синтезу цільового продукту. Для кращої розчинності кисню в поживному середовищі використовують такий підхід

як перемішування. В роботі [10] вказано, що перемішування культурального середовища проводили зі швидкістю 200 об/хв.

Аераційне повітря стерилізують, як правило, шляхом стерилізуючої фільтрації. Існує цілий набір методів стерилізації повітря, але всі вони повинні гарантувати ефективність видалення контамінантів $E = 99,9999\%$. В біотехнологічній практиці застосовується типова багатоступенева система очистки, яка дозволяє послідовно вилучати механічні та мікробні контамінанти. Як правило, використовується стандартна система очищення та стерилізації аераційного повітря яка складається з наступних блоків [41]:

- попереднє очищення повітря;
- стиснення повітря
- охолодження та видалення зайвої вологи
- підігрів повітря
- стерилізація повітря у головних фільтрах;
- стерилізація повітря в індивідуальних фільтрах.

Атмосферне повітря завжди містить дрібні тверді або рідкі частинки, які несуть на собі різноманітні мікроорганізми. У містах середня концентрація мікрофлори досягає 10^3 - 10^5 клітин/м³ (кл/м³). В озелених районах ця концентрація становить 10^3 - $3 \cdot 10^4$ кл/м³. Саме там намагаються розташовувати підприємства тонкого мікробного синтезу.

Атмосферне повітря, засмоктується через забірний пристрій, встановлений у найвищій точці відділення повітряпідготовки і попередньо очищається від пилу у фільтрі, стискується в компресорі до необхідного тиску, нагріваючись до 120-220°C. Потім повітря охолоджується у теплообміннику і надходить до вологовідокремлювача (ресивера), де відокремлюється від крапель вологи та мастила. З метою позбавлення пульсацій тиску повітря та швидкості руху повітря при роботі компресора використовують ресивер великої ємності. Осушене повітря підігрівається у теплообміннику, проходить через фільтри грубого очищення і далі

подається до індивідуального фільтра, встановленого безпосередньо біля ферментера, де звільняється від сторонньої мікрофлори.

Для видалення контамінантів використовують волокнисті фільтруючі матеріали з різних мінеральних або органічних речовин, пористі перегородки з кераміки або полімерних матеріалів.

Фільтрувальний матеріал повинен відповідати наступним основним вимогам: мати високу ефективність при мінімальному опорі, достатню пилоємкість і механічну міцність; повинен бути стійкими до впливу гострої пари як основного агента, що стерилізує, бути зручним і надійним в експлуатації [41].

Відповідно до вищеописаного, ферментер для мікробного синтезу лактобіонової кислоти має бути обладнаний відповідним додатковим оснащенням:

- 1) барботером для подачі стерильного аераційного повітря у товщу поживного середовища;
- 2) для кращої розчинності кисню в поживному середовищі в апарат встановлюють перемішуючий пристрій.

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних засобів

Вибір мийних засобів для очищення ферментерів та біореакторів у біотехнології є критично важливим для забезпечення стерильності та ефективності виробничих процесів. Неправильний вибір або використання неякісних мийних засобів може призвести до контамінації, зниження виходу продукту та підвищення ризику відмови обладнання.

Основні критерії вибору мийних засобів [42]:

1. **Сумісність з матеріалами обладнання:** Мийні засоби повинні бути хімічно сумісними з матеріалами, з яких виготовлено обладнання (нержавіюча сталь, скло, полімери), щоб уникнути корозії або пошкоджень.

2. **Ефективність видалення забруднень:** Засіб має ефективно усувати різні типи забруднень, включаючи органічні залишки, біоплівки та неорганічні відкладення.
3. **Біорозкладність та екологічність:** Важливо обирати мийні засоби, які є екологічно безпечними та легко біорозкладаються, мінімізуючи вплив на навколишнє середовище.
4. **Безпека для персоналу:** Засоби повинні бути безпечними у використанні, не виділяти токсичних парів та не викликати подразнень.

Під час очищення обладнання рекомендовано дотримуватись наступних принципів:

- Розробка стандартних операційних процедур (СОП): Включає вибір відповідних мийних засобів, концентрацій, температурних режимів та часу обробки.
- Використання CIP-систем: Забезпечує автоматизоване та ефективне очищення внутрішніх поверхонь без розбирання обладнання.
- Регулярний моніторинг та валідація процесів очищення: Гарантує постійну ефективність та відповідність санітарним нормам.

Вибір та правильне застосування мийних засобів є ключовими для підтримання високих стандартів гігієни та ефективності у біотехнологічних виробництвах [42].

Для ефективного миття біотехнологічних ферментерів важливо обирати мийні засоби, які забезпечують видалення органічних та мінеральних відкладень, сумісні з матеріалами обладнання та відповідають вимогам безпеки. Перед використанням будь-якого мийного засобу важливо ознайомитися з інструкцією виробника та провести тестування на сумісність з матеріалами обладнання. Також рекомендується

дотримуватися стандартних операційних процедур очищення та забезпечити належне полоскання після застосування мийних засобів.

Таблиця 5.1

Характеристика миючих засобів

Назва	Діючі речовини	Властивості	Джерело
DR CIP ACID	Азотна та фосфорна кислоти	Висококонцентрований рідкий кислотний засіб на основі суміші азотної та фосфорної кислот. Рекомендований для видалення стійких органічних і мінеральних відкладень, таких як пивний та молочний камінь, накип, солі кальцію, залишки протеїнів та жирів. Підходить для обладнання з нержавіючої сталі, гуми, кераміки тощо.	[43]
Diversey Super Dilac VA4	Азотна та фосфорна кислоти	Кислотний засіб на основі азотно-фосфорної кислоти, призначений для очищення від накипу в CIP-мийках. Ефективно видаляє неорганічні відкладення, зокрема оксалат кальцію. Має низьке піноутворення та підходить для використання в умовах високого тиску та турбулентності.	[44]
Chemipon LP 100	Лужна основа, триполіфосфат, неіонний тензид	Сильнолужний непінний порошкоподібний миючий засіб, що забезпечує відмінну очисну, дисперсійну та емульсійну дію.	[45]
HC-CL 45	Луг 15-30%	Лужний універсальний непінний рідкий миючий та дезінфікуючий засіб, призначений для CIP-систем та інших видів машинного очищення та дезінфекції.	[46]

Щодо реєстрації миючих засобів, то згідно з Положенням про державну реєстрацію дезінфекційних засобів (Постанова Кабінету Міністрів України від 15.08.2023 № 863) [47], миючі засоби, які не мають

дезінфекційних властивостей, не підлягають обов'язковій державній реєстрації як дезінфекційні засоби.

Тому, якщо описані вище засоби використовується виключно як миючий засіб без дезінфекційних властивостей, його реєстрація як дезінфекційного засобу не є обов'язковою.

5.3.2. Обґрунтування вибору дезінфікуючих засобів

Дезінфекція приміщень та робочих поверхонь у біотехнологічних виробництвах є критично важливою для забезпечення стерильності та запобігання контамінації продуктів. Ефективна дезінфекція включає комплекс заходів, спрямованих на знищення патогенних мікроорганізмів та підтримання високих стандартів гігієни.

Основні етапи дезінфекції:

1. Підготовка поверхонь:

- Очищення від видимих забруднень: Перед дезінфекцією необхідно ретельно видалити залишки біологічних матеріалів та інших забруднень, оскільки вони можуть знижувати ефективність дезінфікуючих засобів.
- Використання мийно-дезінфікуючих розчинів: Поєднання мийних та дезінфікуючих компонентів дозволяє одночасно очищати та знезаражувати поверхні. Наприклад, застосування розчину з дидецилдиметиламоній хлоридом ефективно знищує широкий спектр мікроорганізмів.

2. Вибір дезінфікуючих засобів:

- Перекис водню: 30%-й розчин перекису водню є потужним дезінфектантом, який ефективно бореться з бактеріями, грибами та вірусами. Він не залишає шкідливих залишків і може бути використаний для обробки повітря та поверхонь [48].

- Четвертинні амонієві сполуки (ЧАС): Ефективні проти багатьох бактерій та вірусів, використовуються для обробки поверхонь та обладнання.

3. Методи дезінфекції:

- Ручна обробка: Протирання або зрошення поверхонь дезінфікуючими розчинами. Важливо забезпечити повне покриття та достатній час експозиції для знищення мікроорганізмів.
- Аерозольна дезінфекція: Розпилення дезінфікуючих засобів у вигляді дрібнодисперсного туману дозволяє обробляти важкодоступні місця та повітряні простори.
- Використання ультрафіолетових (УФ) ламп: Бактерицидні УФ-лампи ефективно знезаражують повітря та поверхні, руйнуючи ДНК мікроорганізмів. Однак слід дотримуватися правил безпеки, оскільки тривала дія УФ-випромінювання може бути шкідливою для людини [49, 50].

4. Контроль ефективності дезінфекції:

- 1) Візуальний огляд: Перевірка чистоти поверхонь після обробки.
- 2) Бактеріологічний контроль: Відбір проб для визначення наявності залишкової мікрофлори та оцінки ефективності проведених заходів.

Регулярне проведення дезінфекційних заходів, правильний вибір засобів та методів обробки, а також постійний контроль їх ефективності є запорукою безпечного та якісного біотехнологічного виробництва [51, 52].

Отже, підберемо ефективні дезінфікуючі засоби для обробки приміщень та поверхонь на біотехнологічному підприємстві. Порівняння підібраних засобів наведено у таблиці 5.2.

Таблиця 5.2

Порівняння дезінфікуючих засобів

Назва, склад	Виробник	Властивості	Активність	Токсичність та безпеку	Концентрація, застосування	Термін та умови зберігання	Державна реєстрація	Джерело
«Вернедор-Преміум» Вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: суміш четвертинних амонійних сполук (алкілдиметилбензил-амоній хлорид, алкілдиметилетил-бензиламоній хлорид, дидецилдметиламоній хлорид) – 10,0; N,N'-біс(3-амінопропіл)додециламін – 10,0; полігексаметилен-гуанідин гідрохлорид – 2,0 (діючі речовини);	ТОВ «ВІК-А» (Україна) та ТОВ «М Д М», ТОВ «ТІ ЕНД АЙ ПАРТНЕРИ», ТОВ «ФАРТУНАТ», за ліцензією ТОВ «ВІК-А»	Водні розчини засобу прозорі, мають відмінні мийні, змочувальні, емульгуючі властивості, не викликають корозії металів, не пошкоджують вироби, що виготовлені із корозійностійких і нестійких до корозії металів, скла, полімерних матеріалів,	Ефективний проти бактерій, вірусів, грибкових інфекцій, пліснявих грибів, має спороцидні властивості.	За параметрами гострої токсичності засіб належить до 3 класу помірно небезпечних речовин при введенні у шлунок; при введенні в черевну порожнину, в умовах інгаляційного впливу (за ступенем	0,1%, експозиція складає 5 хвилин. Для приготування 10 л розчину потрібно розчинити 10 мл засобу в 9990,0 мл води. Норма витрати засобу – 100 мл/м².	Строк придатності засобу та гарантійний строк зберігання – 5 років з дати виготовлення. Засіб зберігають у пакуванні виробника, захищеному від світла місці, окремо від ліків, у місцях,	Вперше зареєстрований в Україні 16.04.2015	[53]

допоміжні речовини: вода підготовлена, стабілізатори, органічний розчинник, поверхнево- активні речовини, ферменти (протеаза, ліпаза), комплексон		поліетилену, поліаміду, полістиролу, акрилового скла, силікону, гуми, каучуку, дерева, фаянсу, кахлю, поверхонь медичних приладів та устаткування із полімерним, лакофарбним, гальванічним покриттям, добре змиваються з поверхонь, підданих обробці, не залишаючи плям та нальоту, не фіксують		летючості) та при нанесенні на шкіру до 4 класу мало небезпечних речовин. Засіб не чинить шкірно- резорбтивну і сенсibiliзуючу дію. Робочі розчини засобу не мають шкірно- подразнюючої дії. При використанні робочих розчинів способом зрошування (у формі аерозолі)		недоступних для дітей, за температури від мінус 40 °C до плюс 35 °C		
---	--	---	--	---	--	--	--	--

		органічні та неорганічні забруднення, не знебарвлюють і не зменшують міцність тканин. Видаляють білкові, жирові (у т.ч. залишки крові, лікарських засобів) забруднення із поверхонь та порожнин виробів медичного призначення, гомогенізують мокротиння тощо. Засіб не сумісний з милами, аніонними		спостерігається подразнення верхніх дихальних шляхів та очей. Препарат не виявляє мутагенних, канцерогенних, тератогенних та гонадотропних властивостей.					
--	--	--	--	---	--	--	--	--	--

		поверхнево-активними речовинами, синтетичними миючими засобами.						
Фамідез® Ендо. Вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: дидецилметилполі-(оксиетил)амонію пропіонат - 5,63; алкілпропілендіамін-1,5-бігуанідину ацетат - 3,75 (діючі речовини); неіоногенні ПАВ < 10,0; барвник < 0,5; запашка < 0,5; вода - до 100,0	ТзОВ "ДезоМарк" (Україна)	Добре розчиняється у воді. Робочі розчини прозорі, помірно забарвлені у зелений колір, мають слабкий запах використаної запашки, виявляють мийні властивості. Не ушкоджують виробу медичного призначення із	Виявляє бактерицидні, туберкулоцидні, віруліцидні, фунгіцидні та спороцидні властивості.	За параметрами гострої токсичності для лабораторних тварин при введенні в шлунок та при нанесенні на шкіру належить до мало небезпечних речовин. У нативній формі та концентрованих розчинах подразнює	0,5%, норма витрати засобу – 100 мл/м². Для приготування 10 л розчину потрібно розчинити 50 мл засобу в 9950,0 мл води.	Зберігають у пакуванні виробника у критичних неопалюваних складських приміщеннях, які захищені від вологи та прямого сонячного проміння, за температури не вище 35 °С осторонь від джерел відкритого	Зареєстрований в Україні 18.09.2019	[54]

		металу, скла, гуми та полімерних матеріалів, добре змиваються, не залишають нальоту. Засіб "Фамідез® Ендо" не сумісний з окислювачами, аніонними поверхнево- активними речовинами, милами.		слизову оболонку очей. Не виявляє сенсibiliзуючих властивостей		вогню та тепла. Гарантійний термін зберігання 3 роки з дати виробництва		
--	--	---	--	--	--	---	--	--

Для раціонального застосування дезінфектантів рекомендується [55]:

- використовувати діючі речовини з різних хімічних класів, що відрізняються механізмом дії на мікробні клітини;
- змінювати групи дезінфектантів у процесі роботи з інтервалом 3–6 міс;
- поточні обробки та генеральні прибирання проводити дезінфектантами з діючими речовинами різних хімічних груп;
- не занижувати концентрацію робочих розчинів;
- оптимізувати вибір дезінфектантів щодо дезінфекції.

Також слід підібрати ефективні засоби для обробки рук персоналу, адже від працівників безпосередньо залежить якість кінцевого продукту.

Таблиця 5.3

Засоби для обробки рук персоналу [56]

Назва, активні речовини	Виробник	Характеристика	Дані про державну реєстрацію
«ДЕЗОВІР» (DEZOVIR), діючі речовини: 2-Пропанол – 70,00-75,00%, пероксид водню – 0,40-0,50%, хлоргексидину біглюконат – 0,50-0,55%	Науково-виробниче приватне підприємство «Дезо», Україна	Засіб для зовнішнього застосування. Застосовується для дезінфекції (антисептики) рук медичного персоналу закладів охорони здоров'я усіх профілів (в тому числі для дезінфекції рук хірургів і членів хірургічних бригад, операційних медичних сестер та інших осіб, які приймають участь у проведенні операцій, прийомі пологів тощо); аптечних закладах; лабораторіях різних підпорядкувань, санітарного транспорту, донорських пунктів, пунктів переливання крові, медсанчастин, фельдшерсько-акушерських та медичних пунктів; на об'єктах комунально-побутового обслуговування; закладах громадського харчування та торгівлі; навчально-виховних та учбових закладах різних рівнів акредитації, дитячих дошкільних закладах; у військових частинах; на підприємствах харчової та переробної промисловості, агропромислового комплексу,	15.07.2020 (діє до 15.07.2025)

		мікробіологічної, фармацевтичної, парфумерно-косметичної промисловості, у ресторанно-готельному господарстві, підприємствах громадського харчування та торгівлі, в автомобільному, залізничному, авіаційному та водному транспорті, закладах та установах соціального захисту, пенітенціарних установах, закладах зв'язку та банківських установах, в місцях загального користування та інших епідемічно-значимих об'єктах, діяльність яких вимагає проведення дезінфекційних робіт відповідно до діючих санітарно-гігієнічних та протиепідемічних норм і правил у вогнищах інфекційних хвороб; населенням у побуті для гігієнічної антисептики рук та антисептичної обробки шкірних покривів; екстреної дезінфекції поверхонь та некритичних медичних виробів. Оптова та роздрібна торгівля.	
Засіб для дезінфекції рук та шкіри спиртовмісний "minisept" гель або рідина (діючі речовини: спирт етиловий - 70%, спирт ізопропіловий – 5%)	ТОВ «АНТЕНІТІ», Україна	Засоби для хірургічної та гігієнічної обробки шкіри рук медичного персоналу закладів охорони здоров'я усіх профілів, аптечних закладів, дитячих дошкільних та учбових закладів різних рівнів акредитації, санаторно-курортних і спортивно-оздоровчих закладів різного профілю, об'єктів комунально-побутового обслуговування, працівників парфумерно-косметичних підприємств, громадського харчування, закладів готельного та ресторанного господарства, торговельних закладів, закладів культури та відпочинку, об'єктів забезпечення усіх видів транспорту, підприємств фармацевтичної, мікробіологічної, хімічної, біотехнологічної та харчової промисловості, агропромислових та промислових підприємств, об'єктів цивільної оборони та військових частин, установ соціального захисту населення та пенітенціарної служби, оптово-роздрібна торгівля,	03.08.2020 (діє до 03.08.2025)

		реалізація через торгову та аптечну мережу.	
ЗАСІБ ДЕЗІНФЕКЦІЙНИЙ «DS-E80», діючими речовинами якого є спирт етиловий денатурований у межах 75,0 - 80,0%, суміш четвертинних амонійних сполук у межах 0,20 - 0,26 % (алкіл (C12-C18) диметилбензил-амоніум хлорид у межах 0,10 - 0,13% та алкіл (C12-C14) диметилетилбензил-амоніум хлорид у межах 0,10 - 0,13%), хлоргексидин біглюконат у межах 0,1 - 0,4%»	ТОВ "ХАДО-технологія", Україна	Дезінфекція рук та шкіри в закладах охорони здоров'я (в тому числі лікувально-профілактичних закладах різного профілю, станціях переливання крові, аптеках та аптечних закладах; вогнищах інфекційних хвороб); на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної, хімічної, біотехнологічної, харчової і харчопереробної промисловості, торгівлі, зв'язку, комунально-побутового обслуговування; ветеринарних клінік; навчально-виховних закладах усіх типів незалежно від їх підпорядкування, форм власності і акредитації; закладах ресторанного господарства, соціального захисту; побуті; в умовах надзвичайних ситуацій; місцях тимчасового проживання та масового перебування людей; на рухомому складі та об'єктах забезпечення всіх видів транспорту; дезінфекція виробів медичного призначення; косметологічного, манікюрного та перукарського інструменту; а також дезінфекція твердих поверхонь приміщень, предметів та обладнання (у т. ч. медичного); інше згідно інструкцій з використання. Оптова та роздрібна торгівля (у тому числі аптечна мережа).	03.08.2020 (діє до 03.08.2025)

5.3.3. Розрахунки витрат мийних та дезінфікуючих засобів

З метою забезпечення проведення біосинтезу лактобіонової кислоти необхідним є ферментер на 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6, інокулятори на 1 м³, 100 л та 15 л, а також потрібна підготовка 4-х качалочних колб.

Технологічна схема отримання лактобіонової кислоти, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі додаткові стадії:

- підготовка аераційного повітря;

- приготування та стерилізація поживного середовища.

Також варто передбачити таке додаткове обладнання:

- для приготування та стерилізації композиції А: реактори об'ємом 20 та 200 л;
- для приготування та стерилізації композиції Б: реактор об'ємом 10 л;
- для приготування та стерилізації поживного середовища: реактор витримувач об'ємом 6,3 м³, УБС-10 об'ємом 10 м³.

Виробниче культивування лактобіонової кислоти здійснюватиметься в наступних виробничих приміщеннях - цех біосинтезу, лабораторія для супровідних допоміжних стадій, в якій розміщено лабораторний бокс, автоклави, холодильники, термостати, а також апаратура для контролю основних показників виробництва.

В ході розробки плану виробничого приміщення слід врахувати розміри ферментеру, інокуляторів для культивування біологічного агента, а також реакторів. Відстань між обладнанням становить 1 метр, а довжину від стін приймаємо 1,5 метра.

На рис. 5.1. зображено план розташування приміщень для проведення культивування *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683 для одержання лактобіонової кислоти.

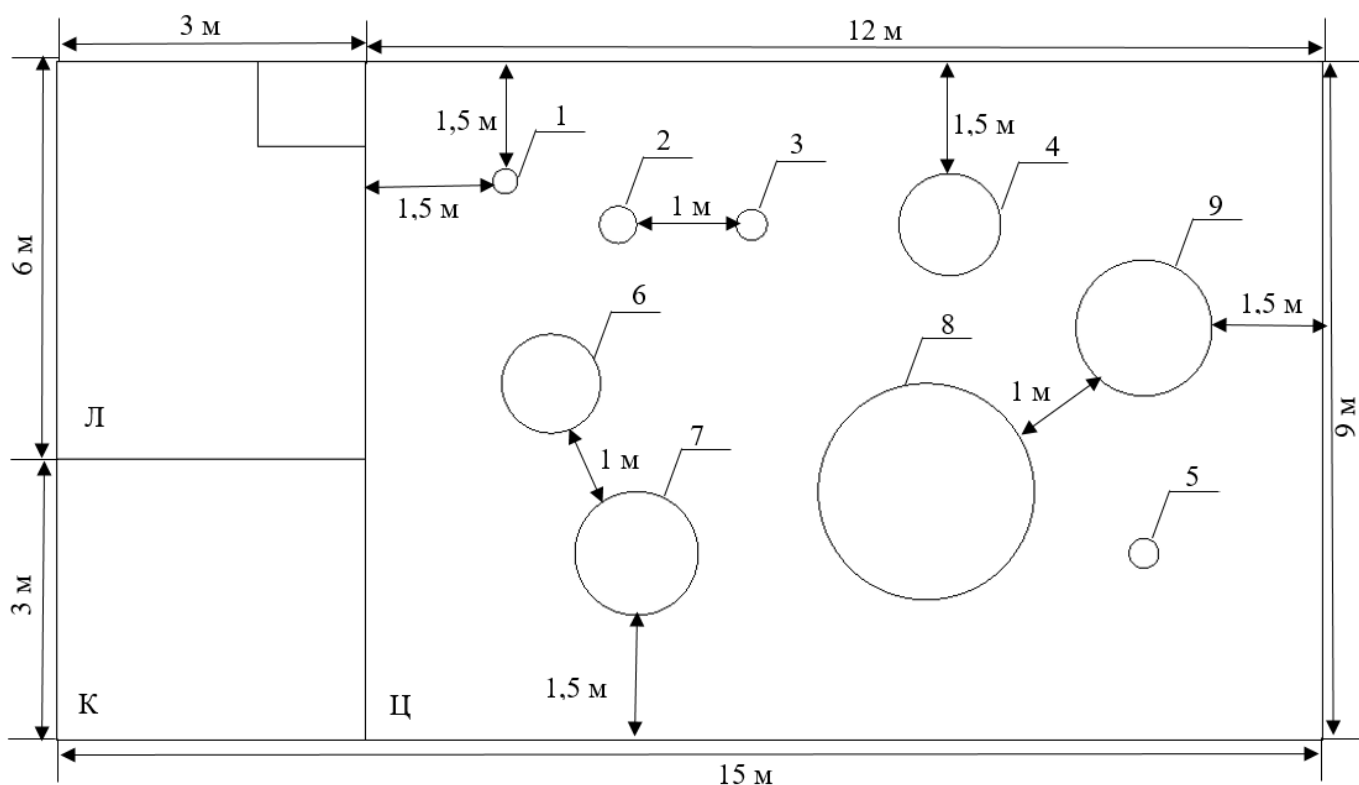


Рис. 5.1. План розташування приміщень для проведення культивування *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683 для одержання лактобіонової кислоти.

Ц - цех виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу:
 1 – інокулятор 10 л (ІН-10); 2 – реактор 20 л (Р-12); 3 – інокулятор 100 л (ІН-16); 4 – реактор 200 л (Р-21); 5 – реактор 10 л (Р-21); 6 - інокулятор 1000 л (ІН-25); 7 – реактор-витримувач 6,3 м³ (Р-27); 8 - установка безперервної стерилізації (УБС-29); 9 – ферментер 10 м³ (ФР-31); Л – лабораторія; К – приміщення з качалками.

Таблиця 5.4

Габаритні розміри обладнання для біосинтезу лактобіонової кислоти

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Інокулятор	10	0,4	0,8
Реактор для композиції А	20	0,6	1
Інокулятор	100	0,5	1,3
Реактор для композиції А	200	1,65	2,1
Реактор для композиції Б	10	0,48	0,48

Інокулятор	1000	1,6	2
Реактор-витримувач	6300	2	3,05
Установка безперервної стерилізації	10 000	3,5	2,25
Ферментер	10 000	2,2	2,95
Всього	27 640		

У відповідності з проведеними розрахунками, загальний обсяг необхідного обладнання становить 27 640 л.

При розрахунку об'єм культуральної рідини за цикл культивування було прийнято кількість трудоднів 320. Створення необхідних умов якості виробництва досягається шляхом миття підлоги кожного дня - 320 разів. Щомісяця проводять генеральне прибирання, що передбачає миття стін, підлоги, вікон і т.д., тому кратність миття становить 10 разів на 320 днів. Щоб розрахувати обсяги мийних засобів слід вирахувати орієнтовну площу обробки мийними та дезінфікуючими засобами із врахуванням площі підлоги виробничих приміщень та площі стін на висоту. Приймаємо, що стіни будемо мити на висоту 2,5 м, оскільки це практично можливо.

Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 108 м² (12×9 м), площа стін – $[(12 \times 2,5) + (9 \times 2,5)] \times 2 = (30 + 22,5) \times 2 = 105 \text{ м}^2$, загальна площа – $108 + 105 = 213 \text{ м}^2$. Загальну площу поверхні для обробки подано в табл. 5.5.

Таблиця 5.5

**Площі стін та підлоги приміщень для одержання лактобіонової
кислоти**

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	108	105	213
Мікробіологічна лабораторія	18	45	63
Приміщення з качалками	9	30	39
Загальна площа	135	180	315

Враховуючи обсяги культуральної рідини та кількість продукту за цикл, вирахуємо кількість виробничих циклів:

$$681\,606/5\,600 = 121 \text{ цикл.}$$

Підготовку відповідного обладнання необхідно проводити перед кожним циклом, тоді кратність миття за весь період виробництва становить 122, адже проводять додаткове миття після останнього циклу. Враховуючи це, загальний об'єм, що підлягає миттю, становитиме:

$$27,64 \times 122 = 3\,372,08 \text{ м}^3$$

Узагальнені відомості щодо площ миття та/або дезінфекції за весь період виробництва представлено у таблиці 2.6.

Таблиця 5.6

**Площі миття обладнання та поверхонь за весь період
виробництва**

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	27,64	122	3 372,08
Підлога	135	320	43 200
Стіни, двері, вікна	180	10	1800

Для миття обладнання у промислових умовах застосовують СІР-мийку. Витрати робочого розчину становлять 20% від об'єму обладнання, що підлягає миттю. Тоді для миття 3 372,08 м³ обладнання потрібна така кількість миючого засобу:

$$3\,372,08 \times 0,2 = 674,4 \text{ м}^3 \text{ засобу в рік}$$

Узагальнені результати розрахунків щодо миючих та дезінфікуючих засобів зображено в таблиці 5.7. Слід брати до уваги, що в процесі миття виробничих поверхонь витрата робочого розчину миючого засобу складає 100 мл на 1 м² поверхні. Таким чином, можна зробити висновок, що серед миючих засобів, призначених для очищення обладнання, за вартістю

найкращим варіантом є Diversey Super Dilac VA4. У свою чергу, серед дезінфікуючих засобів для миття та дезінфекції поверхонь приміщень економічно доцільним є Вернедор-Преміум. Однак, допускаємо використання цього засобу, чергуючи з Фамідез Ендо, для запобігання виникнення резистентних форм мікроорганізмів.

Таблиця 5.7

Узагальнені розрахунки миючих та дезінфікуючих засобів для виробництва лактобіонової кислоти

Назва мийного/ дезінфікувального засобу	Відомості про державну реєстрацію	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	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
DR CIP ACID (азотна та фосфорна кислоти) ¹	Згідно з Положенням про державну реєстрацію дезінфекційних засобів (Постанова Кабінету Міністрів України від 15.08.2023 № 863), миючі засоби, які не мають дезінфекційних властивостей, не підлягають обов'язковій державній реєстрації як дезінфекційні засоби	Обладнання	0,6	3 372 080	674 400	100	0,6	404 640
Diversey Super Dilac VA4 (азотна та фосфорна кислоти) ²		Обладнання	0,2	3 372 080	674 400	197,7	0,4	269 760
Chemipon LP 100 (лужна основа, триполіфосфат, неіонний тензид) ³		Обладнання	0,7	3 372 080	674 400	194,7	1,36	917 184
НС-CL 45 (луг 15-30%, компонент захисту поверхні 15-30%) ⁴		Обладнання	1	3 372 080	674 400	94,9	0,95	640 680
Вернедор-Преміум (полігексаметилен гуанідин гідрохлориду-7%; N-N-біс (3 амінопропіл) додециламіну -	Вперше зареєстрований в Україні 16.04.2015	Поверхні приміщень (підлога, стіни)	0,1	45 000	4500	654	0,65	2 925

3%) ⁵								
Фамідез Ендо (дидецилметилпол і(оксигетил)амонію пропіонат 5.63%, алкілпропілендіа мін 1.5%, бігуанідину ацетат 3.75%) ⁶	Зареєстрований в Україні 18.09.2019	Поверхні приміщень (підлога, стіни)	0,5	45 000	4500	370,4	1,85	8 325

1 - https://store-consumables.com.ua/dr-cip-acid-dr-sip-acyd-kyslotnyj-myyuchyj-zasib?srsid=AfmBOopA9CHiltP0I2MEDITHhcRuU_36qCjyu6wrOiuYeHhuabwYZtY7

2 – https://prom.ua/p2572084346-mijnij-zasib-diversej.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwtpLABhC7ARIsALBOCVoUHEVi8-r2R2CxI2bv6Dxo0oGIY_JDR-WCMgs8auDfa3RbvmhKHwMaAhmGEALw_wcB

3 – https://klineko.com.ua/product/chemipon-lp-100/?srsid=AfmBOoo7ZzAgZTfTjIYSOtlu_qAbhGFO-gzSOxYV0v17EVjBpeDNWDY

4 – <https://klineko.com.ua/shhelochnye-sredstva/hc-cl-45/?srsid=AfmBOorxQEwbyvi94yxQowt9Yfmc6nyjXrwgejh0fMmm9A6tEzKYonxI>

5 – <https://stemar.com.ua/vernedor-premium-dezinfikuiuchyi-zasib-1-l/>

6 – <https://newdental.com.ua/ua/p1896647485-famidez-endo.html?srsid=AfmBOooWAsmsxtlNHdsGvsAzMGKw7mGrWa3ENL9cnEhV-XPidPnbjkrQ>

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для синтезу лактобіонової кислоти

За даними літератури, штам *P. taetrolens* ATCC 4683 для синтезу лактобіонової кислоти культивують в поживному середовищі, що складається з таких компонентів, г/л [10]:

- Лактоза – 200;
- Яловичий екстракт – 1;
- Дріжджовий екстракт – 2;
- Пептон – 5;
- NaCl – 5;
- CaCO₃ – 30.

У свою чергу, поживне середовище для отримання інокуляту має такий склад, г/л [10]:

- Лактоза – 10;
- Яловичий екстракт – 1;
- Дріжджовий екстракт – 2;
- Пептон – 5;
- NaCl – 5;
- CaCO₃ – 30.

Стерилізація середовища для забезпечення культивування бактерій на качалці може проходити у відповідних колбах. Стерилізацію солей, що присутні в поживному середовищі, можна провести безпосередньо у ферментаційному обладнанні. Для інших компонентів необхідно підбирати колби або відповідні реактори з урахуванням їх обсягів на кожній із стадій.

5.4.1 Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці

З огляду на склад поживного середовища, у ньому містяться як солі, так і органічні компоненти, тому слід умовно розділити дане середовище на певні композиції:

Композиція А: лактоза, яловичий екстракт, дріжджовий екстракт, пептон (120 °С, під тиском 0,075-0,1 МПа впродовж 20-30 хв);

Композиція Б: NaCl, CaCO₃ (131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв);

Композиція В: CaCO₃ (131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв).

Таблиця 5.8

Розрахунок композицій поживного середовища для отримання посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 0,63 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Лактоза	10	6,3	А	500
Яловичий екстракт	1	0,63		
Дріжджовий екстракт	2	1,28		
Пептон	5	3,15		
Вода		500		
NaCl	5	3,15	Б	50
Вода		50		
CaCO ₃	30	18,9	В	80
Вода		80		
Разом:		630	-	630

Лактоза – це вуглеводовмісний компонент, що потребує найнижчої температури стерилізації для уникнення розкладання. Яловичий екстракт, дріжджовий екстракт та пептон містять у своєму складі чутливі до високих температур сполуки, такі як амінокислоти, вітаміни та ін. Тому для їх стерилізації підібрано відповідний режим.

Солі, що представляють композиції Б та В, будуть стерилізуватись за характерного для них режиму, причому карбонат кальцію потребує попереднього суспендування, зважаючи на його погану розчинність у воді, отже готувати та стерилізувати потрібно в окремій композиції. Наважки компонентів на даному етапі відважують на технічних вагах.

Композицію А слід готувати у колбі на 1 л, композицію Б – в окремій колбі на 100 мл, композицію В – в окремій колбі на 250 мл. Для внесення води слід підготувати мірні циліндри на 500 та 100 мл відповідно. Всі композиції стерилізують в автоклаві.

5.4.2. Підготовка і стерилізація поживного середовища інокуляту в посівних апаратах об'ємом 10, 100 та 1000 л

Поділ композицій для посівних апаратів не відрізняється від поділу для вирощування культури в колбах.

Композиція А: лактоза, яловичий екстракт, дріжджовий екстракт, пептон (120 °С, під тиском 0,075-0,1 МПа впродовж 20-30 хв);

Композиція Б: NaCl, CaCO₃ (131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв);

Композиція В: CaCO₃ (131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв).

Таблиця 5.9

Розрахунок композицій поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 10 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 6,6 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Лактоза	10	66	А	1
Яловичий екстракт	1	6,6		
Дріжджовий екстракт	2	13,2		
Пептон	5	33		
Вода		1		
NaCl	5	33	Б	0,1
Вода		0,1		
CaCO ₃	30	198	В	5,5
Конденсат		0,5		
Вода		5		
Разом:		6,6	-	6,6

Наважки компонентів на даному етапі відважують на технічних вагах.

Композицію А будемо готувати у колбі на 2 л. Для внесення води слід підготувати мірний циліндр на 1 л. Композицію стерилізують в автоклаві.

Солі, що представляють композиції Б та В, будуть стерилізуватись за характерного для них режиму, причому карбонат кальцію потребує попереднього суспендування, зважаючи на його погану розчинність у воді, отже готувати та стерилізувати потрібно в окремій композиції. Підготовка та стерилізація композиції Б буде проходити в колбі на 250 мл в автоклаві.

Підготовка та стерилізація композиції В буде проходити в інокуляторі на 10 л, воду питну будемо подавати по трубопроводу та контролювати її кількість за допомогою лічильника.

Таблиця 5.10

Розрахунок композицій поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 100 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 59,4 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Лактоза	10	594	А	10
Яловичий екстракт	1	59,4		
Дріжджовий екстракт	2	118,8		
Пептон	5	297		
Конденсат		0,9		
Вода		9,1		
NaCl	5	297	Б	0,5
Вода		0,5		
CaCO ₃	30	1 782	В	48,9
Конденсат		4,4		
Вода		44,5		
Разом:		59,4	-	59,4

Наважки компонентів на даному етапі відважують на технічних вагах.

Композицію А будемо готувати та стерилізувати реакторі обсягом 20 л. Воду питну будемо подавати по трубопроводу та контролювати її кількість за допомогою лічильника.

Солі, що представляють композиції Б та В, будуть стерилізуватись за характерного для них режиму, причому карбонат кальцію потребує попереднього суспендування, зважаючи на його погану розчинність у воді, отже готувати та стерилізувати потрібно в окремій композиції. Підготовка та стерилізація композиції Б буде проходити в колбі на 1 л в автоклаві. Підготовка та стерилізація композиції В буде проходити в інокуляторі на 100 л, воду питну будемо подавати по трубопроводу та контролювати її кількість за допомогою лічильника.

Таблиця 5.11

Розрахунок композицій поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 1000 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 600 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Лактоза	10	6	А	100
Яловичий екстракт	1	0,6		
Дріжджовий екстракт	2	1,2		
Пептон	5	3		
Конденсат		9,1		
Вода		90,9		
NaCl	5	3	Б	6
Конденсат		0,5		
Вода		5,5		
CaCO ₃	30	18	В	494
Конденсат		45		
Вода		449		
Разом:		600	-	600

Наважки компонентів композицій А та Б на даному етапі відважують за допомогою вагового дозатора.

Композицію А будемо готувати та стерилізувати реакторі обсягом 200 л. Воду питну будемо подавати по трубопроводу та контролювати її кількість за допомогою лічильника.

Солі, що представляють композиції Б та В, будуть стерилізуватись за характерного для них режиму, причому карбонат кальцію потребує попереднього суспендування, зважаючи на його погану розчинність у воді, отже готувати та стерилізувати потрібно в окремій композиції.

Підготовка та стерилізація композиції Б буде проходити в реакторі на 10 л. Підготовка та стерилізація композиції В буде проходити в інокуляторі на 1000 л, воду питну будемо подавати по трубопроводу та контролювати її кількість за допомогою лічильника.

5.4.3. Підготовка і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³

Поживне середовище для цієї стадії має значний обсяг, тому не будемо проводити поділ на композиції. Карбонат кальцію потребує попереднього суспендування, зважаючи на його погану розчинність у воді. Зазвичай такий об'єм поживного середовища готується в реакторі-витримувачі, після чого перекачується насосом та стерилізується в установці безперервної стерилізації.

Композиція А: лактоза, яловичий екстракт, дріжджовий екстракт, пептон, NaCl, CaCO₃ (режим стерилізації: 130°C, 7 хв, 0,15 МПа).

Таблиця 5.12

**Розрахунок композицій поживного середовища для отримання
посівного матеріалу у ферментері 10 м³**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 5,5 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Лактоза	200	1 100	А	5500
Яловичий екстракт	1	5,5		
Дріжджовий екстракт	2	11		
Пептон	5	27,5		
NaCl	5	27,5		
CaCO ₃	30	165		
Конденсат		500		
Вода		5000		
Разом:		5500	-	5500

У складі поживного середовища для виробничого біосинтезу є лактоза у концентрації 200 г/л. У випадку процесу біосинтезу при одночасному внесенні такої кількості джерела вуглецю відбувається катаболітна репресія. Але у даному випадку відбувається біотрансформація лактози у лактобіонову кислоту. Тому таку кількість лактози (200 г/л) можна одразу вносити у поживне середовище.

Для такого обсягу поживного середовища можна використати установку безперервної стерилізації УБС-10 об'ємом 10 м³. Наважки компонентів композиції на даному етапі відважують за допомогою вагового дозатора та вносять в реактор-витримувач об'ємом 6,3 м³. Воду питну будемо подавати по трубопроводу та контролювати її кількість за допомогою лічильника. Після приготування композиції її перекачують насосом до УБС-10. Після завершення стерилізації поживне середовище перекачують насосом до ферментера.

Підготовка титрувальних розчинів не передбачається, оскільки в процесі синтезу лактобіонової кислоти поживне середовище буде

самопідкислюватись і таким чином буде забезпечено необхідне значення рН.

Таким чином, технологічна схема отримання лактобіонової кислоти, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі додаткові стадії:

- підготовка аераційного повітря;
- приготування та стерилізація поживного середовища.

Також варто передбачити таке додаткове обладнання:

- для приготування та стерилізації композиції А: реактори об'ємом 20 та 200 л;
- для приготування та стерилізації композиції Б: реактор об'ємом 10 л;
- для приготування та стерилізації поживного середовища: реактор витримувач об'ємом 6,3 м³, УБС-10 об'ємом 10 м³.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки біосинтезу лактобіонової кислоти

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Пневматична система забору свіжого повітря. Усуває потребу в пиловловлювачах. Працює у замкнутому циклі, що виключає втрату кондиціонованого повітря з установки та запобігає виникненню умов негативного тиску без потреби в підживленні. Компанія: «AES» (США) [57]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубого очищення повітря ФЯР. Призначений для очищення припливного повітря від твердих часток та пилу з коефіцієнтом очищення не менше ніж 0,8. Фільтруючий елемент панельного типу виконаний із набору металевих сіток. Фільтри ФЯР мають опір потоку повітря 30 Н/м ² (3,0 кгс/м ²) або 30 Па. Компанія: «Люфтгранд» (Україна) [58]
К-3	Компресор	1	Промисловий гвинтовий компресор MAST SH50-16 VSD. Максимальний тиском 16 барів і продуктивність 4000 л/хв. Потужний, надійний і витривалий асинхронний двигун із мідною обмоткою та захистом IP55. Вбудований інвертор забезпечує заощадження електроенергії до 60% Компанія: «MAST» (Україна) [59]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Канальний фреоновий охолоджувач С-ФКО-60-30. Призначений для охолодження повітря в каналних системах кондиціонування і вентиляції. Теплообмінник фреоновий виготовлений з мідних трубок, розташованих у шаховому порядку, з алюмінієвим ребрами. В якості холодоагентів допустимо використання фреонів марки: R22, R407C, R410A. Компанія: «ССК ТМ» (Україна) [60]

					НУХТ БТЕК 04.03.16 КР ПЗ									
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання				Літ.		Арк.	Аркушів		
Розроб.		Зимовець Н.Ю.									77		4	
Перевір.		Скороцька О.І.												
Реценз.														
Н. Контр.														
Затверд.		Стабніков В.П.												
					Кафедра БТМ									

Продовження табл. 6.1

Р-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний об'ємом 8000 л. Максимально допустимий манометричний тиск 16 бар. Вертикальне виконання. Внутрішнє та зовнішнє цинкування за DIN EN ISO 1461. Компанія: «KAESER COMPRESSORS» (Німеччина) [61]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітронагрівач водяний ПНВ 113-Х03-01. В якості теплоносія використовується вода та гліколеві розчини. Витрата повітря 2 500 - 4 000 м³/год. Компанія: «ПРОМСТІЛ» (Україна) [62]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр стисненого повітря серії АФ. Автоматичний злив конденсату. Максимальний робочий тиск 16 бар. Максимальна робоча температура 65 ° С, мінімальна 1,5 ° С. Ступінь очищення 1 мкм. Продуктивність: 1,2-46,0 м³/хв. Компанія: «Comprag» (Німеччина) [63]
Д-8 Д-11 Д-14 Д-17 Д-20	Ваги технічні	5	Лабораторні ваги МТЛ, виготовлені та прийняті відповідно до вимог ДСТУ EN 45501:2017. Відповідність вимогам ДСТУ EN 45501 (метрологічні аспекти). Сертифікація за модулями В і F згідно з Технічним регламентом (Постанова КМУ №1062). Найбільша межа зважування 3000 г, найменша межа зважування – 5 г. Ціна поділки 0,01 г. Клас точності II. Матеріал платформи ваг – нержавіюча сталь. Компанія: «Ваговимірювальні системи» (Україна) [64]
Ф-9 Ф-15 Ф-24 Ф-30	Індивідуальний фільтр	4	Медичний фільтр для стисненого повітря. Максимальна температура 60°C. Максимальний робочий вакуум – повний вакуум. Ефективність видалення частинок 99,995%. Робочий вакуум 300 мбар(а), продуктивність 1000 л/хв. Матеріал виконання - високоефективне скловолокно та фліс. Компанія: «Atlas Copco» (Швеція) [65]

Продовження табл. 6.1

ІН-10	Інокулятор 10 л	1	Ферментер BR500-C1-10L для культивування культур клітин. Об'єм 10 л, виготовлений з нержавіючої сталі (SUS316L). Встановлені сенсори контролю розчиненого кисню, температури, тиску, рівня піни, значення рН. Швидкість подачі повітря 2 vvm. Розміри - 800×1800×800 мм. Встановлена мішалка з режимом роботи 50-1000 об/хв. Компанія: «Labfirst Scientific (LAB1ST)» (Китай) [66]
P-12	Реактор 20 л	1	Лабораторний реактор об'ємом 20 л РС-20.00.000 ПС. Мінімальна швидкість обертання мішалки обмежена діапазоном від 150 до 500 об/хв з плавним регулюванням. Матеріал сталь AISI 316 L та AISI 304. Габаритні розміри (довжина x ширина x висота) - 1085x 600 x1150 мм. Компанія: «Промвіт» (Україна) [67]
Н-13 Н-19 Н-22	Насос	3	Перистальтичний насос Boyser AMP-22. Модель AMP22A11 Продуктивність 339 л/год. Висота напору 8 м. Максимальна температура 80°C. Компанія: «North Ridge Pumps» (Англія) [68]
ІН-16	Інокулятор 100 л	1	Біореактор об'ємом 100 л моделі МК-FYF-1. Матеріал – нержавіюча сталь. Швидкість перемішування 30-180 об/хв. Обладнаний сорочкою. Розмір ємності 500 мм. Компанія: «Guangzhou Maikе Machinery Co., Ltd» (Китай) [69]
P-18	Реактор 200 л	1	Реактор РСДП-200 ВК об'ємом 200 л. Матеріали виготовлення: сталь AISI 316 L; фторопласт Ф-4 (тефлон), сталь AISI 304. Швидкість обертання мішалки 15-60 об/хв. Габаритні розміри - Н = 2100 (з піднятою кришкою – 2500); L = 1650. Компанія: «Промвіт» (Україна) [70]
P-21	Реактор 10 л	1	Нержавіючий реактор GRS-10 об'ємом 10 л. Матеріал – нержавіюча сталь S304 та S316L. Робоча температура -120~260°C. Швидкість перемішування 0-460 об/хв. Габаритні розміри 480*480*1560 мм. Компанія: «Zhengzhou Elab Instrument Co., Ltd» (Китай) [71]

Закінчення табл. 6.1

Д-23 Д-26	Дозатор ваговий	2	Напівавтоматичний ваговий дозатор ДВСВ. Дозволяє дозувати сипкі речовини дозами від 0,25 кг до 70 кг. Клас точності по ГОСТ 24619 – 0,1%. Ціна поділки 2,5 г. Компанія: «НВП "Політехнік"» (Україна) [72]
ІН-25	Інокулятор 1000 л	1	Ферментер BR500-C1 для культивування культур клітин. Об'єм 1000 л, виготовлений з нержавіючої сталі (SUS316L). Встановлені сенсори контролю розчиненого кисню, температури, тиску, рівня піни, значення рН. Швидкість подачі повітря 2 vvm. Співвідношення діаметру до висоти близько 1:2. Встановлена мішалка з режимом роботи 50-1000 об/хв. Компанія: «Labfirst Scientific (LAB1ST)» (Китай) [73]
Р-27	Реактор-виримувач 6,3 м ³	1	Реактор з нержавіючої сталі Stoecklin 6300 л. Робочий тиск 3,2 бар. Розміри ємності - 2000 мм на 3050 мм. Встановлений перемішувачий пристрій. Компанія: «Stoecklin» (Швейцарія) [74]
Н-28 Н-32	Насос	2	Відцентровий насос серії Wa+. Матеріал - нержавіюча сталь. Насос асептичний, з механічними ущільненнями. Максимальна продуктивність 666 л/хв. Температура рідини 95-150 °С. Компанія: «APV» (США) [75]
УБС-29	Установка безперервної стерилізації	1	Високотемпературний стерилізатор безперервної дії моделі HL-US. Розміри 3500*1700*2250 мм. Забезпечує ефективність стерилізації 99,9%. Компанія: «Zhengzhou Hongle Machinery Equipment Co., Ltd.» (Китай) [76]
ФР-31	Ферментер 10 м ³	1	Ферментер на 10 000 л. Габаритні розміри апарата становлять 2950x2200x2570 мм. Матеріал - нержавіюча сталь марки 316 або 304. Швидкість роботи перемішувача пристрою має здатність регулюватись в діапазоні 0-1450 об/хв. Компанія: «Foshan Tongguang Intelligent Equipment Manufacturing Co., Ltd.» (Китай) [40]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЛАКТОБІОНОВОЇ КИСЛОТИ

Технологічна схема одержання лактобіонової кислоти при вирощуванні біологічного агента *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683 передбачає допоміжні стадії (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес – вирощування посівного матеріалу та виробничий біосинтез цільової кислоти.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря проводять за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1), обирають найвищу точку Н = 30 м.

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

Попереднє очищення повітря проводять через фільтр грубого очищення ФЯР, що виконаний із набору металевих сіток (Ф-2). Ступінь очищення від грубих домішок становить $E = 60\%$.

ДР 1.3. Компресіювання повітря

Далі з метою забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини у ферментаційному обладнанні, інших опорів, а також для інших виробничих потреб, проводять стиснення повітря у компресорі (К-3), відбувається нагрівання до 120-200 °С, значення тиску становить 0,35 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря з компресора К-3 надходить на охолодження в теплообміннику (Т-4) до температури 25-30 °С для видалення надлишкової вологи, яку видаляють у ресивері (Р-5).

					НУХТ БТЕК 04.03.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми біосинтезу лактобіонової кислоти	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Зимовець Н.Ю.					81	8
Перевір.		Скороцька О.І.						
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Також в Р-5 проходить усунення пульсацій руху повітря, що можуть несприятливо впливати на роботу фільтрів очищення повітря, що встановлені далі по схемі. Значення вологості повітря на цій стадії становить близько 60-70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Через утворення конденсаційної пари на наступних етапах очищення повітря далі проводять його нагрівання. Повітря подають до теплообмінника-нагрівача Т-6. На виході температура повітря досягає 35°C. Під час надходження повітря на наступну стадію відбуваються втрати тепла, тому нагрівання проводять з розрахунку зниження температури повітря на наступних стадіях його підготовки.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Підігріте повітря надходить на головний фільтр очистки стисненого повітря серії АФ. Ступінь очищення 1 мкм ($E = 96 \%$).

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Зрештою повітря подають на фільтри стисненого повітря Ф-9, Ф-15, Ф-24, Ф-30. Матеріал виконання - високоефективне скловолокно та фліс. Індивідуальні фільтри встановлені безпосередньо перед інокуляторами та ферментером. Ефективність видалення частинок 99,995%.

ДР 2. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

ДР 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 6,3 г лактози, 0,63 г яловичого екстракту, 1,28 г дріжджового екстракту, 3,15 г пептону, переносять у колбу на 1 л, за допомогою мірного циліндра на 500 мл додають 500 мл дистильованої води, перемішують. Колбу із розчином закривають ватно-марлевым корком та проводять стерилізацію за температури 120 °C, під тиском 0,075-0,1 МПа впродовж 20-30 хв.

ДР 2.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 3,15 г NaCl, переносять у колбу на 100 мл, за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 50 мл дистильованої води. Після цього проводять ретельне перемішування композиції. Колбу із розчином закривають ватно-марлевым корком та проводять стерилізацію за температури 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 18,9 г CaCO₃, переносять у колбу на 250 мл, за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 80 мл дистильованої води. Після цього проводять ретельне суспендування композиції. Колбу із розчином закривають ватно-марлевым корком та проводять стерилізацію за температури 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.2. Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 10 л

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 66 г лактози, 6,6 г яловичого екстракту, 13,2 г дріжджового екстракту, 33 г пептону, переносять у колбу на 2 л, за допомогою мірного циліндра на 1 л вносять 1 л питної води, перемішують. Колбу із розчином закривають ватно-марлевым корком та проводять стерилізацію за температури 120 °С, під тиском 0,075-0,1 МПа впродовж 20-30 хв.

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 22 г NaCl, переносять у колбу на 250 мл, за допомогою мірного циліндра на 100 мл додають 100 мл дистильованої води. Після цього проводять ретельне перемішування композиції. Колбу із розчином закривають ватно-марлевым корком та проводять стерилізацію за температури 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах Д-8 зважують 198 г CaCO_3 , переносять в інокулятор обсягом 10 л ІН-10. По трубопроводу подають 5 л води питної. Підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух інокулятора й вмикають перемішуючий пристрій для ретельного суспендування композиції. Потім проводять стерилізацію за температури 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.3. Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 100 л

ДР 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах Д-11 зважують 594 г лактози, 59,4 г яловичого екстракту, 118,8 г дріжджового екстракту, 297 г пептону та переносять в реактор обсягом 20 л Р-12. По трубопроводу подають 9,1 л води питної. Підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух реактора й вмикають перемішуючий пристрій для повного розчинення компонентів. Потім проводять стерилізацію за температури 120 °С, під тиском 0,075-0,1 МПа впродовж 20-30 хв.

ДР 2.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 297 г NaCl , переносять у колбу на 1 л, за допомогою мірного циліндра на 500 мл додають 0,5 л дистильованої води. Після цього проводять ретельне перемішування композиції. Колбу із розчином закривають ватно-марлевым корком та проводять стерилізацію за температури 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах Д-14 зважують 1782 г CaCO_3 , переносять в інокулятор обсягом 100 л ІН-16. По трубопроводу подають 44,5 л води питної. Підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух інокулятора й вмикають перемішуючий пристрій для ретельного суспендування композиції. Потім проводять стерилізацію за температури 131 °С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.4. Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 1000 л

ДР 2.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах Д-17 зважують 6 кг лактози, 0,6 кг яловичого екстракту, 1,2 кг дріжджового екстракту, 3 кг пептону та переносять в реактор обсягом 200 л Р-18. По трубопроводу подають 90,9 л води питної. Підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух реактора й вмикають перемішуючий пристрій для повного розчинення компонентів. Потім проводять стерилізацію за температури 120 °С, під тиском 0,075-0,1 МПа впродовж 20-30 хв.

ДР 2.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах Д-20 зважують 3 кг NaCl, переносять в реактор Р-21 обсягом 10 л. По трубопроводу подають 5,5 л води питної. Підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух інокулятора й вмикають перемішуючий пристрій для ретельного перемішування композиції. Потім проводять стерилізацію за температури 131°С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

За допомогою вагового дозатора Д-23 зважують 18 кг CaCO₃, переносять в інокулятор обсягом 1000 л ІН-25. По трубопроводу подають 449 л води питної. Підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух інокулятора й вмикають перемішуючий пристрій для ретельного суспендування композиції. Потім проводять стерилізацію за температури 131°С, під тиском 0,15 МПа впродовж 40-60 хв.

ДР 2.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері 10 м³

ДР 2.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою вагового дозатора Д-26 зважують 1100 кг лактози, 5,5 кг яловичого екстракту, 11 кг дріжджового екстракту, 27,5 кг пептону, 27,5 кг NaCl та 165 кг CaCO₃, після чого переносять в реактор-витримувач Р-27.

По трубопроводу подають 5000 л води питної. Підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух реактора й вмикають перемішуючий пристрій для повного розчинення.

Насосом Н-28 перекачують композицію до УБС-29. Далі в установці безперервної стерилізації УБС-29 проводять стерилізацію за температури 130°C, під тиском 0,15 МПа впродовж 5-7 хв.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури Pseudomonas taetrolens ATCC 4683

Колекційну культуру штаму *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683 зберігають у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА) за температури 2-8°C, здійснюють пересіви кожні 3-4 місяці. При роботі з колекційною культурою забезпечуються строго асептичні умови.

ТП 3.2. Отримання робочої культури Pseudomonas taetrolens ATCC 4683

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з середовищем МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з агаризованим середовищем МПА в асептичних умовах. Проводять вирощування протягом 24 год за температури 25-26°C.

ТП 3.3. Вирощування Pseudomonas taetrolens ATCC 4683 на агаризованих середовищах

Мікробіологічною петлею пересівають ізольовані колонії на пробірки зі скошеним середовищем МПА із розрахунку одна ізольована колонія на одну пробірку. Вирощування робочої культури здійснюють у пробірках при 25-26°C протягом 24 год.

ТП 3.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу об'ємом 1 л із композицією А (від ДР 2.1.1) в асептичних умовах вносять композицію Б (від ДР 2.1.2) та композицію В (від ДР 2.1.3). Поживне середовище перемішують і розливають по 157 мл у 4 стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірки з *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683 (від ТП 3.3) вносять по 15 мл фізіологічного розчину, суспендують та вносять у колби з поживним середовищем. Культивування клітин продуцента проводять у колбах на качалці при швидкості перемішування 200 об/хв, температурі 25°C протягом 24 год.

В кінці культивування відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 3.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 10 л

В інокулятор обсягом 10 л ІН-10 з композицією В (від ДР 2.2.3) в асептичних умовах подають композицію А (від ДР 2.2.1) та композицію Б (від ДР 2.2.2). Через засівну колбу подають посівний матеріал від ТП 3.4, вмикають перемішувач, подають аераційне повітря та пару у кожух посівного апарату.

Культивування проводять 24 год за температури 25 °С, рН 6,0, рівня розчиненого кисню 30% (подаючи повітря через індивідуальний фільтр Ф-9) та перемішування 200 об/хв.

Кожні 3-4 години відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 3.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 100 л

В інокулятор обсягом 100 л ІН-16 з композицією В (від ДР 2.3.3) за допомогою насоса Н-13 перекачують композицію А (від ДР 2.3.1) з реактора Р-12 та подають в асептичних умовах композицію Б (від ДР 2.3.2) відповідно. Через трубу перетискування подають посівний матеріал від ТП 3.5, вмикають перемішувач, подають аераційне повітря та пару у кожух посівного апарату.

Культивування проводять 24 год за температури 25 °С, рН 6,0, рівня розчиненого кисню 30% (подаючи повітря через індивідуальний фільтр Ф-15) та перемішування 200 об/хв.

Кожні 3-4 години відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 3.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 1000 л

В інокулятор обсягом 1000 л ІН-22 з композицією В (від ДР 2.4.3) за допомогою насоса Н-19 перекачують композицію А (від ДР 2.4.1) з реактора Р-18 та насосом Н-22 перекачують композицію Б (від ДР 2.4.2) відповідно. Через трубу перетискування подають посівний матеріал від ТП 3.6, вмикають перемішувач, подають аераційне повітря та пару у кожух посівного апарату.

Культивування проводять 24 год за температури 25 °С, рН 6,0, рівня розчиненого кисню 30% (подаючи повітря через індивідуальний фільтр Ф-24) та перемішування 200 об/хв.

Кожні 3-4 години відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4. Біосинтез

ТП 4.1. Виробниче культивування у ферментері 10 м³

У ферментер обсягом 10 м³ ФР-31 подають простерилізоване поживне середовище з УБС-29 (від ДР 2.5.1). Через трубу перетискування подають посівний матеріал від ТП 3.7, вмикають перемішувач, подають аераційне повітря та пару у кожух посівного апарату.

Біосинтез проводять 48 год за температури 25 °С, рН 6,0, рівня розчиненого кисню 30% (подаючи повітря через індивідуальний фільтр Ф-30) та перемішування 200 об/хв.

Біосинтез закінчують при досягненні рівня лактобіонової кислоти $C_{\text{лк}}$ = 178 г/л. Після цього культуральна рідина насосом Н-32 передається на зберігання до наступних стадій отримання цільового продукту.

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛАКТОБІОНОВОЇ КИСЛОТИ

Лактобіонова кислота належить до групи біонічних кислот і складається з молекули галактози, з'єднаної з молекулою глюконової кислоти. Лактобіонова кислота знайшла застосування в багатьох галузях промисловості, таких як медицина, фармацевтика та косметика, завдяки своїм зволожуючим, хелатним, антиоксидантним, консервуючим і регенеруючим властивостям [77].

Лактобіонову кислоту отримують окисленням лактози. У промислових масштабах лактобіонову кислоту отримують шляхом хімічного окислення, яке є дорогим і шкідливим для навколишнього середовища.

Вирішення цієї ситуації полягає у виробництві лактобіонової кислоти мікробним шляхом ферментативного окислення лактози за допомогою мікроорганізмів роду *Pseudomonas* sp. Численні дослідження підтверджують, що виробництво лактобіонової кислоти за допомогою бактерій *Pseudomonas taetrolens* призводить до високих рівнів синтезу даної кислоти.

Такий побічний продукт молочної промисловості як сироватка все частіше використовується як джерело лактози для виробництва лактобіонової кислоти. Таким чином, мікробне виробництво лактобіонової кислоти *Pseudomonas taetrolens* з відповідними умовами навколишнього середовища (рН, температура, аерація, концентрація посівного матеріалу) є економічно ефективним методом отримання такої промислово цінної кислоти [77].

					НУХТ БТЕК 04.03.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення лактобіонової кислоти	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Зимовець Н.Ю.					89	4
Перевір.		Скороцька О.І.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Центрифугування

Після виробничого біосинтезу проводять центрифугування культуральної рідини протягом 10 хвилин при 15 000 об/хв для видалення біомаси та інших нерозчинних у воді речовин (наприклад, компонентів поживного середовища) [79].

Обробка активованим вугіллям

Після центрифугування проводять обробку отриманого супернатанту активованим вугіллям (Norit GAC 1240, Амерсфорт, Нідерланди [78]). Після обробки зразки центрифугували протягом 10 хв при 15000 об/хв для видалення активованого вугілля.

Мікрофільтрація

Далі супернатант піддають мікрофільтрації за допомогою установки тангенціальної мікрофільтрації з мембранною касетою з полівініліденфториду (PVDF) (площа мембрани 0,5 м², касета Pellicon 2) з розміром пор 0,22 мкм, трансмембранний тиск становить $1,4 \pm 0,1$ бар, процес проходить без рециркуляції.

Концентрування

Після мікрофільтрації отриманий розчин концентрують у вакуум-випарній установці до досягнення концентрації сухих речовин близько 40%. Процес проводять при температурі 50 °C під тиском від 40 до 85 мбар. Концентрацію зразка визначають за допомогою рефрактометра.

Промивання та осадження лактобіонової кислоти

Отриманий осад промивають 96% (об./об.) етанолом. Після промивання зразок центрифугують при 10000 об/хв протягом 10 хв для осадження лактобіонової кислоти. Розчинник, що залишився, зливають, а осаджену лактобіонову кислоту кристалізують.

Кристалізація

Лактобіонову кислоту кристалізують в кристалізаторі при температурі +40°C протягом 24–72 год.

Ліофілізаційне сушіння

Кристалізовану лактобіонову кислоту поміщають в ліофільну сушарку для заморожування при температурі -18°C протягом 24 годин. Проводять висушування замороженої лактобіонової кислоти до порошкоподібного стану у ліофільній сушарці при температурі -65°C [79].

Після цього фасують субстанцію лактобіонової кислоти. Лактобіонова кислота (CAS 96-82-2) у промислових масштабах зазвичай постачається у великих об'ємах, таких як 5 кг, 25 кг або 50 кг, залежно від потреб виробництва.

Види промислового пакування лактобіонової кислоти

1. Пластикові відра (Poly Pail) по 5 кг

Приклад: Spectrum Chemical випускає лактобіонову кислоту фармацевтичної якості (EP, 98–102%), що пакується у поліетиленові відра по 5 кг [80].

2. Поліетиленові мішки по 25 кг

Приклад: Lanhai Industry випускає лактобіонову кислоту, упаковану у поліетиленові мішки по 25 кг [81].

3. HDPE-мішки з додатковим внутрішнім вкладишем

Приклад: Mubyschem випускає лактобіонову кислоту у HDPE-мішках з додатковим внутрішнім вкладишем, вагою 25 кг або 50 кг [82].

Отже, будемо фасувати лактобіонову кислоту власного виробництва у мішки по 5, 25 та 50 кг.

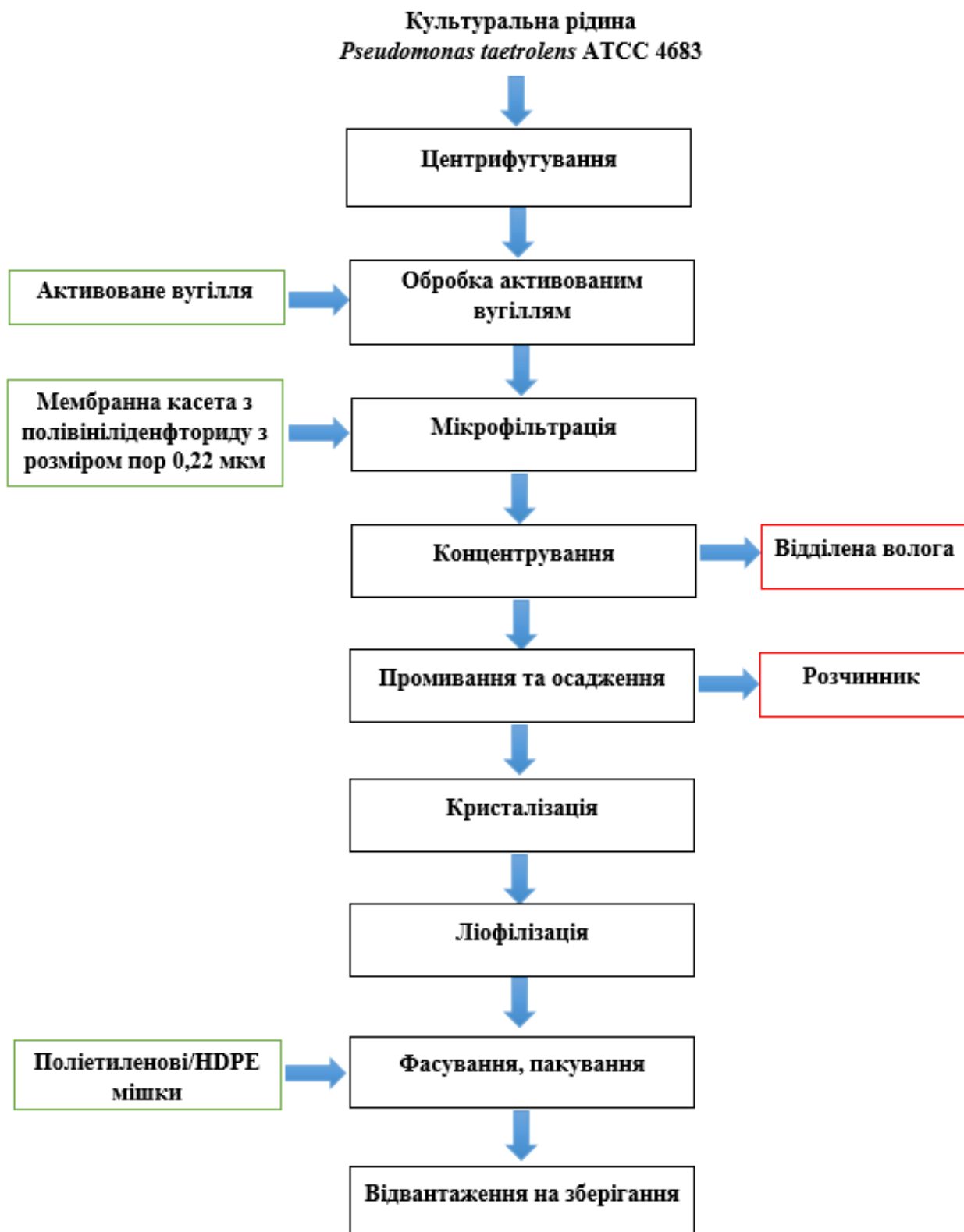


Рис. 8.1. Загальна схема одержання субстанції лактобіонової кислоти.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЛАКТОБІОНОВОЇ КИСЛОТИ

9.1. Мікробіологічний контроль

Перевірка стерильності поживних середовищ

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ проводять шляхом розсівання близько 50 мл об'єму поживного середовища, що попередньо простерилізоване, чи стерильного зразка певної композиції живильного середовища, на чашки Петрі з поживним агаром – так, з метою виявлення грибів використовують сусло-агар (СА), а для встановлення наявності бактерій м'ясо-пептонний агар (МПА) [83].

Підготовка чашок Петрі. Здійснюють стерилізацію чашок Петрі у сухожаровій шафі. Готують водяну баню, доводять воду до кипіння та розплавляють поживне середовище шляхом занурення ємності до водяної бані. У попередньо підготовані чашки Петрі в асептичних умовах поміщають по 20-30 мл розплавленого середовища. Розміщують чашки на рівній поверхні кришками донизу для рівномірного застигання середовища та інкубують протягом 2-3 дію за температури 30 °С [83].

Виконання посівів. Стерильною піпеткою відбирають пробу 0,1 мл з простерилізованого поживного середовища чи певної стерильної композиції. Наносять відібрану пробу на поверхню відповідного поживного агару. Використовуючи стерильну бактеріологічну петлю або стерильний шпатель Дригальського рівномірно розподіляють пробу по поверхні середовища. Загортають чашки з посівами у папір та поміщають в термостат для витримування за температури 24-26 °С впродовж 3-5 діб у випадку використання середовища СА та за температури 32-34 °С протягом 1-2 діб для виявлення бактерій на МПА. Посіви аналізують після 6-8 годин інкубації [83].

					НУХТ БТЕК 04.03.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва лактобіонової кислоти	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Зимовець Н.Ю.					93	8
Перевір.		Скороцька О.І.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

На поверхні поживних середовищ візуально встановлюють відсутність ознак росту мікроорганізмів, що засвідчує їх стерильність.

Перевірка чистоти культури

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу та культуральної рідини проводять двома способами, що включають прямий висів на поживний агар і мікроскопіювання [83].

Прямий висів на агар. Аналіз проводять розсіванням проби інокуляту чи культуральної рідини до ізольованих колоній методом виснажувального штриха на чашки Петрі з поживним середовищем NB.

Мікроскопування. Далі здійснюють мікроскопіювання з окремих колоній, що з'явилися на агарі після інкубування. Мікроскопують використанням світлового мікроскопу з імерсією. В асептичних умовах на чисте знежирене предметне скло за допомогою стерильної петлі наносять краплю проби посівного матеріалу чи культуральної рідини. Розподіляють досліджувану краплю по склу бактеріологічною петлею до досягнення діаметру мазка близько 1 см. Без нагрівання висушують мазок до повного випаровування вологи. Далі на підготовлений сухий препарат скляною паличкою наносять 1-2 краплини імерсійної олії. По закінченню всіх робіт ватним тампоном, змоченим в етиловому спирті, видаляють залишки олії з імерсійного об'єктива [83].

В результаті мікроскопування відмічають клітини біологічного агента *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683.

Колонії круглі, злегка підняті, гладкі, цільні, внутрішньої структури аморфної форми. Щільне поживне середовище: рясний ріст, коричневий колір, середньо затемнені. Грамнегативні, неспорогенні, короткі палички із закругленими кінцями, зустрічаються поодинокі, парами та короткими ланцюжками. Виявляють рухливість, мають від одного до п'яти полярних джгутиків [84].

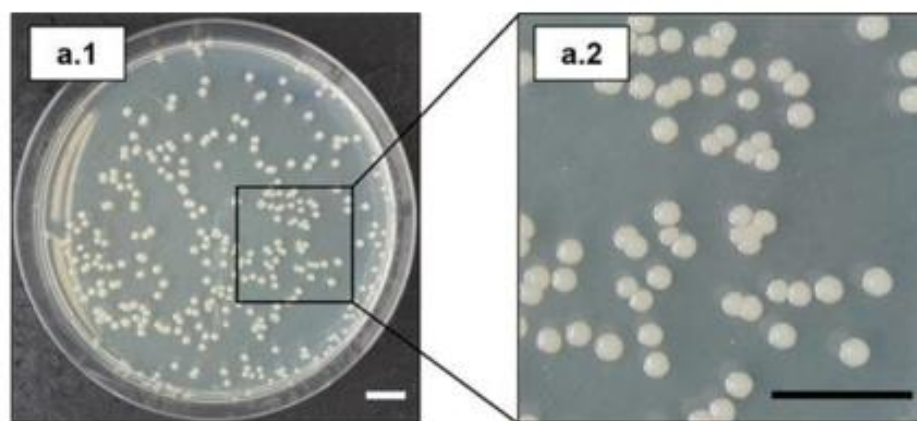


Рис. 9.1. Колонії *P. taetrolens* на агаризованому середовищі NB [85].

9.2. Визначення концентрації лактобіонової кислоти

В роботі [10] зазначено, що концентрацію лактобіонової кислоти після культивування штаму *P. taetrolens* ATCC 4683 вимірювали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Зразки для аналізу ВЕРХ готували після центрифугування культуральної рідини при 15000 об/хв протягом 3 хв і наступної мембранної фільтрації, використовуючи гідрофільний мембранний фільтр з розміром пор 0,2 мкм.

Зразки безклітинного фільтрату розбавляли у 100 разів дистильованою водою, а потім використовували для аналізу. Для аналізу ВЕРХ використовували RID-детектор (Agilent 1260 RID, США), оснащений колонкою ICSep ICE-ION-300 (Transgenomic Inc., США). Як рухому фазу використовували 0,5 мМ розчин H_2SO_4 . Швидкість потоку встановлювали на рівні 0,3 мл/хв, а температура колонки становила 75 °C [10].

Обладнання для проведення аналізу має наступний вигляд (рис. 9.2.).



Рис. 9.2. Рідинний хроматограф Agilent 1260 Infinity II LC [86].

Технічні характеристики:

- 1) Можливість встановлення 4 колонок.
- 2) Глибина - 468 мм
- 3) Діапазон швидкості потоку – від 0,05 до 5 мл/хв (G7112B) та від 0,2 до 10 мл/хв (G7110B, G7111A, G7111B).
- 4) Діапазон інжекції:
 - Від 0,1 до 100 мкл
 - Від 0,1 до 900 мкл з опцією розширеного діапазону введення
 - Від 0,1 до 1800 мкл із набором Multi Draw Kit
- 5) Лінійна напруга – 100-240 В змінного струму
- 6) Максимальна кількість розчинників – від 4 до 15 з додатковим клапаном вибору розчинника
- 7) Максимальна кількість температурних зон – 2
- 8) Робочий діапазон тиску в системі - до 600 бар [86].

Трансгеномна колонка ICSep ICE-ION-300 — це високопродуктивна колонка, призначена для розділення різноманітних органічних сполук, включаючи органічні кислоти, вуглеводи та деякі спирти [87].

9.3. Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в даному поживному середовищі є лактоза.

Кількість лактози в зразках визначають методом ВЕРХ [88].

Пробу обсягом 1 мл центрифугували при 13000 об/хв протягом 10 хв. Прозору фракцію фільтрували через нейлоновий мембранний фільтр 0,2 мкм і вводили в систему ВЕРХ (Alliance 2690/5: Waters Corporation, Мілфорд, Каліфорнія), обладнану колонкою Agilent Zorbax Carbohydrate Analysis розмірами 4,6 мм × 150 мм (Agilent Technologies Inc., США). Використовувана рухома фаза представлена 75% (об./об.) ацетонітрилом (Fisher, HPLC grade). Швидкість потоку встановлюють на рівні 1,4 мл/хв, аналіз проводять при температурі 30°C з використанням детектора показника заломлення (RI-1371, Waters Corporation, Мілфорд, Каліфорнія) [88].

9.4. Визначення концентрації джерела азоту

У використовуваному для біосинтезу лактобіонової кислоти середовищі азот представлений органічними речовинами (яловичий екстракт, дріжджовий екстракт, пептон).

Для визначення органічного азоту можна використати метод, представлений в роботі [89], що стосується хроматографічного визначення азоту в органічних сполуках за допомогою аналітичної установки, що складається з газового хроматографа, оснащеного детектором теплопровідності, та піролізної установки власної конструкції. Принцип визначення ґрунтується на попередньому спалюванні/деградації досліджуваних зразків до оксидів азоту, їх подальшому відновленні до молекулярного азоту та кінцевому визначенні за допомогою газової хроматографії (GC-TCD). Аналітична процедура, за винятком ручного зважування проб, повністю автоматизована. Згідно експериментальних даних, для зразків масою від 0,5 до 4 мг час визначення становив приблизно 3 хв.

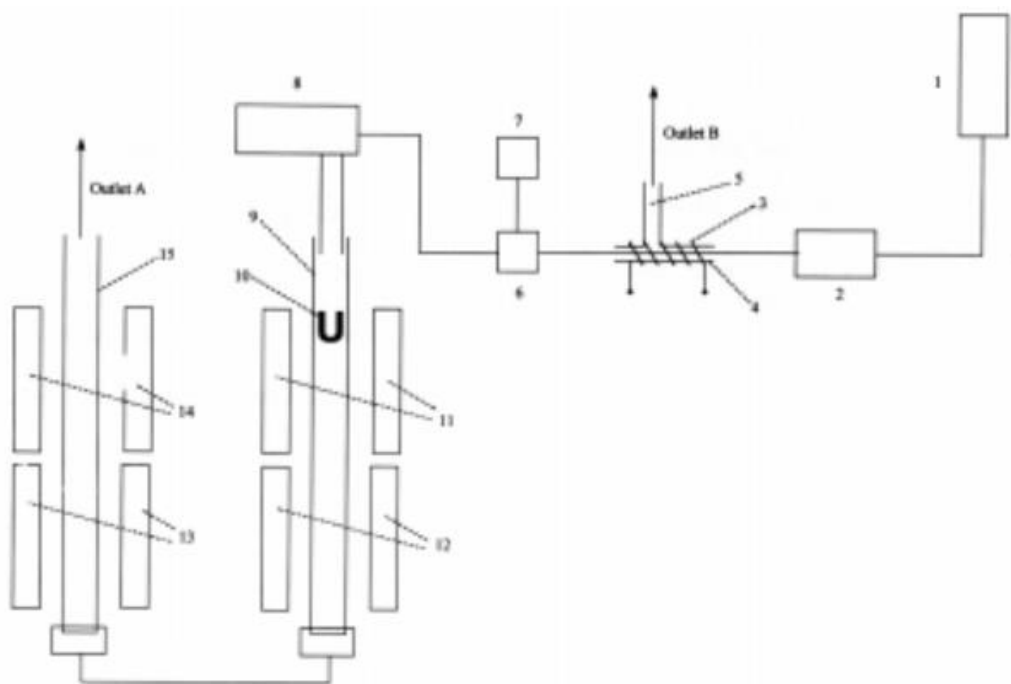


Рис. 9.3. Схема піролізної установки [89]:

1 - балон з гелієм; 2 - система очищення гелію (активоване вугілля, молекулярні сита, мідна вата); 3 - нагрівальний дріт; 4 - пробірка з кремнеземом; 5 - вихід гелію (вхід в опорну колонку); 6, 7 - манометри з регулюючим вентилем; 8 - автоматичний дозатор; 9 - мінералізаційна трубка; 10 - перфорована кварцова трубка; 11, 14 - нагрівальні системи; 15 - редукційна трубка з виходом (вхід в хроматографічну колонку).

Визначення молекулярного азоту проводять на газовому хроматографі Chrom-4 (Kovo, CSSR), оснащеному детектором теплопровідності (TCD) і хроматографічною колонкою (латунь: 2,5 м × 6,5 мм внутрішній діаметр), заповненою Porapak QS (50/80 mesh). Газовий хроматограф з'єднаний з установкою піролізу та інтегратором DP88 (Pye Unicam).

Пробу культуральної рідини центрифугують при 13000 об/хв протягом 10 хв. Отриманий супернатант піддають подальшому визначенню азоту.

Зразки масою 4 мг зважують в ємності з алюмінієвої фольги (0,01 мм), вкритої окислювачем (Co_3O_4) і поміщають за допомогою автоматичного дозатора в мінералізаційну трубку піролізної установки.

Тут при температурі приблизно 950° окислювач виділяє кисень, який у свою чергу окислює досліджувані речовини з виділенням летючих продуктів комбінованих процесів піролізу та горіння. Утворені газоподібні продукти пропускають в потоці газу-носія (He) через реактивне заповнення трубки, що складається з шарів реагентів, упакованих у такому порядку: CuO-CeO₂-CuO-Cu-Ag(волокно)-Cu відповідно [89].

Цей прохід забезпечує повну конверсію азотовмісних газових продуктів горіння в оксиди азоту (NO_n) в зоні окислення (шари CuO/CeO₂ або CuO/CeO₂/WO₃) реакційного заповнення, що кількісно перетворюється на молекулярний азот (NO_n в N₂) у його відновній частині (шари Cu/Ag/Cu). Остаточна сформована газова суміш, що складається з азоту, вуглекислого газу та водяної пари (надлишок кисню, що утворився з окислювача, видалявся на шарах Cu), послідовно звільняється від CO₂ і H₂O на шарі аскариту, а потім вводиться в хроматографічну систему.

Для калібрувальної кривої як зразок порівняння застосовують альбумін з відомою концентрацією азоту.

Описаний метод пропонує швидку процедуру визначення азоту за простої пробопідготовки та низької маси проби. Такі властивості методу як хороша повторюваність, можливість аналізу невеликих зразків та короткий час усієї аналітичної процедури, роблять цей аналізатор корисним інструментом для визначення азоту в органічних зразках. Проста збірка, обумовлена методом подачі кисню в процес горіння (твердий Co₃O₄ замість системи регульованого потоку газоподібного кисню, який зазвичай вводиться в реакцію у великому надлишку), гарантує високу надійність та точність проведення визначення [89].

9.5. Визначення концентрації біомаси

Кількість біомаси визначають ваговим способом [90].

Попередньо зважують центрифужну пробірку. У зважену центрифужну пробірку наливають 5 мл ретельно перемішаної суспензійної культури. Зважують пробірку з культуральною рідиною. Проводять

центрифугування на центрифугі при швидкості обертів 3000 об/хв. протягом 15 хв. Фугат зливають.

Осад промивають підкисленою водою і пробірки знову центрифугують протягом 10 хв при швидкості обертів 3000 об/хв [90].

Потім вагу біомаси визначають за формулою:

$$M = \frac{(A-B)1000}{V}, \text{ де}$$

M – суха біомаса в г/л;

A – маса центрифужної пробірки з осадом, г;

B – маса центрифужної пробірки без осаду, г;

V – об'єм культуральної рідини, відібраний для центрифугування [90].

ЛИТЕРАТУРА

1. Sarenkova, Inga & Ciprova, Inga. (2018). The current status and future perspectives of lactobionic acid production: a review. *Res. Rural Dev.* 233-239. 10.22616/rrd.24.2018.037.
2. Lactobionic acid [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactobionic-acid#section=Structures> .
3. CHEBI:55481 - lactobionic acid [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:55481>.
4. Shendurse, A. M., & Khedkar, C. D. (2016). *Lactose. Encyclopedia of Food and Health*, 509–516. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00415-3.
5. Alonso, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2013). Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1275–1291. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.04.
6. Itoh T., Suzuki K. -i., Sanchez P. C., Nakase T. *Caldivirga maquilensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999, 49(3): 1157–1163. doi:10.1099/00207713-49-3-1157
7. Cardoso T., Marques C., Dagostin J. L. A., Masson M. L. Lactobionic Acid as a Potential Food Ingredient: Recent Studies and Applications. *Journal of Food Science*. 2019. doi:10.1111/1750-3841.14686
8. Sarenkova I., Sáez-Orviz S., Ciprova I. Lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens* in a fed-batch bioreactor using acid whey as substrate. *International Journal of Dairy Technology*. 2022, 75(2): 361-371. doi: 10.1111/1471-0307.12841
9. Alonso S., Rendueles M., Díaz M. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresource Technology*. 2015, 196, 314–323. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.092

10. Kim J.-H., Jang Y.-A., Seong S.-B., Jang S. A. High-level production and high-yield recovery of lactobionic acid by the control of pH and temperature in fermentation of *Pseudomonas taetrolens*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2020. doi:10.1007/s00449-020-02290-z.
11. CHROMagar™ *Pseudomonas* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.chromagar.com/en/product/chromagar-pseudomonas/>
12. *Pseudomonas taetrolens (graveolens)* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://tgw1916.net/Pseudomonas/taetrolens.html>
13. García, C., Rendueles, M., & Díaz, M. (2017). Microbial amensalism in *Lactobacillus casei* and *Pseudomonas taetrolens* mixed culture. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40(7), 1111–1122. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1773-3>.
14. LYSENKO O. (1961). *Pseudomonas*--an attempt at a general classification. *Journal of general microbiology*, 25, 379–408. <https://doi.org/10.1099/00221287-25-3-379>.
15. Strain identifier. *Pseudomonas taetrolens* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://bacdive.dsmz.de/strain/13148> .
16. Knaggs, H., & Lephart, E. D. (2023). Enhancing Skin Anti-Aging through Healthy Lifestyle Factors. *Cosmetics*, 10(5), 142. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10050142>.
17. Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2012). Skin anti-aging strategies. *Dermato-endocrinology*, 4(3), 308–319. <https://doi.org/10.4161/derm.22804>.
18. Sadowski, G., & Sadowski, J. (2020). Safety and Efficacy of a Novel Antiaging Skin Care Regimen Containing Neutraceuticals and Growth Factors on the Facial Skin of Women: A 12-Week Open-label Study. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 13(6), 24–34.
19. Ahmed, Idris & Mikail, Maryam & Zamakshshari, Norhisam & Abdullah, Al-Shwyeh. (2020). Natural anti-aging skincare: role and potential. *Biogerontology*. 21. 10.1007/s10522-020-09865-z.

20. Griffiths, T. W., Watson, R. E. B., & Langton, A. K. (2023). Skin ageing and topical rejuvenation strategies. *The British journal of dermatology*, 189(Suppl 1), i17–i23. <https://doi.org/10.1093/bjd/ljad282>
21. He, X., Wan, F., Su, W., & Xie, W. (2023). Research Progress on Skin Aging and Active Ingredients. *Molecules*, 28(14), 5556. <https://doi.org/10.3390/molecules28145556>.
22. Gentili, G., Perugini, P., Bugliaro, S., & D'Antonio, C. (2023). Efficacy and safety of a new peeling formulated with a pool of PHAs for the treatment of all skin types, even sensitive. *Journal of cosmetic dermatology*, 22(2), 517–528. <https://doi.org/10.1111/jocd.15215>.
23. Algiert-Zielińska, B., Mucha, P., & Rotsztein, H. (2019). Lactic and lactobionic acids as typically moisturizing compounds. *International journal of dermatology*, 58(3), 374–379. <https://doi.org/10.1111/ijd.14202>
24. Tasić-Kostov, M., Lukić, M., & Savić, S. (2019). A 10% Lactobionic acid-containing moisturizer reduces skin surface pH without irritation-An in vivo/in vitro study. *Journal of cosmetic dermatology*, 18(6), 1705–1710. <https://doi.org/10.1111/jocd.12908>.
25. Tasic-Kostov, M., Pavlovic, D., Lukic, M., Jaksic, I., Arsic, I., & Savic, S. (2012). Lactobionic acid as antioxidant and moisturizing active in alkyl polyglucoside-based topical emulsions: the colloidal structure, stability and efficacy evaluation. *International journal of cosmetic science*, 34(5), 424–434. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2012.00732.x>.
26. Algiert-Zielińska, B., Mucha, P., & Rotsztein, H. (2018). Comparative evaluation of skin moisture after topical application of 10% and 30% lactobionic acid. *Journal of cosmetic dermatology*, 17(6), 1096–1100. <https://doi.org/10.1111/jocd.12485>.
27. Демограф сказав, скільки в Україні проживає людей [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ua.korrespondent.net/ukraine/4743129-demohraf-skazav-skilky-v-ukraini-prozhyvae->

[luidei#:~:text=%D0%92%20%D0%A3%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%D1%96%20%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%BC%20%D0%BD%D0%B0%202024,%D0%93%D0%BB%D0%B0%D0%B4%D1%83%D0%BD%20%D0%B2%20%D1%96%D0%BD%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B2%CA%BC%D1%8E%20%D0%A3%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%D1%81%D1%8C%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D1%83%20%D1%80%D0%B0%D0%B4%D1%96%D0%BE.](#)

28. Державна служба статистики України [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ukrstat.gov.ua/>.

29. 40% Мигдальна + Лактобіонова + Молочна к-ти [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://guber.if.ua/chemical-peels/%D0%B0lmond-laktobionova-acid/>

30. З початку року жінки відкрили понад 43 тисячі ФОПів — рекорд за останні роки [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://suspilne.media/749551-z-pocatku-roku-zinki-vidkrili-ponad-43-tisaci-fopiv-rekord-za-ostanni-roki/#:~:text=2021%D1%80%D1%96%D0%BA%20%E2%80%94%2049%25%20%D1%87%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D1%96%D0%BA%D1%96%D0%B2%2C,%2C%2058%2C8%25%20%D0%B6%D1%96%D0%BD%D0%BE%D0%BA>.

31. Лактобіоновий пілінг 50% 30 мл [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cocos.od.ua/offer/laktobionoviyi-piling-50-30-ml-o1300/?srsltid=AfmBOoqzs6rFZl-4bYDdcOl1pU1rveUTSaWQpST9UBfngQMM3S6xOuq1#tab=1>

32. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.

33. Galactose metabolism - Reference pathway - *Pseudomonas taetrolens*
[Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://www.genome.jp/pathway/map00052> .

34. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. — 2- е вид., доп . і перероб. — К.: НУХТ, 2010.-63 2 с.

35. Glycolysis / Gluconeogenesis - Reference pathway - *Pseudomonas taetrolens*
[Електронний ресурс] Режим доступу:<https://www.genome.jp/pathway/map00010> .

36. Gutiérrez, L.-F., Hamoudi, S., & Belkacemi, K. (2012). *Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. International Dairy Journal*, 26(2), 103–111. doi:10.1016/j.idairyj.2012.05.003

37. Технічна мікробіологія: практикум для здобувачів вищої освіти / В.В. Євлаш, Л.В. Газзаві-Рогозіна, А.С. Бикова, О.В. Циганков – Х. : НТУ «ХП», ХДУХТ, 2019. – 180 с.

38. Процеси і апарати біотехнологічного виробництва [Електронний ресурс] : метод. реком. до виконання практичних робіт для здобувачів ступеня вищої освіти Бакалавр" напряму 6.051401 "Біотехнологія" денної форми навчання / уклад. : А. С. Пастушенко, М. С. Храмов, О. І. Норинський. — Електрон. текст. дан. – Миколаїв : МНАУ, 2016. – 49 с.

39. Методичні вказівки до практичних занять з дисципліни «Основи проектування» для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»/ Укладач: Гуляєв В.М. - Кам'янське: ДДТУ, 2019 р. – 71 с.

40. 10m3 Reactor processing Acrylic emulsion resin with vertical or horizontal condenser reactor. Електронний ресурс [Режим доступу]:
https://www.alibaba.com/product-detail/10m3-Reactor-processing-Acrylic-emulsion-resin_1600538208994.html.

41. Карлаш Ю.В., Красінко В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс: Навч. посібник. – К.:НУХТ, 2022. –373 с.

42. Онищенко В.О. Засіб кислотний для миття та дезінфекції доїльних апаратів методом безрозбірної циркуляційної мийки / В.О. Онищенко, Д.О. Стороженко, Н.Б. Сененко, Н.В. Бунякіна // Вчені записки Таврійського національного університету імені В.І.Вернадського. Серія: Технічні науки. – 2018. – Т. 29 (68), №1, ч.2. – С. 170-175.

43. DR CIP ACID Кислотний безпінний засіб [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://impextrade.com.ua/product/dr-cip-acid/>

44. Кислотний засіб для очищення від накипу Diversey Super Dilac VA4, 20 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://bs24.com.ua/catalog/profesiyna_khimiya/zasoby_ochyshchennya_dlya_v_yrobnytstva/kislotniy-zasib-dlya-ochishchennya-vid-nakipu-diversey-super-dilac-va4-20-l/?srsltid=AfmBOor-k7z96j_uLLKckDXztdzdLA-CqEh1lhjj90fTU_rk9NVuvaez

45. Chemipon LP 100 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://klineko.com.ua/shhelochnye-sredstva/chemipon-lp-100/>

46. HC-CL 45 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://klineko.com.ua/shhelochnye-sredstva/hc-cl-45/>

47. ПОСТАНОВА від 15 серпня 2023 р. № 863 Київ Про затвердження Положення про державну реєстрацію дезінфекційних засобів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/863-2023-%D0%BF#Text>

48. Безпечні професійні засоби для миття та дезінфекції від ПП «Гігієнікс» [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://harch.tech/2021/05/25/higienix_haccp/

49. Методи дезінфекції [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/press/metody-dezinfektsii.html>

50. Профілактична дезінфекція на робочих місцях [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://oppb.com.ua/news/profilaktychna-dezinfekciya-na-robochyh-miscyah>

51. Настанова "Лікарські засоби. Належна виробнича практика. СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2020/05/%D0%9D%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%A1%D0%A2-%D0%9D-%D0%9C%D0%9E%D0%97%D0%A3-42-4.0_2020.pdf

52. ПІ 1.9.10-018-1999. Примірня інструкція з охорони праці при обробці виробничих приміщень і обладнання дезінфікуючими розчинами (58168) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://dnaop.com/html/58168/doc-%D0%9F%D0%86_1.9.10-018-1999

53. І Н С Т Р У К Ц І Я щодо застосування засобу дезінфекційного «Вернедор-Преміум» з метою дезінфекції, передстерилізаційного очищення та стерилізації [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://dezmed.com.ua/images/documents/vernedor_premium.pdf

54. ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування засобу "Фамідез® Ендо" з метою дезінфекції, стерилізації та суміщення дезінфекції з передстерилізаційним очищенням виробів медичного призначення [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://famidez.ua/doc/2020%20MI%20Famides%20Endo.pdf>

55. Kasianenko, O. & Berezovskyi, A. & Kasianenko, S. & Dolbonosova, R.. (2019). Аналіз ринку дезінфікуючих засобів в Україні. Scientific and Technical Bulletin of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives and Institute of Animal Biology. 20. 439-445. 10.36359/scivp.2019-20-2.56.

56. Реєстр деззасобів 908-863 24_01_2025.xlsx [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://wd.clarity-project.info/resource/f0366bc6-7a38-4f1d-9541-62207916c488>

57. ENHANCE SCRAP CONVEYANCE WITH AES FRESH AIR INTAKE SYSTEMS [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://advancedequipmentsales.com/wp-content/uploads/2022/02/Enhance-Air-Conveyance_web_site.pdf

58. ФЯР фільтр грубого очищення повітря [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.luftgrand.com.ua/product-page/%D1%84%D1%8F%D1%80-%D1%84%D1%96%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80-%D0%BF%D0%BE%D0%B2%D1%96%D1%82%D1%80%D1%8F-%D1%81%D1%96%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%B9?srltid=AfmBOoruDeBPjKMKI6PdqeVS4tM1mEuyGNeZ7o63IrOaOomAHg_u4VlcB

59. Гвинтовий компресор Mast 16 Бар SH50-16 VSD [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://mast-group.com.ua/catalog/kompresori_ta_pnevmatichne_obladnannya/gvintovi_kompresori/gvintovi_kompresori_16_bar/6495/

60. Канальний фреоновий охолоджувач С-ФКО-60-30 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vent-systems.com.ua/ua/p1353653462-kanalnyj-freonovyj-ohladitel.html>

61. Vertical or horizontal air storage – up to 50 bar [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kaeser.com/ie-en/products/compressed-air-storage-and-pressure-maintenance/air-receivers>

62. Повітронагрівачі (калорифери) водяні ПНВ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promsteel.in.ua/equipment/%d0%bf%d0%be%d0%b2%d1%96%d1%82%d1%80%d0%be%d0%bd%d0%b0%d0%b3%d1%80%d1%96%d0%b2%d0%b0%d1%87%d1%96-%d0%b2%d0%be%d0%b4%d1%8f%d0%bd%d1%96/>

63. Фільтри стисненого повітря AF Німеччина, Фільтр магістральний компресора [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://k-m-s.all.biz/uk/filtry-stysnenogo-povitrya-af-nimechchyna-filtr->

[g15274387?utm_currency=UAH&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=shopping_ua_personal&utm_content=123279&gclid=EAIaIQobChMIqp-40_z0igMVuFiRBR06shqbEAQYAiABEGli9_D_BwE](https://www.promvit.com.ua/g15274387?utm_currency=UAH&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=shopping_ua_personal&utm_content=123279&gclid=EAIaIQobChMIqp-40_z0igMVuFiRBR06shqbEAQYAiABEGli9_D_BwE)

64. Ваги лабораторні на 3 кг MTL3002N [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vis.ua/product/vahy-laboratorni-na-3-kh-mtl3002n/>

65. Compressed air filters [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.atlascopco.com/content/dam/atlas-copco/compressor-technique/industrial-air/documents/leaflets/air-dryers/compressed-air-filters/Filters_antwerp_leaflet_EN_2935093244.pdf

66. BR500-C1-10L Cell Culture Fermentation System Technical Specifications [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://files.lab1st.com/documents/BR500-C1-10L%20Lab1st%20Bioreactor%20V1.231025.pdf>

67. Лабораторний реактор робочим об'ємом 20 л РС-20.00.000 ПС [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/laboratornij-reaktor-robochim-ob%e2%80%b2yemom-20-l-rc-20-00-000-ps/>

68. Boyser AMP22 Peristaltic Pumps [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.northridgepumps.com/p_207_boyser-amp22-peristaltic-pumps

69. 100L Pharmaceutical Bioreactor Full Suspension Culture Stainless Steel Fermentation Tank [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://maikemachinery.en.made-in-china.com/product/eEMpJHQYYCVd/China-100L-Pharmaceutical-Bioreactor-Full-Suspension-Culture-Stainless-Steel-Fermentation-Tank.html>

70. Реактор для виробництва мазей, гелів, емульсій та суспензій (МЛФ) РСДП-200 ВК [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-mazej-gelej-emulsij-i-suspenzij-mlf-rsdp-200-vk/>

71. 10L Stainless Steel Reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.zzlab.com/Stainless_Steel_Reactor/273.html

72. Механічні вагові дозатори [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://polytechnic.in.ua/ua/p1054713578-mehanicheskie-vesovye-dozatory.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=EAIaIQobChMI tNT0tqb3igMvy5SDBx1oVAKKEAQYA iABEgLLMPD BwE

73. 1000L Stainless Steel Bioreactor for Cell Culture with 4 Gas Inlets BR500Pro-C1 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://eshop.lab1st.com/products/1000l-stainless-steel-bioreactor-for-microbial-and-cell-culture-br500-c1?srsId=AfmBOorXo8FjLshkeiS5MHGzToTXfqI0AJ10a7IiQPoMMGbp1LVupXOF>

74. Stoecklin 6300 ltr - Реактор з нержавіючої сталі Stoecklin 6300 ltr [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.machinesseeker.com.ua/stoecklin-6300+ltr/i-6508534>

75. Centrifugal pump Wa+ series [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.directindustry.com/prod/apv/product-5697-1165463.html>

76. Uht Ultra Sterilization System High Temperature Batch Continuous Sterilizer Milk Sterilizing Machine [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Uht-Ultra-Sterilization-System-High-Temperature_1601089244619.html?spm=a2700.7724857.0.0.793b61feHzrAPe

77. Goderska, Kamila & Juzwa, Wojciech & Karpiński, Tomasz. (2024). Quantitative Analysis of Lactobionic Acid in Bioreactor Cultures and Selected Biological Activities. *Molecules*. 29. 5400. 10.3390/molecules29225400.

78. Активоване вугілля NORIT GAC 1240W [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://activcarbon.com.ua/uk/product/aktivirovannyj-ugol-norit-gac-1240w/>

79. Sarenkova, I., Sáez-Orviz, S., Rendueles, M., Ciprova, I., Zagorska, J., & Díaz, M. (2022). Downstream Approach Routes for the Purification and Recovery of Lactobionic Acid. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(4), 583. <https://doi.org/10.3390/foods11040583>.

80. Spectrum Chemical Lactobionic Acid, NF, EP, 5 kg [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.calpaclab.com/lactobionic-acid-nf-ep-5kg-each/spc-l1604-5kgbl?srsltid=AfmBOoqz2->

[VRTcDGs8Akd6N2xY0RcVHYKJSj_sFhUYmmYaAmpd2d8ta8&utm_source](VRTcDGs8Akd6N2xY0RcVHYKJSj_sFhUYmmYaAmpd2d8ta8&utm_source)

81. Lactobionic acid CAS 96-82-2 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://lanhaiindustry.com/product/lactobionic-acid-cas-96-82-2-2?utm_source

82. Lactobionic Acid USP NF EP BP & Pure Grade Manufacturers, with SDS GHS MSDS Sheet [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://mubychem.com/lactobionicacid.html?utm_source

83. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

84. *Pseudomonas taetrolens (graveolens)* [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tgw1916.net/Pseudomonas/taetrolens.html> .

85. García, C., Rendueles, M., & Díaz, M. (2017). Microbial amensalism in *Lactobacillus casei* and *Pseudomonas taetrolens* mixed culture. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40(7), 1111–1122. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1773-3>.

86. Analytical HPLC Systems 1260 Infinity II LC System. Електронний ресурс [Режим доступу]: <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography/hplc-systems/analytical-hplc-systems/1260-infinity-ii-lc-system#specifications> .

87. ICSep ICE-ION-300 ORGANIC ACIDS COLUMN CATALOG NO. ICE-99-9850. Електронний ресурс [Режим доступу]: <https://www.analab.com.tw/upload/analab/files/ICE-99-9850%20ION300.pdf>

88. Abdul Khalil, K., Mustafa, S., Mohammad, R., Bin Ariff, A., Shaari, Y., Abdul Manap, Y., Ahmad, S. A., & Dahalan, F. A. (2014). Optimization of

milk-based medium for efficient cultivation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 using face-centered central composite-response surface methodology. *BioMed research international*, 2014, 787989. <https://doi.org/10.1155/2014/787989>.

89. Waśkowski, B. & Kudzin, Z.H. & Ciesielski, Witold & Kowalski, J.P.. (2003). Determination of nitrogen in organic compounds and biological samples by gas chromatography after prior degradation into molecular nitrogen with use of solid oxidants. *Chemia Analityczna*. 48. 223-231.

90. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник / Т. П. Пирог. – 2-е вид., доп. і перероб. – К. : НУХТ, 2010. – 632 с.

Додатки до розділу 4

