

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Декан факультету

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » червня 2024 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » червня 2024 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, природоохоронна»

на тему: Біосинтез вітаміну B₁₂ *Pseudomonas denitrificans*

Виконала: здобувачка IV курсу, групи 3

ПІХАЛЮ Владислава Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

(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 – 2024 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 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПІХАЛО Владислави Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез вітаміну B₁₂ *Pseudomonas denitrificans*

керівник роботи СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна, асистент

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 3м³, коефіцієнт заповнення становить 0,6, цільовий продукт вітамін B₁₂, виробничий штам *Pseudomonas denitrificans* (штам ненаведено)

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) характеристика цільового продукту, характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу вітаміну B₁₂ *Pseudomonas denitrificans* формату А3 – аркушів

Апаратурна схема біосинтезу вітаміну B₁₂ *Pseudomonas denitrificans* формату А1 - аркушів

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	01.03.24 - 03.03.24	Виконано
	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	03.03.24- 06.03.24	Виконано
	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування.	06.03.24.- 09.03.24	Виконано
	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	09.03.24.- 11.03.24	Виконано
	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	11.03.24.- 15.03.24	Виконано
	Розділ 6. Специфікація обладнання	15.03.24- 18.03.24	Виконано
	Розділ 7. Опис технологічної схеми	18.03.24.- 21.03.24	Виконано
	Розділ 8. Контроль виробництва	21.03.24.- 25.03.24	Виконано
	Розділ 9. Охорона довкілля	25.03.24 - 28.05.24	Виконано

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Владислава ПІХАЛО _____
(ім'я та прізвище)

Тетяна СУЛЕЙКО _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технічної та апаратурної схем біосинтезу вітаміну В₁₂, з використанням бактерій *Pseudomonas denitrificans*, які синтезують вітамін В₁₂ у концентрації 198,27 мг/мл. Вітамін В₁₂ використовується для лікування анемії, діабетичної полінейропатії, а також як харчову добавку для великої рогатої худоби. Розрахована потужність виробництва становить 1 026 450 мг (7395 л культуральної рідини) вітаміну В₁₂ за рік.

Технологічна схема біосинтезу вітаміну В₁₂ включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, приготування та стерилізація мальтозного сиропу для підживлення середовища, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури, технологічної схеми (формат А3, 1 аркуш) та апаратурної схеми (формат А1, 1 аркуш). Загальний обсяг роботи – 116 сторінок, 12 таблиць та 83 літературного найменування.

Ключові слова: вітамін В₁₂, ціанкобаламін, *Pseudomonas denitrificans*, біосинтез, 5,6-диметилбензімідазол.

ABSTRACT

The qualification work is dedicated to the development of technical and hardware schemes for the biosynthesis of vitamin B12, using *Pseudomonas denitrificans* bacteria, which synthesize vitamin B12 at a concentration of 198.27 mg/ml. Vitamin B12 is used to treat anemia, diabetic polyneuropathy, and as a food supplement for cattle. The estimated production capacity is 1,026,450 mg (7,395 L of culture fluid) of vitamin B12 per year.

The technological scheme of the biosynthesis of vitamin B12 includes auxiliary works (preparation of aeration air, preparation of titration agents, preparation and sterilization of maltose syrup for feeding the medium, sterilization of nutrient media) and the technological process (three stages of growing seed material and biosynthesis in a fermenter with a volume of 3 m³ with a coefficient filling 0.6).

The qualifying paper consists of an introduction, nine chapters, a list of used literature, a technological diagram (format A1, 1 sheet) and an apparatus diagram (format A1, 1 sheet). The total volume of the work is 113 pages, 12 plates and 83 literary names.

Key words: vitamin B12, cyanocobalamin, *Pseudomonas denitrificans*, biosynthesis, 5,6-dimethylbenzimidazole.

Зміст

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	11
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.....	22
2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	26
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	27
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	28
3.1. Потреба в цільовому продукті.....	28
3.2. Розрахунок річної потреби.....	29
3.3. Розрахунок потужності виробництва ціанокобаламіну.....	30
3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 3 м ³	31
3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 300 л.....	32
3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 30 л.....	33
3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці.....	34
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	35
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	35
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	37
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	40
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	40

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	40
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	42
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	46
5.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	46
5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівних апаратах 30 л та 300 л.....	51
5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері 3 м ³	54
5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН.....	55
5.6. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	57
5.6.1 Вибір стадій виділення та очищення вітаміну В ₁₂	57
5.6.2 Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання.....	57
5.6.3 Обґрунтування вибору способу дезінтеграції клітин та відповідного Обладнання.....	59
5.6.4 Вибір способу виділення цільового продукту з дезінтеграту.....	62
5.6.5 Вибір способу концентрування та відповідного обладнання.....	64
5.6.6 Вибір способу сушіння та сушарки.....	65
5.6.7 Вибір товарної форми випуску вітаміну В ₁₂ (упаковки).....	66
5.7 Методи ідентифікації цільового продукту.....	69
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	70
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	76
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	84
8.1. Карта постадійного контролю.....	84
8.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ.....	89
8.3. Визначення концентрації цільового продукту вітаміну В ₁₂	92
8.4. Визначення джерела вуглецю та азоту.....	92

8.4	Визначення концентрації біомаси.....	96
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....		97
9.1.	Системи знешкодження рідких відходів.....	97
9.1.1.	Розрахунок орієнтовного об'єму стічних вод.....	97
9.1.2	Визначення середніх витрат стічних вод від промислового підприємства.....	99
9.1.3	Система очищення стічних вод.....	101
9.2.	Системи знешкодження газоподібних відходів.....	103
9.3.	Системи знешкодження твердих відходів.....	104
Список використаної літератури.....		108

ВСТУП

Фармацевтична та біотехнологічна промисловості відіграють значну роль у розвитку сучасних економічних систем. Ці високотехнологічні сфери є ключовими факторами інноваційного зростання багатьох країн, включаючи країни Європейського Союзу. Завдяки своїм досягненням, фармацевтика та біотехнології забезпечують значні конкурентні переваги, стимулюють економічне зростання та створюють нові робочі місця. Розробки в галузі біотехнології знаходять застосування в найрізноманітніших сферах життя. Вони використовуються не лише в медицині, але й у виробництві харчових продуктів, сільському господарстві, лісовому господарстві та багатьох інших галузях. Це свідчить про їхню універсальність та значний потенціал для вирішення актуальних проблем суспільства. [1].

Вітамін В₁₂ є важливою поживною речовиною, яка бере участь у синтезі ДНК, живить мозок і нервову систему, а також сприяє формуванню здорових еритроцитів. Поживна речовина природним чином міститься в м'ясі, рибі та молочних продуктах і може бути синтезована в лабораторних умовах [2].

Деяким людям не вистачає білка, який допомагає організму засвоювати вітамін В₁₂ з їжі та добавок. Брак В₁₂ може підвищити ризик певного типу анемії, через який ви можете відчувати слабкість і втому [2].

Вітамін В₁₂ також міститься в продуктах тваринного походження, таких як яйця, м'ясо, риба, птиця, молоко та деякі харчові дріжджові продукти. Вітамін В₁₂ природним чином не міститься в більшості рослинних продуктів [2].

Для повноцінного росту, розвитку тварин і птахів у сільському господарстві використовується вітамін В₁₂. Цей компонент не здатний синтезуватися в організмі або його кількість вкрай невелика. Тому в практиці елемент вводять в корми.

					НУХТ БТЕК 04.03.32 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піхало В. О.			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т. Л.					9	116
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Характерною особливістю вітаміну В₁₂ є його виготовлення синтезом. Це водорозчинний компонент, який можна додавати в корми. Його використовують у тваринництві для профілактики різних захворювань, оскільки дефіцит вітаміну може проявитися через період, коли тварина вже має серйозні проблеми зі здоров'ям [3].

Це значущий компонент енергетичних обмінів, він бере участь у синтезі амінокислот [3].

Продуцент вітаміну В₁₂ *Pseudomonas denitrificans* показав найкращу синтезувальну здатність – 198 мг/мл, саме тому доцільно використовувати його.

Мета кваліфікаційної роботи – проєктування ділянки доферментаційних процесів та моделювання технічної та апаратурної схем для біосинтезу вітаміну В₁₂ *Pseudomonas denitrificans*

Новизною роботи є: виробництво вітаміну В₁₂ за допомогою новітніх біотехнологічних підходів для забезпечення потреб сільського господарства у цьому вітаміні.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ – ВІТАМІНУ В₁₂

Вітамін В₁₂ (Ціанокобалін) - складна водорозчинна органічна сполука, прозора, яскраво-червоного кольору рідина [4]. Унікальна тим, що містить іон металу, кобальт. Молекула вітаміну В₁₂ зазвичай складається з трьох частин: чотирьох атомів N і центрального іона кобальту, має складну хімічну структуру, як показано[5] (рис.1.1)

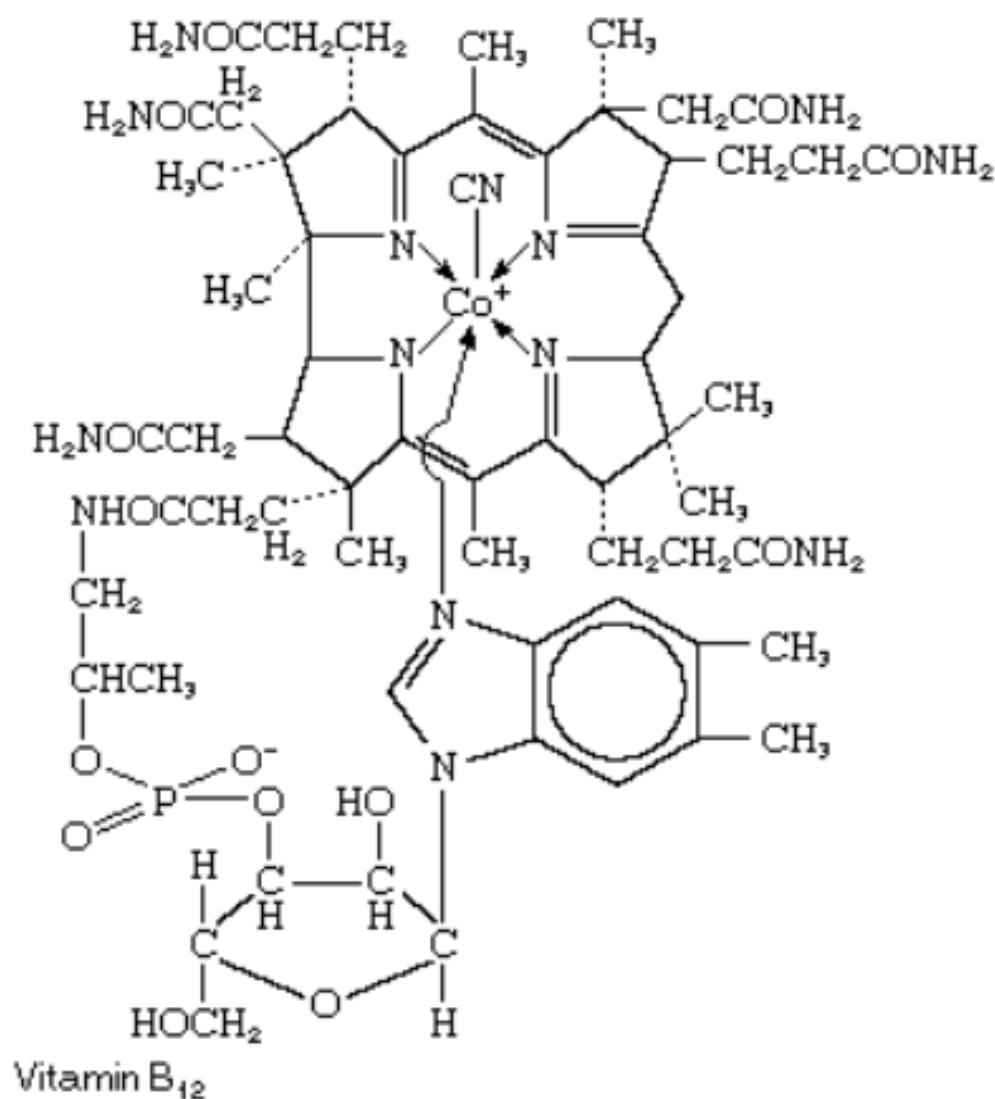


Рис.1.1 Структурна формула вітаміну В₁₂ [5]

					НУХТ БТЕК 04.03.32 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піхало В. О.			Розділ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т. Л.					11	116
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Хімічна формула вітаміну В₁₂ - C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P[6].

Температура кипіння - > 300⁰ [7].

Розчинний у спирті, нерозчинний в ацетоні, хлороформі, ефірі. рН становить 4,5 – 7[7].

Фармакокінетика. Ціанокобаламін не використовується напряму, а спочатку перетворюється на активну форму - аденозилкобаламін. Цей процес відбувається в тканинах організму. Аденозилкобаламін виконує важливі функції в обміні речовин. Виводиться з жовчю і сечею [4].

Фармакодинаміка. Ціанокобаламін регулює обмін речовин, впливаючи на процеси розщеплення та синтезу вуглеводів, білків та ліпідів. Він бере участь у створенні лабільних метильних груп, які є важливими компонентами багатьох біологічних молекул. Ціанокобаламін необхідний для утворення холіну, метіоніну, нуклеїнових кислот, креатину та інших важливих сполук. Він сприяє накопиченню в еритроцитах (червоних кров'яних клітинах) сполук із сульфгідрильними групами, які роблять клітини більш стійкими. Як фактор росту, ціанокобаламін стимулює функцію кісткового мозку, що важливо для виробництва нормальних еритроцитів. Препарат допомагає нормалізувати роботу печінки та нервової системи. Він також активує систему згортання крові, підвищуючи тромбoplastичну активність та активність протромбіну (при прийомі високих доз) [4].

Промислово В₁₂ можна отримати лише шляхом ферментації, оскільки його хімічний синтез є занадто складним процесом[8].

Найважливішим ринком збуту продуктів В₁₂ є кормова та харчова промисловість, де його ефективність і безпека були широко перевірені, хоча його використання також поширений у харчовій та фармацевтичній промисловості. У кормовій промисловості вітамін В₁₂ зазвичай додають до кормів для птиці, свиней і телят. У харчовій промисловості він також набуває популярності з розвитком вегетаріанства. У фармацевтичній промисловості вітамін В₁₂

використовують для лікування анемії, дефіциту вітаміну В₁₂, отруєння ціанідами та зниження рівня гомоцистеїну[9].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживного середовища для його культивування

Вітамін В₁₂, також відомий як ціанокобаламін, належить до родини сполук кобаламіну, які складаються з кориноїдного кільця, верхнього та нижнього лігандів[10].

Широкомасштабне промислове виробництво вітаміну В₁₂ відбувається шляхом мікробної ферментації, переважно з використанням таких продуцентів як *Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium shermanii* або *Sinorhizobium meliloti* [10].

Таким чином, згідно інформації, поданої у сучасній літературі, найпродуктивнішими мікроорганізмами для синтезу ціанокобаламіну є штами родів *Propionibacterium* та *Pseudomonas*. Тому у даному розділі порівнюємо біосинтетичну здатність та економічну доцільність застосування даних продуцентів з метою одержання вітаміну В₁₂ [11,12-13].

У статті [12] наведено дані про культивування *Propionibacterium freudenreichii* СІСС 10019 у середовищі з гідролізатами рослинної сировини з отриманням вітаміну В₁₂.

Інші дослідники [13] визначили здатність штаму *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 до синтезу ціанокобаламіну у середовищі з глюкозою.

Проте у літературних джерелах наявна і робота, присвячена результатам вирощування *Pseudomonas denitrificans* (штам не наведено) у середовищі з мальтозним сиропом [11]. Порівняння штамів-продуцентів вітаміну В₁₂ зображено у вигляді таблиці 2.1.

					НУХТ БТЕК 04.03.32 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Піхало В. О.				Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агенту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Сулейко Т. Л.						14	116
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Згідно даних, узагальнених у таблиці 2.1, найбільшу кількість ціанокобаламіну отримали при культивуванні *Pseudomonas denitrificans* (штам не наведено) – 198,27 мг/л. У свою чергу, штам *P. freudenreichii* CICC 10019 синтезував у 4 рази меншу кількість вітаміну, а при культивуванні *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 отримали у 6 разів менше ціанокобаламіну.

Разом з тим, на наступному етапі слід здійснити порівняння вартості поживних середовищ для культивування біологічних агентів, оскільки склад середовищ істотно відрізняється. Дані подано у таблиці 2.2.

За інформацією таблиці 2.2, найвищу вартість має середовище для вирощування *Pseudomonas denitrificans* – 1 л коштує 11,2 грн. Дещо дешевшим виявилось середовище для вирощування штаму *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 (8,17 грн), а найдешевшим є 1 л середовища для вирощування іншого штаму пропіоновокислих бактерій *P. freudenreichii* CICC 10019 – 2,89 грн.

Проте для вибору найрентабельнішого біологічного агента-продуцента ціанокобаламіну слід провести наступні розрахунки, результати яких зображено у таблиці 2.3.

Таблиця 2.1

Біологічні агенти та способи їх культивування для отримання вітаміну В₁₂

Біологічний агент	Поживне середовище, г/л	Концентрація вітаміну В ₁₂ , мг/л	Тривалість процесу, год	Умови біосинтезу	Література
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> CICC 10019	Глюкоза – 30, Гідролізат кукурудзяного стебла – 40, КН ₂ РО ₄ – 4,6 СоСl ₂ – 0,0127	47,6	258	Швидкість подачі азоту 0,1 л/хв. Значення температури 30°C, рН – 7,0 шляхом подачі 12% розчину амонію	[11]

Продовження таблиці 2.1

<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> OLP-5	Глюкоза – 2, Дріжджовий екстракт – 1, Триптон соєвий – 1, $\text{NaC}_3\text{H}_5\text{O}_3$ – 1, KH_2PO_4 – 0,2, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,4, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 мг, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 мг, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,3 мг, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1 мг, NaCl – 1 мг, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1 мг, 5, 6-диметилбензімідазол (DMBI) – 1 мг	31,67	132	72 год анаеробного та 60 год аеробного культивування; температура 37°C, рН 7, швидкість перемішування середовища – 200 об/хв	[12]
--	---	-------	-----	--	------

Закінчення таблиці 2.1

<i>Pseudomonas denitrificans</i> (штам не наведено)	Мальтозний сироп – 260, Кукурудзяний сироп – 40, Бетаїн – 20, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1, MgSO ₄ – 1,5; KH ₂ PO ₄ – 0,75; ZnSO ₄ •7H ₂ O – 0,08; CoCl ₂ •6H ₂ O – 0,14; DMBI – 0,075.	198,27	180	Температура культивування – 32°C, рН=7, швидкість перемішування середовища 78 об/хв при подачі повітря 850-1100 м ³ /год	[3]
--	---	--------	-----	--	-----

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для отримання вітаміну В₁₂

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонент а, грн/кг	Вартість компонент а (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3)*
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> CICC 10019	Глюкоза – 30	54	1,62	1
	Гідролізат кукурудзяного стебла – 40	25	1	2
	КН ₂ РО ₄ – 4,6	59	0,27	3
	СоСl ₂ – 0,0127	295	0,003	4
Вартість 1 л середовища становить – 2,89 грн				
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> OLP-5	Глюкоза – 2	54	0,1	1
	Дріжджовий екстракт – 1	1100	1,1	5
	Триптон соєвий – 1	6980	6,98	6
	NaC ₃ H ₅ O ₃ – 1	32	0,03	7
	КН ₂ РО ₄ – 0,2	59	0,01	3
	(NH ₄) ₂ НРО ₄ – 0,4	82	0,03	8
	FeSO ₄ •7H ₂ O – 0,5 мг	33	0,00001	9
	MgSO ₄ •7H ₂ O – 1 мг	23,1	0,00002	10

Закінчення таблиці 2.2

	MnSO ₄ • H ₂ O – 0,3 мг	35	0,00001	11
	CaCl ₂ • 6H ₂ O – 1 мг	26	0,00002	12
	NaCl – 1 мг	9,5	0,000001	13
	CoCl ₂ •6H ₂ O – 1 мг	650	0,0006	14
	5,6- диметилбензімідазол (DMBI) – 1 мг	13164,87	0,01	15
Вартість 1 л середовища становить – 8,17 грн				
<i>Pseudomonas denitrificans</i> (штам не наведено)	Мальтозний сироп – 260	27,2	5,44	16
	Кукурудзяний сироп – 40	25	1	2
	Бетаїн – 20	180	3,6	17
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 1	20	0,02	18
	MgSO ₄ – 1,5	23,1	0,03	10
	KH ₂ PO ₄ – 0,75	59	0,04	3
	ZnSO ₄ •7H ₂ O – 0,08	38,2	0,002	19
	CoCl ₂ •6H ₂ O – 0,14	650	0,09	14
	DMBI – 0,075	13164,87	0,98	15
Вартість 1 л середовища становить – 11,2 грн				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на березень 2023 року

1 – <https://prom.ua/p1651341591-glyukoza-dekstroza-monogidrat.html>

- 2 – <https://flagma.ua/uk/kukurudzyaniy-ekstrakt-o5052730.html>
- 3 – <https://megachem.com.ua/ua/kalij-fosfornokislyj-tehnicheskij.html>
- 4 – <https://soda.kiev.ua/ua/p39402463-oksid-kobalta.html>
- 5 – <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- 6 - <https://labtime.ua/tripton-soevyy-bul-on-s-drozhzhevym-ekstraktom-uglich-p23551>
- 7 – <https://soda.kiev.ua/p21242499-laktat-natriya.html>
- 8 – https://systopt.all.biz/ammoniya-fosfat-g1113568#shipping_option
- 9 – <https://www.systopt.com.ua/ru/item-zalizo-sirchanokysle-7-vodne>
- 10 – <https://www.systopt.com.ua/ru/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu>
- 11 – https://sata-group.com.ua/p1547236906-sulfat-margantsa-monogidrat.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwh-CVBhB8EiwAjFEPGfqIxNyxi_99GahccHP0TotYdfxh9mnor3db50ow4D86_aKhcVxIBxoCpY0QAvD_BwE
- 12 – <https://ximindustry.com.ua/p13124380-kaltsij-hloristyj.html>
- 13 – <https://www.olx.ua/d/uk/obyavlenie/sol-sl-tehnchna-nasipom-torg-IDP4sNk.html>
- 14 – <https://medoprom.com.ua/product/kobalt-khloristyj-1kg>
- 15 – <https://www.chemicalbook.com/Price/5-6-Dimethylbenzimidazole.htm>
- 16 – <https://prom.ua/p1443668210-patoka-maltozna-baraban.html>
- 17 – <https://www.covalent.com.ua/ru/shop/betayin/>
- 18 – <https://harkiv-torg.com.ua/ua/p740948461-sulfat-ammoniya-ammoniumsulphate.html>
- 19 – <https://himfarminvest.com.ua/tsinka-sulfat>

Умовна вартість 1 мг вітаміну В₁₂

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація вітаміну, мг/л	Умовна вартість 1 мг вітаміну, грн	Тривалість культивування, год	Кількість вітаміну, синтезованого за год, мг/л
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> CICC 10019	2,89	47,6	0,06	258	0,18
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> OLP-5	8,17	31,67	0,25	132	0,23
<i>Pseudomonas denitrificans</i> (штам не наведено)	11,2	198,27	0,056	180	1,1

За даними таблиці 2.3, умовна вартість 1 мг ціанокобаламіну, синтезованого *P. freudenreichii* CICC 10019 та *P. denitrificans*, є майже однаковою і становить 0.06 і 0,056 грн. Проте серед трьох продуцентів саме

P. denitrificans синтезує найбільшу кількість вітаміну B₁₂ за 1 год – 1,1 мг/л, у той час як цей показник для вищевказаних пропіоновокислих бактерій є нижчим (0,18 та 0,23 мг/л відповідно).

Отже, найкращим біологічним агентом для біосинтезу вітаміну B₁₂ є *P. denitrificans* (штам не наведено), оскільки даний мікроорганізм утворює високу концентрацію ціанокобаламіну при низькій умовній вартості поживного середовища для його вирощування.

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування становить 180 год, концентрація вітаміну B₁₂ складає 198,27 мг/л (0,198 г/л), а кількість біомаси – 32 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу вітаміну B₁₂. Як джерело карбону для одержання ціанокобаламіну використовується мальтозний сироп. Вміст вуглеводів у мальтозному сиропі складає близько 38%.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 198,27 мг ціанокобаламіну. Молекулярна маса вітаміну B₁₂ становить 1355. Отже, у 1355 г ціанокобаламіну міститься 756 г Карбону, а в 198,27 мг (0,198 г) ціанокобаламіну $(756 \times 0,198) / 1355 = 0,11$ г = 110 мг Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах вуглеводів міститься 0,11 г Карбону, враховуючи, що вміст Карбону у вуглеводах мальтозного сиропу становить 40%. Отже, у 100 г вуглеводів міститься 40 г Карбону, а 0,11 г Карбону міститься у $(0,11 \times 100) / 40 = 0,27$ г вуглеводів.

Оскільки у мальтозному сиропі міститься 38 % вуглеводів, то для одержання 0,198 г ціанокобаламіну, вміст мальтозного сиропу у середовищі повинен бути $0,27 \times 2,6 = 0,7$ г/л, або $\approx 0,07$ %. При вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах близько 40% субстрату окиснюється до вуглекислого газу (CO₂) для отримання енергії, необхідної для

конструктивного метаболізму, вміст мальтозного сиропу у середовищі становитиме $(0,7 \times 0,4) + 0,7 = 0,98$ г/л = 0,09 %.

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 32 г біомаси становить $32 \times 0,5 = 16$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(16 \times 100) / 40 = 40$ г вуглеводів.

У перерахунку на мальтозний сироп одержимо $40 \times 2,6 = 104$ г/л. Для отримання 32 г/л біомаси, з урахуванням 40% втрат субстрату на "холосте окислення", необхідно внести до середовища 145,6 г/л мальтозного сиропу (14,5%). Отже, загальний вміст мальтозного сиропу у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (32 г/л) та вітаміну B₁₂ (198,27 мг/л = 0,198 г/л), становить $0,98 + 145,6 = 146,58$ г/л $\approx 14,7$ %.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Для синтезу 32 г біомаси, яка містить 10% азоту, потрібно 3,2 г азоту.

Продуцент ціанокобаламіну асимілює як джерела азотного живлення мінеральний ((NH₄)₂SO₄) та органічний Нітроген.

Розрахуємо кількість сульфату амонію, необхідну для одержання 32 г/л біомаси. Молекулярна маса (NH₄)₂SO₄ становить 132. Отже, у 132 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 3,2 г Нітрогену буде міститись у $(132 \times 3,2) / 28 = 15,08$ г сульфату амонію.

Отже, для одержання 32 г/л біомаси вміст (NH₄)₂SO₄ у середовищі культивування повинен становити 15,08 г/л.

Потреби для синтезу вітаміну B₁₂. Нітроген, крім біомаси, також є важливою складовою частиною ціанокобаламіну (вітаміну B₁₂). Цей текст описує розрахунок кількості сульфату амонію ((NH₄)₂SO₄), необхідного для культивування мікроорганізмів з метою отримання 0,198 г/л ціанокобаламіну. Молекулярна маса вітаміну B₁₂ становить 1355. У 1355 г

вітаміну B₁₂ міститься 196 г Нітрогену (N), тоді у 0,198 г ціанокобаламіну вміст Нітрогену становить $(0,198 \times 196) / 1355 = 0,028$ г.

Далі слід розрахувати, в якій кількості (NH₄)₂SO₄ міститься ця кількість Нітрогену. У 132 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 0,028 г Нітрогену буде міститись у $(132 \times 0,028) / 28 = 0,13$ г солі.

Отже, для одержання 0,198 г/л ціанокобаламіну вміст сульфату амонію в середовищі має складати 0,13 г/л.

Розрахунок вмісту органічного азоту в кукурудзяному екстракті. Для біосинтезу вітаміну B₁₂ використовується *Pseudomonas denitrificans* (штам не наведено). Для росту даного біологічного агента необхідними є незамінні амінокислоти, які слід додатково вносити у середовище культивування. У виробничих умовах джерелом таких сполук є кукурудзяний екстракт. Також кукурудзяний екстракт виступає джерелом органічного азоту для продуцента ціанокобаламіну. Концентрація кукурудзяного екстракту в середовищі становить 40 г/л.

Кукурудзяний екстракт містить 1,9% органічного азоту, доступного для бактерій. У 40 г кукурудзяного екстракту міститься $(1,9 \times 40) / 100 = 0,76$ г Нітрогену.

Кількість Нітрогену, необхідна для синтезу біомаси та вітаміну B₁₂ становить $15,08 + 0,13 = 15,21$ г/л. З врахуванням Нітрогену, що міститься у кукурудзяному екстракті, у середовище повинно бути внесено $15,21 - 0,76 = 14,45$ г/л азоту у формі мінеральних солей.

Розрахунок складу підживлювального розчину

Загальний вміст мальтозного сиропу у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (32 г/л) та вітаміну B₁₂ (198,27 мг/л = 0,198 г/л), становить 146,58 г/л.

Тривалість культивування становить 180 год. Прийmemo, що підживлення додається у середовище кожні 30 год. Кожні 30 годин доза підживлення становитиме 20 г/л.

Таким чином, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись $146,58 / 6 = 24,43$ г/л мальтозного сиропу.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

У біомасі міститься близько 3 % Фосфору (за елементом P). Тоді для синтезу 32 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити $32 \times 0,03 = 0,96$ г/л. Джерелом Фосфору при виробничому культивуванні продуцента вітаміну B₁₂ є KН₂PO₄. Вміст Фосфору у KН₂PO₄ становить $31 / 136 = 23$ %. Прийmemo вміст Фосфору (P) у KН₂PO₄ за 1,3.

Тоді вміст P у вигляді KН₂PO₄ становить $0,4 \times 1,3 \approx 0,5$ г/л. Отже, концентрація цієї солі у середовищі складає $(136 \times 0,5) / 31 = 2,2$ г/л.

Інші компоненти середовища

Джерелом таких важливих біогенних елементів як Магній, Кальцій і Ферум у середовищі для культивування *P. denitrificans* (штам не наведено) є мальтозний сироп і кукурудзяний екстракт, в складі яких дані елементи знаходяться у необхідних кількостях.

Вищезазначені розрахунки з підбору складу поживного середовища представлено у вигляді таблиці 2.4.

**Склад основних компонентів поживного середовища для
культивування продуцента вітаміну В₁₂**

Компоненти поживного середовища	Кількість, г/л			
	Сумарний	Початковий	У формі підживлення	В одній порції підживлення
Мальтозний сироп	145,6	50	95,6	20
Кукурудзяний екстракт	0,76	0,76	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	14,45	14,45	-	-
KH ₂ PO ₄	2,2	2,2	-	-

Отже, проведено розрахунки з підбору складу поживного середовища для культивування продуцента вітаміну В₁₂ на основі потреб для синтезу цільового продукту та біомаси біологічного агента.

Зважаючи на те, що використання складу поживного середовища, кількості якого представлені у статті [5] (табл. 2.1), забезпечує синтез ціанокобаламіну на рівні 198,27 мг/мл, то для реалізації підготовки посівного матеріалу та безпосередньо біосинтезу будемо використовувати склад середовища, представлений у таблиці 2.1.

2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Pseudomonas denitrificans — це джгутикові паличкоподібні грамнегативні аеробні гетеротрофні бактерії зі здатністю продукувати вітамін В₁₂. *P. denitrificans* є одним із небагатьох мікроорганізмів, які можуть синтезувати вітамін В₁₂ в аеробних умовах. Як випливає з назви, *P. denitrificans* також здатний здійснювати денітрифікацію як частину циклу азоту, процесу, під

час якого нітрат перетворюється на газоподібний азот (N₂). *Pseudomonas denitrificans* може проводити анаеробну денітрифікацію шляхом відновлення NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂ (7). Початкові субстрати отримують із ґрунту⁸ або забруднених поверхневих вод. Оптимальна температура росту *P. denitrificans* становить 25°C. Колонії *P. denitrificans* не флуоресціюють і набувають гладкого біло-коричневого кольору. Розміри клітин коливаються приблизно в 1,05 x 0,8 мкм і можуть складатися з 48% ліпідів, залежно від штаму. *Pseudomonas denitrificans* є одним із небагатьох мікроорганізмів, які можуть синтезувати вітамін B₁₂ de novo в аеробних умовах. Геном *P. denitrificans* містить гени, що кодують 26 ферментів, які беруть участь у біосинтезі вітаміну B₁₂, де гени розділені на два різних кластери на хромосомі [14].



Рис.5.1 Фото клітин *Pseudomonas denitrificans*[15]

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Pseudomonas denitrificans* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [16].

Домен - *Bacteria*

Тип - *Proteobacteria*

Клас - *Gammaproteobacteria*

Порядок - *Pseudomonadales*

Родина - *Pseudomonadaceae*

Рід - *Pseudomonas* Migula

Вид - *Pseudomonas denitrificans*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Ціанокобаламін - це препарат, який використовується для лікування дефіциту вітаміну В₁₂. Хімічно він належить до класу під назвою «кориноїди», і являє собою кристалізований комплекс кобальту. Назва «ціанокобаламін» походить від ціанідної групи, приєднаної до молекули [17].

Синтетична форма вітаміну В₁₂ вже давно доступна для перорального та ін'єкційного застосування. Всмоктування ціанокобаламіну відбувається через тонкий кишечник після зв'язування з внутрішніми факторами та іншими білками, що зв'язують кобаламін. При парентеральному введенні він негайно потрапляє в кров. У крові він приєднується до білків плазми. Тканини поглинають вітамін В₁₂ за допомогою специфічних В₁₂-зв'язуючих білків, транскобаламіну I і II, що дозволяє йому проникати в клітини. Велика частина вітаміну зберігається в печінці. Вітамін В₁₂ необхідний для синтезу ДНК і виробництва енергії, особливо в еритроїдних клітинах-попередниках.

Вітамін В₁₂ є кофактором для двох життєво важливих ферментів в організмі: метилмалоніл-КоА-мутази та метіонінсинтази. Ці реакції метилювання відповідають за відпал фрагментів Оказакі під час синтезу ДНК. Поповнення спричиняє повне зменшення мегалобластної анемії та шлунково-кишкових проявів дефіциту вітаміну В₁₂.

					НУХТ БТЕК 04.03.32 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піхало В. О.			Розділ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т. Л.					30	116
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Щодо токсичності цього вітаміну, то секреція ціанокобаламіну зазвичай відбувається з жовчю. При більш високих дозах ціанокобаламіну він швидко виводиться із сечею. Передозування ціанокобаламіну не виникає. Антidotу до вітаміну B_{12} немає [18].

Актуальним також є і використання вітаміну B_{12} у сільському господарстві. Однак 80% харчової добавки ціанокобаламіну, синтетичної форми вітаміну B_{12} , катаболізується в рубці. Разом з тим, повідомлялося, що збільшення надходження вітаміну B_{12} у молочних корів покращує ефективність енергетичного метаболізму на початку лактації, що супроводжується збільшенням надоїв молока [18].

У досліджах на відгодівельних бичках встановлено, що додавання кобальту до їхнього раціону призводить до підвищення синтезу у рубці не тільки вітаміну B_{12} , а і вітамінів B_1 і B_2 , що зумовлено посиленням рост мікроорганізмів. У дорослих жуйних вітамін B_{12} відіграє важливу роль у метаболізмі пропіонату, а саме у перетворенні його шляхом глюконеогенезу в глюкозу, а також в синтезі метіоніну. Вважається, що недостатня забезпеченість корів вітаміном B_{12} може бути причиною низької жирності молока при високому рівні концентратів у раціоні [19].

Вітамін B_{12} є також компонентом ферментного комплексу метіонінсинтази, яка забезпечує синтез метіоніну з S-аденозилгомоцистеїну і 5-метилгідрофолату. Метіонін в організмі тварин, крім використання в синтезі білків, є донором метильних груп для синтезу холіну, карнітину та інших сполук. Тому нестача вітаміну B_{12} в раціоні корів веде до порушення їх гомеостазу в організмі [19].

Тому зважаючи на літературні дані, актуальним та необхідним є виробництво вітаміну B_{12} за допомогою новітніх біотехнологічних підходів для забезпечення потреб сільського господарства у цьому вітаміні.

3.2. Розрахунок річної потреби

Поголів'я великої рогатої худоби (ВРХ) в Україні за рік війни, на 1 березня 2023 року, скоротилося на 15,6% - до 2 млн 409,1 тис., зокрема корів - на 15%, до 1 млн 347,3 тис., повідомила Асоціація виробників молока (АВМ) [20].

Станом на 1 березня 2023 року понад половину (52,6%) поголів'я ВРХ України сконцентровано в Хмельницькій (228,1 тис. голів), Вінницькій (190,8 тис. голів), Полтавській (187,8 тис. голів), Тернопільській (137,9 тис. голів), Одеській (135 тис. голів), Чернігівській (134,6 тис. голів), Черкаській (128,1 тис. голів) і Житомирській (124,5 тис. голів) областях.

На думку аналітика Асоціації виробників молока, за рік російсько-української війни чимало молочних господарств були змушені продати або залишити своє поголів'я на окупованих або прифронтових територіях, проте багато фермерів зуміли пристосуватися до роботи в екстремальних умовах в областях, які не постраждали від війни [20].

Приймаємо, що будемо забезпечувати ціанокобаламіном мікробного походження корів з однієї області України, а саме з Хмельницької. Оскільки існують альтернативні препарати для поповнення нестачі вітаміну В₁₂ приймаємо, що будемо забезпечувати частку 10% від загальної кількості поголів'я Хмельницької області – 22 810 корів.

Згідно інструкції до застосування добавки REVITA-B12 (Індія), що містить ціанокобаламін у кількості 50 мкг/мл, добова доза для корів становить 10 мл [21]. Тобто, 1 корова на день отримує 500 мкг вітаміну В₁₂.

Тоді 22 810 корів отримуватимуть таку кількість зазначеного вітаміну:

$$22\ 810 \times 500 = 11\ 405\ 000 \text{ мкг} = 11\ 405 \text{ мг}$$

Приймаємо, що будемо проводити додавання до корму ціанокобаламіну курсом по 30 днів тричі на рік. Тоді загальна кількість вітаміну B₁₂ становитиме:

$$11\,405 \times 90 = 1\,026\,450 \text{ мг.}$$

Отже, річна потреба у вітаміні B₁₂ для додавання до корму для корів Хмельницької області курсами по 30 днів тричі на рік складає 1 026 450 мг.

3.3. Розрахунок потужності виробництва ціанокобаламіну

Широкомасштабне промислове виробництво вітаміну B₁₂ відбувається шляхом мікробної ферментації, зокрема з використанням такого продуцента як *Pseudomonas denitrificans* [22]. При культивуванні *Pseudomonas denitrificans* (штам не наведено) протягом 180 годин синтезує 198,27 мг/л цільового вітаміну [23].

Тоді об'єм культуральної рідини для отримання 1 026 450 мг ціанокобаламіну становить:

$$\frac{1\,026\,450}{198,27} = 5\,177 \text{ л}$$

Якщо загальні втрати цільового продукту при виробництві складуть 30 %, то об'єм культуральної рідини становитиме:

$$V_{кр} = 5\,177 \text{ л} / (1-0,3) = 7\,395 \text{ л}$$

Приймаємо кількість робочих трудоднів (T_{рд}) 35. Тоді кількість продукту на добу (V_д) складає:

$$V_{д} = V_{кр} / T_{рд} = 7\,395 / 35 = 211$$

Потім визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_{д} \times T_{цф}) / 24) = 7\,395 / ((211 \times 186) / 24) = 4 \text{ цикли,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 180 год).

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{крц}$):

$$V_{крц} = K1 \times V_d \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 211 \times 186 / 24 \approx 1800 \text{ л},$$

де $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Для отримання 1800 літрів культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6 необхідний ферментер з геометричним об'ємом:

$$V_{г} = V_{крц} / K_{зап} = 1800 / 0,6 = 3000 \text{ л} = 3 \text{ м}^3,$$

де $K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 3 м³

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 1,8 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Для виробничого біосинтезу, з урахуванням 10% втрат поживного середовища через краплинонос з колектора відпрацьованого повітря, потрібно використовувати наступну кількість:

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{ф}} = \frac{1,8}{1 - 0,1} \approx 2 \text{ м}^3$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 2 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{ф.1}$ будескладати: $V_{ф.1} = 2 \text{ л} / 0,6 = 3,3 \text{ м}^3$. Однак, необхідно використовувати стандартні ферментери з фіксованим об'ємом. Оскільки найближчий до $3,3 \text{ м}^3$ стандартний ферментер має об'єм

$V_{сф} = 3 \text{ м}^3$, необхідно уточнити коефіцієнт заповнення для цього ферментера:

$$K_{зап.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{2}{3} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища у ферментері. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1+X_{ф}} = \frac{2}{1+0,1} = 1,82 \text{ м}^3$$

де $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 2 - 1,82 = 0,18 \text{ м}^3$$

3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 300 л

Для отримання 180 л культуральної рідини необхідно використовувати таку кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.2} = \frac{V_{пм1}}{1-E_{ін}} = \frac{180}{1-0,1} = 200 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 200/0,6 = 333 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 300 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = \frac{V_{роб.2}}{V_{сін}} = \frac{200}{300} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс}2} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{200}{1 + 0,1} = 182 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс}2} = 200 - 182 = 18 \text{ л}$$

3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 30 л

Для отримання 18 л культуральної рідини необхідно використовувати таку кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм}2}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{18}{1 - 0,1} = 20 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 20/0,6 = 33 \text{ л}$.
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 30 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{20}{30} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс}3} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{20}{1 + 0,1} = 18,2 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм}3} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс}3} = 20 - 18,2 = 1,8 \text{ л}$$

3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Культивування 1800 мл посівного матеріалу можна провести в колбах на качалках об'ємом 750 мл з заповненням по 150 мл. Кількість колб:

$$n_{\text{колб}} = 1800 / (750 \times 0,2) = 12 \text{ шт.}$$

Таким чином, отримання інокуляту для виробничого синтезу вітаміну B₁₂ за допомогою *Pseudomonas denitrificans* (штам не наведено) у ферментері 3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 будемо проводити у 3 стадії.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Pseudomonas denitrificans* є мальтозний сироп. Мальтозний сироп розкладаємо до глюкози.

Так як у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [24] відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у *Pseudomonas denitrificans*, тому для побудови шляху метаболізму глюкози обираємо серед наявних мікроорганізмів один з яких *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [24].

Знаючи ці дані, ми можемо припустити, що для катаболізму ростового субстрату використовують гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes для *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, наводимо схему перетворення глюкози, але перед цим ми розкладаємо мальтозний сироп до глюкози, за допомогою фермента α -глюкозидаза (КФ 3.2.1.20) (рис 1).

					НУХТ БТЕК 04.03.32 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Піхало В. О.						
Перевір.		Сулейко Т. Л.					37	116
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

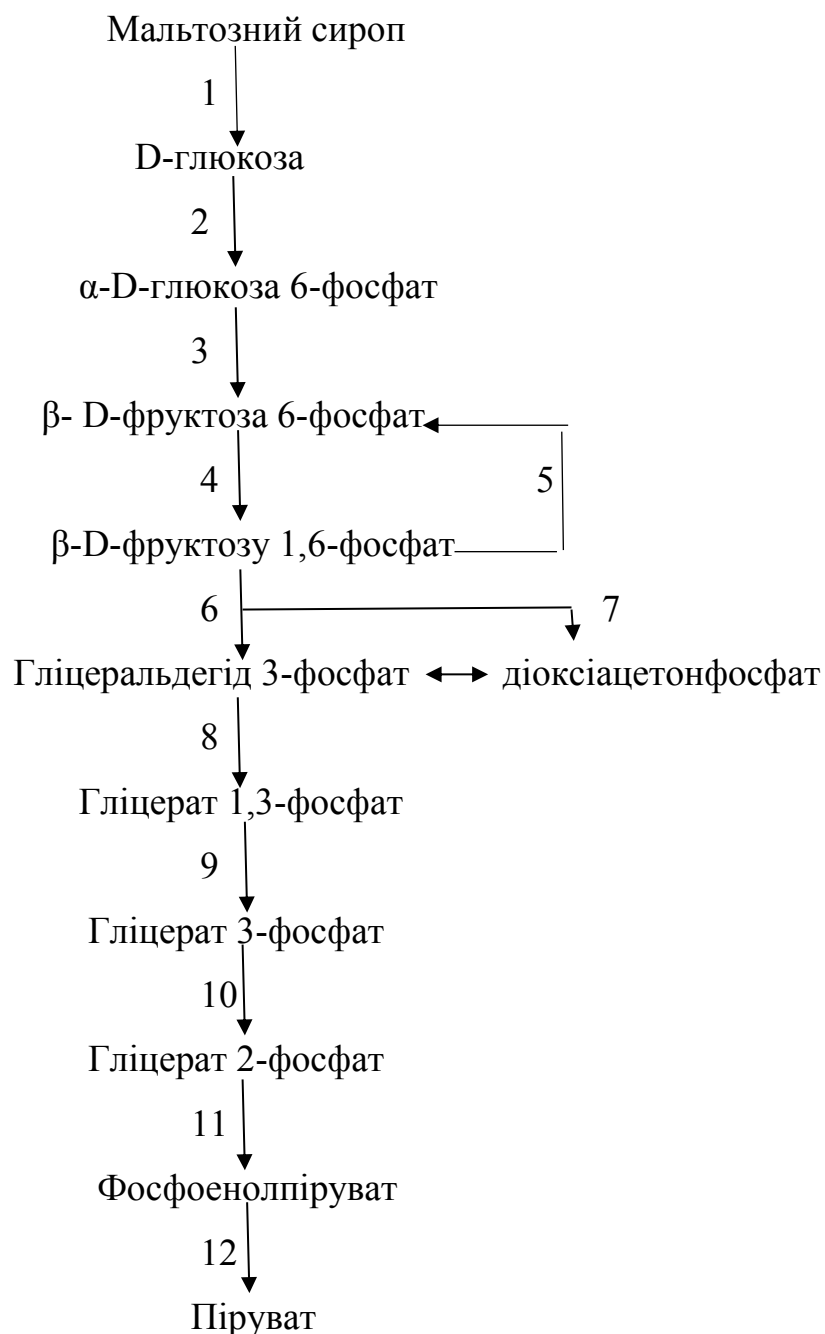


Рис 1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Месейргофа-Парнаса

Ферменти: 1- α -глюкозидаза (КФ 3.2.1.20); 2 – гексокіназа (КФ:2.7.1.1); 3 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 – фосфоглюкокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11); 5- фруктозо-1,6-бісфосфатаза I (КФ:3.1.3.11); 6 – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 7 – тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 8 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 9 –

фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 10– фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 11 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 12 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Pseudomonas denitrificans* з використанням мальтозного сиропу як джерела вуглецю, в результаті його катаболізму утворюється ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Вітамін В₁₂ складається з двох частин нуклеотидної та порфіринової. Основою нуклеотиду є 5,6-диметилбензімідазол (міститься тільки у складі вітаміну В₁₂). Для синтезу більшої кількості вітаміну В₁₂ потрібно добавляти в середовище 5,6-диметилбензімідазол.

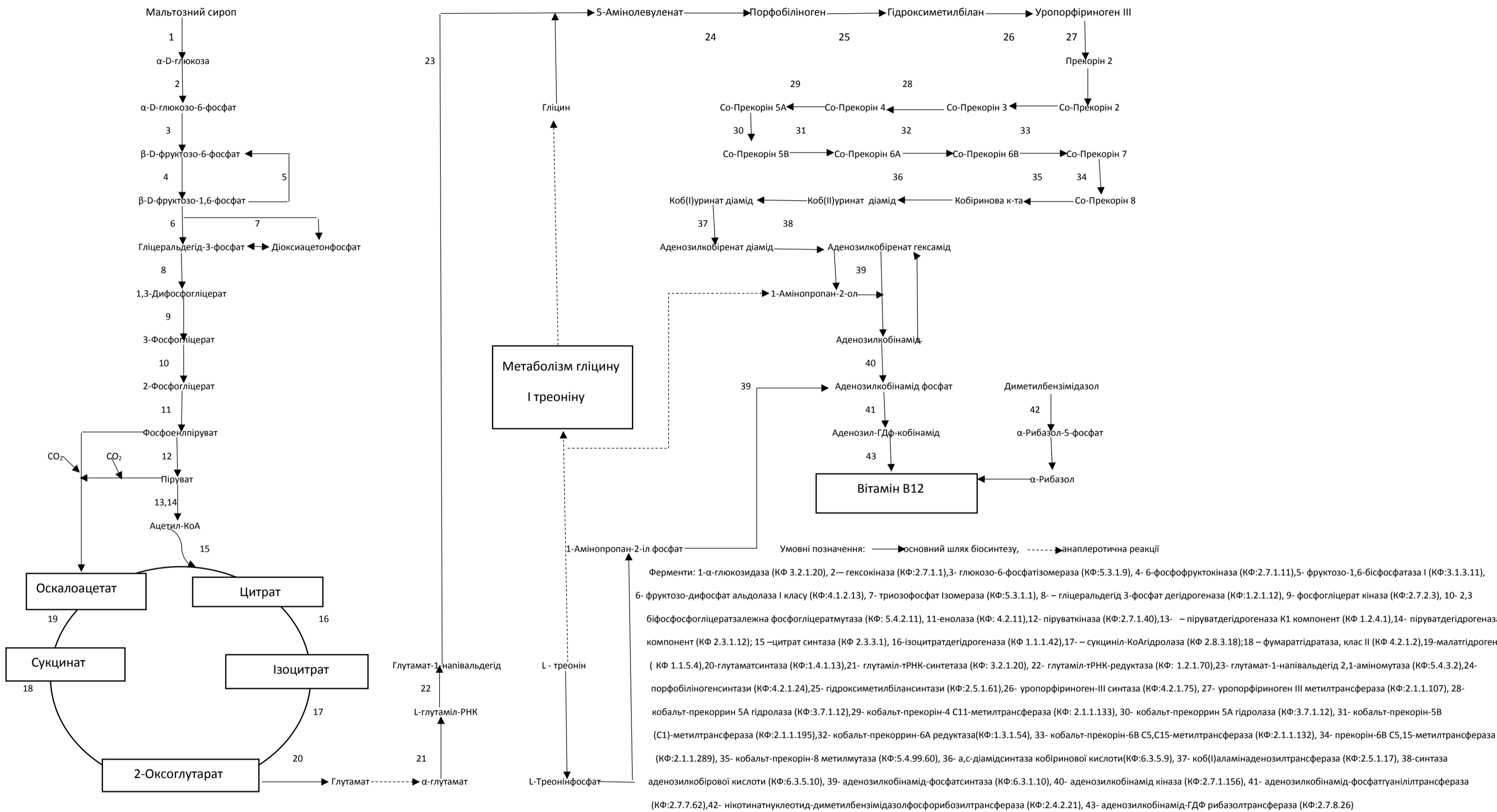
Попередником вітаміну В₁₂ є амінолевулінова кислота. Попередниками амінолевулінової кислоти є глутамат-1-напівальдегід та гліцин. Перший утворюється з 2-оксоглутарату глутаматсинтазою (КФ:1.4.1.13). 2-Оскоглутарат є інтермедіатом ЦТК.

З амінолевулінової кислоти утворюється уропорфіриноген III уропорфіриноген-III синтазою (КФ:4.2.1.75). Уропорфіриноген III є попередником прекоріну, фермент - уропорфіриноген III метилтрансфераза

(КФ:2.1.1.107). В результаті декількох перетворень з прекоріну утворюється Со-прекорін. Останній є попередником кобіринової кислоти, фермент- кобальт-прекорін-8 метилмутаза (КФ:5.4.99.60). З кобіринової кислоти утворюється коб(II)уринат діамід ферментом а,с-діамідсинтаза кобіринової кислоти (КФ:6.3.5.9). Коб(II)уринат діамід є попередником коб(I)уринат діамід. З останнього під дією коб(I)аламінаденозилтрансферази (КФ:2.5.1.17) утворюється аденозилкобіренат діамід. В свою чергу аденозилкобіренат діамід утворює аденозилкобіренат гексамід, фермент синтаза аденозилкобірової кислоти (КФ:6.3.5.10). В результаті ферментативної дії аденозилкобінамід-фосфатсинтаза (КФ:6.3.1.10) та при

додаванні 1-амінопропан-2-олу з аденозилкобіренат гексаміду утворюється аденозилкобінамід. Останні в результаті декількох перетворень утворює аденозил-ГДФ-кобінамід, який в свою чергу утворює вітамін В₁₂ аденозилкобінамід-ГДФ рибазолтрансферазою (КФ:2.7.8.26). Як зазначалося на початку, в середовище додається 5,6-диметилбензімідазол, який в результаті дії ферменту нікотинатнуклеотид-диметилбензімідазол фосфорибозилтрансфери (КФ:2.4.2.21) утворює α -рибазол-5-фосфат. Останній включається в молекулу вітаміну В₁₂.

Схема біотрансформації ростового субстрату в кінцевий продукт



РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Бактерію *Pseudomonas denitrificans* культивують періодичним, а не безперервним методом, оскільки останній має певні недоліки:

Вимивання поживного середовища: У безперервному культивуванні поживні речовини постійно додаються, що може призвести до вимивання того, що не було використано бактеріями до кінця.

Втрата цільового продукту: У безперервному культивуванні цільовий продукт може вимиватися разом з невикористаними поживними речовинами.

Для культивування *P. denitrificans* використовують глибинний спосіб культивування. Тому що глибинний метод культивування є більш досконалим у порівнянні з поверхневим. При цьому мікроорганізми ростуть і розвиваються у всьому обсязі живильної середовища, а не тільки на її поверхні.

Наш продуцент – аероб, а тому росте за присутності кисню. Тому для процесу ферментації потрібний барботер для подачі повітря.

Для культури *Pseudomonas denitrificans* не потрібне інтенсивне перемішування. Оптимальна швидкість мішалки становить 180 об/хв, що може бути досягнуто за допомогою звичайної лопатевої мішалки. [11].

Оптимальним рівнем температури вважається 25 °С. За такого режиму може рости велика кількість мезофільних біологічних агентів. Тому, існує потреба у створенні стерильних умов культивування.

Культивування буде проводитися з підживлення, так як концентрація субстрату дорівнює 200 г.

					НУХТ БТЕК 04.03.32 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піхало В. О.			Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т. Л.					43	116
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

5.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Pseudomonas denitrificans є аеробом, тому процес ферментації проходить за безперервної подачі стерильного аераційного повітря через барботер.

Існує два основних принципи очищення та стерилізації повітря:

Умертвіння мікроорганізмів: Цей принцип використовує методи, що руйнують структуру та життєздатність мікроорганізмів. До таких методів належать:

Вплив високих температур: Сюди входять методи, такі як пастеризація та стерилізація гарячим повітрям, які знищують мікроорганізми за допомогою тепла.

Ультрафіолетове (УФ) випромінювання: УФ-випромінювання з довжиною хвилі 254 нм руйнує ДНК мікроорганізмів, що призводить до їх загибелі.

Іонізуюче випромінювання: Гамма-випромінювання та рентгенівські промені також мають летальну дію на мікроорганізми, руйнуючи їх ДНК.

Хімічні агенти: Деякі хімічні речовини, такі як фенол, ртуть та їх похідні, можуть вбивати мікроорганізми.

Промивання повітря лужними або кислотними розчинами: Пропускання повітря через 10% розчин лугу або 15-20% розчин кислоти в спеціальних вежах може нейтралізувати та знищити мікроорганізми. Використання хімічних агентів, що стерилізують, неприпустимо, тому що сліди їх в апаратах і середовищах можуть впливати негативно на розвиток мікроорганізмів-продуцентів. Використання методу впливу сухого тепла для стерилізації повітря при температурі до 300°C ефективно вбиває мікрофлору, але економічно не виправдано. У мікробіологічній промисловості найпоширенішим методом стерилізації повітря є фільтрування через волокнисті або зернисті матеріали. Ефективність цього методу залежить від кількох факторів: Ступінь забруднення повітря: Чим більше забруднене повітря, тим менш ефективним

буде фільтрування. Розмір мікроорганізмів: Більшість мікроорганізмів мають розмір від 0,01 до 25 мкм. Розмір часток пилу: Мікроорганізми зазвичай осідають на частки пилу. Чим більші ці частинки, тим легше їх уловити фільтром.

Якість фільтруючого матеріалу: Різні фільтруючі матеріали мають різну ефективність уловлювання мікроорганізмів. Вміст бактеріальних забруднень у повітрі в середньому становить 1000- 1500 клітин в 1 м^3 , але воно може підніматися до 10^4 . Крім мікроорганізмів у повітрі є пил органічної й неорганічної природи, пари води, і загальна кількість сторонніх часток може досягти 10^9 в 1 м^3 [25].

Повітря в приміщенні та апаратах забруднюється механічними частинками та краплями мастила в результаті роботи потужних компресорів. Це забруднення виникає з двох основних причин: тертьових деталей і краплів мастил при використанні поршневих компресорів. При фільтрації повітря відбувається також його очищення від цих механічних домішок. При поверхневому культивуванні вимоги до стерильності повітря менш тверді, чим при глибинному, і навіть допускається рециркуляція, що аерується. Підготовка повітря для аерації при поверхневому культивуванні проводиться у відділенні кондиціонування повітря, що звичайно розташовується над ростовими камерами. Цей процес складається з наступних послідовних операцій: очищення повітря від грубих механічних суспензій; попереднє кондиціонування повітря до певної температури; подача повітря в головний вентилятор; тонке очищення повітря від мікроорганізмів і остаточне очищення в індивідуальному фільтрі. При поверхневому способі культивування 90 % повітря, що відходить із ростових камер, надходить на рециркуляцію через індивідуальний кондиціонер, а 10 % після попереднього знепліднення повертається в атмосферу[25].

Для стиснення та нагнітання повітря використовуються два основних типи компресорів: Поршневі компресори:

Переваги:

Високий коефіцієнт корисної дії (ККД).

Прості в роботі та обслуговуванні.

Невисока вартість

Недоліки:

Невелика продуктивність.

Забруднюють повітря маслом.

Високий рівень шуму.

Зношення деталей, що потребує регулярного ремонту.

Турбокомпресори:

Переваги:

Висока продуктивність.

Чисте повітря на виході.

Низький рівень шуму.

Довговічність.

Недоліки:

Більш складні в роботі та обслуговуванні.

Вища вартість.

Менший ККД, ніж у поршневих компресорів [25].

Після компресора, де повітря стискається і значно нагрівається, воно проходить через холодильник. Цей етап необхідний для охолодження повітря до температури нижче точки роси, щоб видалити з нього зайву вологу. Це робиться для того, щоб запобігти утворенню конденсату в трубопроводах і

фільтрах, що може призвести до їх засмічення та порушення роботи системи. Далі повітря проходить через ресивер або систему посудин. Ресивер - це ємність, яка використовується для вирівнювання тиску в системі і забезпечення рівномірної подачі повітря на фільтри. У деяких випадках замість одного великого ресивера можуть використовуватися кілька менших посудин. Далі повітря прямує на знепліднення спочатку в головний, а потім в індивідуальні фільтри [25].

Це може бути корисно для систем з великою кількістю точок споживання повітря. [25].

Повітря, що відводиться з ферментатора після аерації культури, що росте очищається в системі фільтрів і викидається в атмосферу [25].

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Мийні та дезінфікуючі застосовуються для обробки поверхні, рук персоналу та при прибиранні – звичайному та генеральному. Рекомендується чергувати засоби кожні 1-3 місяці, щоб бактерії не звикали до них.

На ринку України представлені наступні мийні та дезінфікуючі засоби.

Полідез. Засіб дезінфекційний.

Фірма-виробник ТОВ Науково-технологічний центр "Вербена" (Україна).

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас.
полігексаметиленгуанідин гідрохлорид (ПГМГ ГХ) 1,5%,
алкілдиметилбензиламонію хлорид (ЧАС) 1,5%, Допоміжні компоненти лужний компонент у перерахунку на гідроксид натрію рН 9±2%, барвник, ароматизатор та вода до 100% [26].

Дезінфекційний засіб "Полідез" має бактерицидні (включаючи збудників туберкульозу), віруліцидні (включаючи віруси гепатиту, ВІЛ) та фунгіцидні властивості (включаючи дерматофіти та плісняві гриби) [26].

Засіб призначений для використання на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, харчової промисловості [26].

Мікробак форте. Засіб дезінфекційний.

Фірма-виробник – BODE Chemie GmbH (Німеччина).

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас %: діючі речовини: бензил-С12-18-алкілдиметиламоній хлорид – 18,6-21,2; N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан -1,3-діамін– 4,5-5,5; допоміжні речовини: детергенти, інгібітор корозії, регулятор піноутворення, гідротропна речовина, ароматизатор, вода – до 100,0 [27].

Цей засіб призначений для дезінфекції різних поверхонь (вікна, підлога, стіни,

обладнання) та інвентарю шляхом протирання.. Не пошкоджує об'єкти та не викликає корозію [27].

Робочий розчин готують концентрацією 0,25%[27].

Делаксон. Засіб дезінфекційний.

Виробник: ТОВ «Делана» (Україна)

Засіб на основі оцтової і пероцтової кислоти.

«Делаксон» володіє *бактерицидними, фунгіцидними, віруліцидними, туберкулоцидними і спороцидними* властивостями [28].

Засіб використовують для дезінфекції різних поверхонь (вікна, підлога, стіни, обладнання). Робочі розчини цього дезінфекційного засобу безпечні для:

Об'єктів з корозійностійкого металу: сталь, нержавіюча сталь, алюміній та інші.Скляних предметів: лабораторний посуд, дзеркала, лінзи тощо. Виробів з гуми: рукавички, трубки, ущільнення тощо. Предметів з полімерних матеріалів:

пластикові контейнери, упаковки, інструменти тощо. Дерев'яних поверхонь: меблі, столи, полиці тощо. Кахлю, порцеляни та фаянсу: плитка, сантехніка, посуд тощо. Поверхні медичних приладів: термометри, стетоскопи, хірургічні інструменти тощо. Устаткування з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям: медичні меблі, лабораторні прилади, промислове обладнання тощо[28].

Препарат відноситься до 4 класу малонебезпечних речовин при нанесенні на шкіру, екологічно чистий, не потребує утилізації.

Робочий розчин готують концентрацією 1,0% [28].

Для визначення поверхонь, які мають митись та дезинфікуватись, скористаємось специфікацією обладнання, де вказані його габаритні розміри. У ферментаційному відділенні встановлені інокулятор, посівний апарат та виробничий ферментер. Загальна площа приміщення, де встановлено дане обладнання становить 7 м × 5 м. Враховуючи, що поверхня стін даного приміщення теж підлягає миттю та дезінфекції на висоту 1,8 м, загальна площа обробки складе

$$F = (7\text{м} * 5\text{м}) + (7\text{м} + 7\text{м} + 5\text{м} + 5\text{м}) * 1,8 = 78,2 \text{ м}^2$$

Узагальнена характеристика витрат миючих та дезинфікуючих засобів для виробництва вітаміну В₁₂

Таблиця 5.1

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Витрати роб.розчину, л/м ²	Ефективність використання дез.розчину, Е _{дз} , Грн/м ²
«Мікробак форте»	Поверхні приміщень та обладнання	0,25	656	1,64	0,1	12,8
«Делаксон».	Поверхні приміщень та обладнання	1,0%	174	1,74	0,1	13,6
«Полідез»	Поверхні приміщень та обладнання	0,5	240	1,20	0,1	9,4

Критерієм вибору є мінімальна вартість обробки 1м² поверхні $E_f = \sum F \times D_{дз} \times V_{дз}$, Грн/м² min, де $\sum F$ – сумарна площа, що обробляється

дез.розчинами; м² ; Dдз – витрати дез.розчину на 1 м² поверхні, л/м²; Вдз– вартість 1 л дез.розчину, Грн/л.

Враховуючи результати розрахунку у Таблиці 2.1, обираємо у якості найбільш ефективного дезінфікуючого засобу «Полідез». Слід зауважити, що з часом слід змінювати типи дезінфікуючих засобів, оскільки йде адаптація сторонньої мікробіоти до вибраного дезінфікуючого засобу. Як альтернативу можна використовувати засіб «Альфадез». «Альфадез» – це прозора рідина світло-жовтого кольору зі слабким специфічним запахом. Вона містить комплекс четвертинних амонієвих сполук (ЧАС) у концентрації 15% та полігексаметиленгуанідину гідрохлорид (ПГМГ) у концентрації 6%, а також поверхнево-активні речовини та інші допоміжні компоненти. Рівень рН засобу – 6. «Альфадез» володіє антимікробною активністю проти широкого спектру грамнегативних і грампозитивних мікроорганізмів, включно з тими, що викликають туберкульоз, а також особливо небезпечні інфекції, такі як чума, холера, туляремія та легіонельоз. Засіб також ефективний проти грибів роду *Candida*, дерматофітів та різних вірусів, включаючи поліомієліт, гепатит В та ВІЛ. «Альфадез» також має миючі та дезодоруючі властивості [29].

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

З метою одержання вітаміну В₁₂ використовують поживне середовище, що містить наступні складові (г/л) [11]:

Мальтозний сироп – 150,

Кукурудзяний екстракт – 40,

Бетаїн – 20,

(NH₄)₂SO₄ – 1,

MgSO₄ – 1,5;

$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,75;$

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,08;$

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,14;$

$\text{DMBI} - 0,075.$

Провівши перевірочний розрахунок складу поживного середовища, вміст джерела вуглецю, а саме мальтозного сиропу буде становити 150 г/л, хоча в основній статті його концентрація дорівнює 260 г/л.

Так як, мальтозний сироп, кукурудзяний екстракт, бетаїн та 5,6-диметилбензімідазол стерилізують за однакових умов – 112°C при тиску 0,05 МПа протягом 30 хв, зважаючи на чутливість цих компонентів до дії високих температур. Однак вищезазначену кількість мальтозного сиропу не можна одразу подавати до поживного середовища, тому після додавання початкової кількості субстрату (50 г/л) будемо здійснювати підживлення культури мальтозним сиропом у процесі культивування (150-50=100 г/л). Підживлення буде здійснюватись протягом культивування, оскільки процес вирощування триває 180 годин, кожні 30 годин доза підживлення становитиме 20 г/л.

Виробничий біосинтез ціанокобаламіну буде проходити у ферментері об'ємом 3 м³, коефіцієнт заповнення – 0,6. Підготовка посівного матеріалу буде проходити у три етапи (в колбах на качалці, інокуляторах 30 та 300 л).

Стерилізацію поживного середовища для отримання інокуляту в колбах на качалках здійснюють в автоклаві, оскільки об'єм середовища разом з інокулятом на цьому етапі становить 1,8 л.

Приготування та стерилізацію мальтозного сиропу для підживлення здійснюють в окремому реакторі, з якого сироп буде надходити до ферментера порційно в ході виробничого процесу. Кукурудзяний екстракт, бетаїн та 5,6-диметилбензімідазол для виробничого біосинтезу об'єднують в одну композицію, готують та стерилізують разом у відповідному реакторі.

Для встановлення особливостей підготовки приготування композицій поживного середовища та підбору відповідного обладнання, далі проведемо розрахунок кількостей складових компонентів середовища на кожну технологічну стадію для одержання вітаміну B_{12} – див. табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Розрахунок компонентів поживного середовища для біосинтезу вітаміну В₁₂

Об'єм середовища, л	Мальтозний сироп підживлювальний		Композиція А	6% розчин НСІ		6% розчин NaOH	
	Вміст, кг	Особливість приготування	Особливість приготування	Об'є м, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Ємність для зберігання
1,8	0,072	-	У колбі 2 л	-	-	-	-
16,2	0,64	-	Реактор 10 л	32,4	Реактор 5 л	32,4	Реактор 5 л
162	6,48	-	Реактор 40 л	324		324	
1620	243	-	Реактор 400 л	3240		3240	
	250	Реактор 500 л	-				

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

З огляду на склад поживного середовища, розділимо компоненти поживного середовища на композиції за температурними режимами стерилізації.

Але так як DMBI, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ є попередниками вітаміну B_{12} , тому ці компоненти будуть добавлятися лише в склад середовища для біосинтезу вітаміну, тобто лише в ферментер.

Композиція А: мальтозний сироп, кукурудзяний сироп, бетаїн, (30 хв при температурі $112\text{ }^\circ\text{C}$, $P=0,05\text{ МПа}$).

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (40 хв при температурі $131\text{ }^\circ\text{C}$, $P= 0,15\text{ МПа}$).

Композиція В: KH_2PO_4 (40 хв при температурі $131\text{ }^\circ\text{C}$, $P= 0,15\text{ МПа}$).

На технічних вагах зважують мальтозний сироп, кукурудзяний сироп, бетаїн, додають воду питну, колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 30 хв при температурі $112\text{ }^\circ\text{C}$. Складові компоненти композиції А стерилізують за вищевказаних умов зважаючи на чутливість цих компонентів до дії високих температур. Композиції Б та В, представлені солями, стерилізують окремо в автоклаві для попередження випадіння в осад нерозчинного фосфату магнію.

Таблиця 5.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент	Вміст , г/л	Кількість для приготування 1800мл, середовища	Композиці я	Об'єм композиції, мл
Мальтозний сироп	50	72	А	1000
Кукурудзяний екстракт	40	72		
Бетаїн	20	36		
Вода		820		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	1,8	Б	600
MgSO ₄	1,5	2,7		
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,08	0,14		
Вода		595,36		
КН ₂ РО ₄	0,75	1,35	В	200
Вода		198,65		

5.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівних апаратах 30 л та 300 л

Стерилізація 16,2 та 162 л поживного середовища буде проходити у реакторах та інокуляторах з підкисленням, тому композиції Б та В об'єднуюмо.

Композиція А: мальтозний сироп, кукурудзяний сироп, бетаїн, (30 хв при температурі 112 °С, P=0,05 МПа).

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (1 год при температурі 131°C, рН 4,-4,5).

За допомогою об'ємно-вагового дозатора мальтозний сироп, кукурудзяний сироп, бетаїн, подають у реактор, додають воду питну, вмикають перемішуючий пристрій, стерилізують протягом 30 хв за температури 112°C. Складові компоненти композиції А стерилізують за вищевказаних умов зважаючи на чутливість цих компонентів до дії високих температур. Композицію Б готують та стерилізують у інокуляторах, попередньо підкисливши 6%-го розчином НСІ для попередження випадіння в осад нерозчинного фосфату магнію.

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 16,2 л поживного середовища

Компонент	Вміст , г/л	Кількість для приготування на 16,2 л, г середовища	Композиція	Об'єм композиції, л
Мальтозний сироп	50	648	А	2,2
Кукурудзяний екстракт	40	648		
Бетаїн	20	324		
Вода		2		

Закінчення таблиці 5.3

Конденсат		0,2		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	16,2	Б	14
MgSO ₄	1,5	24,3		
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,08	1,29		
KH ₂ PO ₄	0,75	12,15		
Вода		12,6		
Конденсат		1,4		
Разом		16,2		

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 162 л поживного середовища

Компонент	Вміст , г/л	Кількість для приготування на на 162 л, г середовища	Композиція	Об'єм композиції, л
Мальтозний сироп	50	6480	А	22
Кукурудзяний екстракт	40	6480		
Бетаїн	20	3240		
Вода		20		

Закінчення таблиці 5.4

Конденсат		2		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	162	Б	140
MgSO ₄	1,5	243		
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,08	12,9		
KH ₂ PO ₄	0,75	121,5		
Вода		126		
Конденсат		14		
Разом		162		

5.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері 3 м³

Стерилізація 1620 л поживного середовища буде проходити у реакторі та ферментері з підкисленням.

Композиція А: мальтозний сироп, кукурудзяний сироп, бетаїн, DMBI (30 хв при температурі 112 °С, P=0,05 МПа).

Композиція Б: (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, ZnSO₄•7H₂O, CoCl₂•6H₂O, KH₂PO₄ (1 год при температурі 131°С, рН 4,-4,5).

За допомогою об'ємно-вагового дозатора мальтозний сироп, кукурудзяний сироп, бетаїн, DMBI подають у реактор, додають воду питну, вмикають перемішуючий пристрій, стерилізують протягом 30 хв за температури 112°С. Складові компоненти композиції А стерилізують за вищевказаних умов зважаючи на чутливість цих компонентів до дії високих температур. Композицію Б готують та стерилізують у ферментері, попередньо підкисливши

6%-го розчином HCl для попередження випадіння в осад нерозчинного фосфату магнію.

Таблиця 5.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1620 л поживного середовища

Компонент	Вміст, г/л	Кількість для приготування на на 1620 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Мальтозний сироп	150	243	А	220
Кукурудзяний екстракт	40	64,8		
Бетаїн	20	32,4		
DMBI	0,075	0,12		
Вода		200		
Конденсат		20		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	1,62	Б	1400
MgSO ₄	1,5	2,43		
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,08	0,12		
CoCl ₂ •6H ₂ O	0,14	0,22		
KH ₂ PO ₄	0,75	1,2		
Вода		1260		

Конденсат	140		
Разом	1620		1620

5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Перед початком культивування необхідно відкоригувати рН культурального середовища за допомогою 6%-их розчинів соляної кислоти (HCl) та гідроксиду натрію (NaOH). Додавати хлоридну кислоту перед стерилізацією композиції Б необхідно, щоб унеможливити випадіння осадів фосфорних солей Магнію, під час нагрівання розчину солей в апараті. Оскільки оптимальним значенням рН для культури цього біологічного агента є 7,0, необхідно відкоригувати його до цієї величини розчином NaOH, який додається вже безпосередньо під час процесу культивування посівного матеріалу та *Pseudomonas denitrificans* у виробничому ферментері.

Розчини титрувальних агентів – 6% розчини соляної кислоти та гідроксиду натрію для вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу ціанокобаламіну готують у реакторах об'ємом 5 л

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки посівного матеріалу, включає такі додаткові стадії:

- підготовка аераційного повітря та очистка відпрацьованого;
- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації композицій в інокуляторах об'ємом 30 та 300 л та ферментері 3 м³;
- приготування 6% розчину NaOH для нейтралізації середовища при вирощуванні продуцента ціанокобаламіну в інокуляторах об'ємом 30 та 300 л та ферментері 3 м³;

- приготування та стерилізація запасного розчину мальтозного сиропу для підживлення *Pseudomonas denitrificans* при виробничому біосинтезі у ферментері 3 м³.

Реалізація вищеописаних процесів буде проходити з використанням такого обладнання:

- для приготування 6% розчину HCl об'ємом 5 л;
- для приготування 6% розчину NaOH об'ємом 5 л;
- для приготування та стерилізації підживлювального розчину мальтозного сиропу об'ємом 500 л;
- для приготування та стерилізації композиції А: об'ємом 10, 40, 400 л.

5.6. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

5.6.1 Вибір стадій виділення та очищення вітаміну В₁₂

Процес виділення та очищення В₁₂ включає етапи: відділення біомаси від культуральної рідини, дезінтеграція бактеріальних клітин, екстракція ціанокобаламіну, концентрування розчину, висушування ціанокобаламіну.

5.6.2 Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання

Існують різні методи відокремлення біомаси *Pseudomonas denitrificans* від культуральної рідини, такі як сепарування, центрифугування та фільтрування. Сепарування, хоча не призводить до втрати біомаси, вимагає складного та дорогоцінного обладнання, а висока температура може призвести до швидкого зношення. Фільтрування є простим, але призводить до втрат біомаси та налипання клітин на фільтрі. Центрифугування має високу продуктивність, низькі втрати та можливість регулювання параметрів, але вимагає дорогоцінного обладнання.

Для відділення біомаси від культуральної рідини ефективним є використання стрічкового вакуум фільтра, тому що фільтр може видаляти високий відсоток вологи, що в подальшому полегшує наступні етапи виробництва. Також, неавтоматизоване вилучення осаду виявляється непрактичним через великий об'єм культуральної рідини та біомаси. Однак стрічковий фільтр дозволяє легко відрізати осад ножом і відразу переносити його у відповідну тару. Таким чином, для відокремлення біомаси *Pseudomonas denitrificans* від культуральної рідини найбільш вигідним варіантом буде використання промислового стрічкового вакуум-фільтра BRF 120 [30].



Рис. 5.1. Стрічковий вакуум-фільтр BRF 120

Процедура починається з інактивації культуральної рідини, що відбувається шляхом нагрівання її до температури $(75\pm 5)^{\circ}\text{C}$ протягом 10 хвилин [31].

5.6.3 Обґрунтування вибору способу дезінтеграції клітин та відповідного обладнання

На другому етапі виділення ціанокобаламіну руйнуються клітинні оболонки бактерій, щоб вивільнити цільовий продукт, який міститься всередині них. Цей процес відомий як дезінтеграція біомаси. Руйнування клітин – це процес

отримання внутрішньоклітинної рідини за допомогою методів, які відкривають клітинну стінку.

Методи руйнування клітин можна класифікувати на механічні методи та немеханічні методи.

Немеханічні методи:

Фізичні методи

1. Заморожування-розморожування

- Підходить для роботи з м'яким рослинним матеріалом і водоростями.
- Порушення досягається за допомогою серії циклів заморожування та відтавання.
- Заморожування утворює кристали льоду, які розширюються при розморожуванні, що в кінцевому підсумку призводить до розриву клітинної стінки.

2. Мікрохвильова піч/ Термоліз

- Мікрохвильова піч (разом з автоклавом та іншими високотемпературними методами) використовується для розриву зв'язків у клітинних стінках, а також для денатурації білків.
- Однак неконтрольована кількість тепла може легко денатурувати або пошкодити цільові білки та речовини.

3. Осмотичний шок

- Через процес осмосу вода може переміщатися в клітину, що призводить до збільшення її об'єму до такого рівня, що вона лопається.
- Однак метод може працювати лише з клітинами тварин і найпростішими, оскільки вони не мають клітинних стінок.

4. Електричні розряди

- Також можна досягти руйнування клітин за допомогою електричних розрядів у клітинах ссавців та інших клітинах, які обмежені лише плазматичними мембранами.

Хімічні методи

Вони часто використовуються з рослинними клітинами (іноді в поєднанні зі зрізанням).

Органічні розчинники, такі як толуол, ефір, бензол, метанол, поверхнево-активні речовини та фенілетиловий спирт ДМСО, можна використовувати для проникнення клітинних стінок.

Ферментативні методи

- Ще одна стратегія досягнення лізису клітин полягає у використанні травних ферментів, які розкладають стінку мікробної клітини.
- Різні типи клітин і штами мають різні типи клітинних стінок і мембран, і, таким чином, використовуваний фермент залежить від мікроба. Наприклад, лізоцим зазвичай використовується як фермент для перетравлення клітинної стінки грампозитивних бактерій. Лізоцим гідролізує β -1-4-глюкозидні зв'язки в пептидоглікані.

Механічні методи – це методи, які потребують певної сили для виділення внутрішньоклітинного білка без додавання хімічних речовин або ферментів [32].

1. Блендер
2. Бісерне биття
3. Ультразвук
4. Гомогенізація

Блендери

- Використання високошвидкісних міксерів можна використовувати для руйнування клітинних стінок.
- Це той самий процес, який використовується під час центрифугування, який розділяє або концентрує матеріали, суспендовані в рідкому середовищі.

Бісерне биття

- Скляні або керамічні кульки використовуються для розбивання відкритих клітин
- Механічний зсув є достатньо м'яким, щоб зберегти органи недоторканими.

Ультразвук

- Ультразвукові гомогенізатори працюють, викликаючи вібрацію в титановому зонді, зануреному в клітинний розчин.
- Відбувається процес, званий кавітацією, під час якого утворюються та вибухають крихітні бульбашки, створюючи локальну ударну хвилю та руйнуючи клітинні стінки зміною тиску.
- Цей метод дуже популярний для руйнування рослинних і грибкових клітин.

Гомогенізація

- Клітини лізуються шляхом продавлювання клітинної або тканинної суспензії через вузький простір
- Гомогенізатори використовують сили зсуву на комірці, подібно до методу кульок.
- Гомогенізацію можна здійснити, стиснувши клітини через трубку, яка трохи менша, ніж збивання кульок

Гомогенізація високого тиску зазвичай використовується для руйнування клітин, що є процесом руйнування відкритих клітин для вивільнення їхнього вмісту

Загалом, гомогенізатори високого тиску є потужними інструментами для руйнування клітин, і оскільки гомогенізатори високого тиску забезпечують кілька переваг для руйнування клітин:

- Здатність досягати високих рівнів руйнування: гомогенізатори високого тиску можуть досягати високого рівня руйнування клітин завдяки інтенсивним силам зсуву, створюваним силами високого тиску).
- Постійність результатів: гомогенізатори високого тиску можуть забезпечувати стабільні результати від партії до партії, що важливо для відтворюваності та масштабування.
 - Масштабованість: Гомогенізатори високого тиску є масштабованими, тобто їх можна використовувати як для невеликих лабораторних застосувань, так і для великомасштабного промислового виробництва. Можливість масштабування процесу дозволяє підвищити ефективність і заощадити кошти, оскільки більші обсяги матеріалу можна обробити за менший проміжок часу [33].

Зважаючи на те, що ціанокобаламін знаходиться всередині клітин, його виділення потребує руйнування клітинної оболонки. Для цього обираємо фізичний метод дезінтеграції – гомогенізацію високого тиску.

У даному процесі дезінтеграції використовуються гомогенізатори для подрібнення матеріалу на дрібніші частинки, які поділяють на ультразвукові, клапанні, дискові та відцентрові. Але ми вибираємо ультразвуковий гомогенізатор, так як вони є особливо безпечні для застосувань, де беруть участь термочутливі зразки [34].

5.6.4 Вибір способу виділення цільового продукту з дезінтеграту

Для виділення ціанкобаламіну з дезінтеграту найефективнішим методом є екстракція. Цей метод ґрунтується на принципі селективного розчинення ціанкобаламіну з дезінтеграту за допомогою спеціального розчинника, який називається екстрагентом.

Суть методу: під час екстракції з екстрагентом взаємодіють лише цільові компоненти, які бажано вилучити. Ці компоненти добре розчиняються в екстрагенті, на відміну від інших компонентів суміші, які розчиняються слабо або практично не розчиняються зовсім.

Переваги: перевагою екстракції є те, що вона не потребує значних енергетичних витрат і широко застосовується в біотехнології. Додатково, екстракцію можна проводити при підвищеній температурі, що може прискорити процес та покращити вихід цільових компонентів.

Для максимально повного вилучення вітаміну B_{12} використовується багатоступенева екстракція (це процес, у якому етапи екстракції повторюються з метою збільшення вилучення продукту). Цей процес передбачає повторення екстракції 2-3 рази, доки розчин не стане абсолютно прозорим. Це гарантує практично повне вилучення цільового компонента.

В якості екстрагенту використовується суміш фенолу та хлороформу або крезолу та трихлористого вуглецю[35]. Екстракція вітаміну B_{12} відбувається у спеціальних апаратах, які називаються екстракторами. Важливим фактором для ефективного вилучення вітаміну є вибір екстрактора з перемішуючим пристроєм. Чим краще перемішуються фази (водний розчин і екстрагент), тим продуктивніше буде проходити процес екстракції. Тому обираємо змішувально-відстійний екстрактор. Цей тип екстрактора забезпечує одночасне перемішування та розшарування фаз в одному апараті.

Переваги змішувально-відстійних екстракторів:

- Компактність: Вони займають меншу площу та мають менші габаритні розміри, порівняно з іншими типами екстракторів.
- Економічність: Ці екстрактори мають незначну металоємність, що робить їх більш економічними у виробництві.
- Стійкість до домішок: Вони менш чутливі до наявності механічних домішок у рідинах, які можуть забивати насадку та отвори тарілок в інших типах екстракторів.

Важливо зазначити, що вибір типу екстрактора та умови проведення процесу залежать від конкретних характеристик цільового компонента, вихідної суміші та необхідного ступеня очищення [36].

5.6.5 Вибір способу концентрування та відповідного обладнання

Після екстракції вітаміну B_{12} з вихідної суміші наступним етапом є його концентрування. Цей етап має на меті збільшити вміст вітаміну в розчині за рахунок зменшення кількості води. Для концентрування вітаміну B_{12} використовуються ті ж методи, що й для його виділення з нативного розчину. Але процес фільтрації не є доцільним в цьому випадку. Фільтрація може бути дорогим процесом, що робить його нерентабельним для концентрування вітаміну B_{12} . Фільтрація може бути повільним процесом, що може призвести до втрат вітаміну B_{12} через розкладання або адсорбцію на мембрані. Метод випарювання є ефективним способом очищення та кристалізації речовин. Це відбувається завдяки видаленню розчинника, що призводить до насичення розчину та осадження розчиненої речовини у формі кристалів.

Випарювання - це процес, який веде до зменшення кількості леткого розчинника і, відповідно, до збільшення концентрації нелетких речовин. У більшості випадків випарювання проводять при інтенсивному нагріванні, щоб рідина закипіла і розчинник перетворився на пару. Однак, для збереження цінних діючих речовин, випарювання з кипінням рідини

рекомендується проводити в спеціальних установках. Ці установки працюють за принципом вакууму, де вторинна пара, що утворюється над рідиною, постійно видаляється з робочої зони апарату (випарника). Це створює розрідження (вакуум) і знижує температуру кипіння до 40-55°C. Випаровування під вакуумом має ряд суттєвих переваг:

Зниження температури кипіння розчину: Це робить процес більш щадним для цінних діючих речовин, які можуть бути чутливими до високих температур.

Уловлювання цінної вторинної пари: Цю пару можна використовувати повторно або очищати для збереження навколишнього середовища.

Можливість використання пари низького тиску для нагрівання випарного апарата: Це робить процес більш енергоефективним.

Зменшення необхідних розмірів випарного апарата: Завдяки зниженню точки кипіння рідини збільшується різниця температур між гріючою парою і рідиною, що обігрівається. Це дозволяє використовувати менші за розміром апарати. Тому, для концентрування вітаміну В₁₂ будемо використовувати процес вакуумного випарування.

В даному випадку, доцільно використовувати однокорпусну випарну установку, адже вона оптимально підходить для ситуацій з невисокою продуктивністю та періодичним режимом роботи [37].

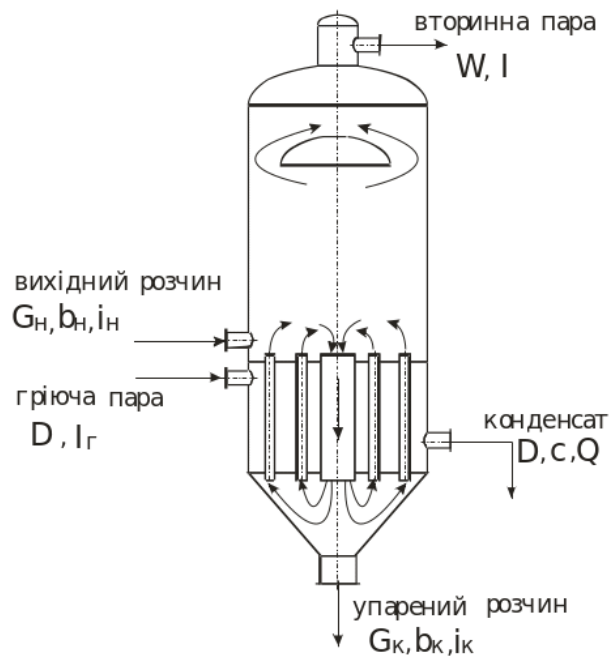


Рис 5.2. Однокорпусна вакуум випарна установка

5.6.6 Вибір способу сушіння та сушарки

Даний процес можна рахувати завершальним, при виробництві вітаміну B_{12} .

Існують різні методи сушіння такі як:

- сублимаційне сушіння
- конвективне сушіння
- терморадіаційне

При конвективному сушінні тепло, що потрапляє в сушарку разом з повітрям, швидко розсіюється і не має повної сили в результаті циркуляції повітря з високою швидкістю [38].

При сублимаційному сушінні деякі види сировини необхідно обробити перед сушінням, оскільки вони чутливі до процесу. Наприклад, щоб уникнути втрати кольору. Для ефективного збереження деякі ліофілізовані продукти потрібно зберігати при низьких температурах [39].

При терморадіаційному можуть виникати високі експлуатаційні та капітальні витрати, неконтрольовані викиди пилу та загрози безпеці, пов'язані з потенційними пожежами та вибухами [40].

Тому, для сушіння вітаміну В₁₂ будемо використовувати вакуум сушильну шафу. Вони універсальні для використання в лабораторіях, на виробництві, а також дозволяють швидко й дбайливо сушити чутливі вироби.

З вітаміну, висушеного до порошку або кристалів, можна приготувати розчин бажаної концентрації. Для цього його розчиняють у відповідному розчиннику[41].

5.6.7 Вибір товарної форми випуску вітаміну В₁₂ (упаковки)

Вітамін В₁₂ є важливою складовою кормових добавок для великої рогатої худоби. Цей вітамін використовується для підтримки їхнього здоров'я та оптимального функціонування. З метою забезпечення оптимального споживання та ефективності, він випускається у різних формах, таких як порошок, таблетки, капсули та інші. У випадку великої рогатої худоби, доцільним є випуск вітаміну В₁₂ у формі порошку. продукт представляє собою сипучий порошок[42].

Розглядаються різноманітні варіанти упаковки для вітаміну В₁₂, включаючи паперові пакети, поліетиленові пакети, скляні та металеві банки. Упаковка для продуктів тваринної годівлі має відповідати ряду вимог, включаючи міцність, щільність, вологостійкість, повітронепроникність, ароматійність та стійкість до механічних пошкоджень.

Скляні банки можуть бути привабливим варіантом, проте вони мають недоліки, такі як вразливість до розбиття, значна вага та висока ціна. Паперові пакети можуть пропускати вологу, що може вплинути на тривалість зберігання продукту. Металеві банки, хоча вони відповідають багатьом вимогам, також мають високу вартість, включаючи витрати на обладнання для їх запайки.

Очевидно, що різноманітні пластикові вироби найкраще відповідають усім вимогам. Продукт може бути упакований у щільні мішки з внутрішнім фольгованим шаром для захисту від вологи та неприємних запахів. Отже, у

даному випадку найбільш вигідним варіантом буде використання поліетиленових пакетів [43].



Рис 5.3 Поліетиленовий пакет

Поліетиленовий пакет з фольгованим шаром - це тип упаковки, який зазвичай використовується для зберігання продуктів, які потребують захисту від вологи, світла або запахів.

Пакування порошків може здійснюватися за допомогою різних методів. У напіваавтоматичному процесі може бути використаний шнековий і вакуумний дозатори. Це означає, що частина процесу (наприклад, завантаження порошку в пакет) автоматизована, але інші кроки, такі як закривання пакету, можуть вимагати втручання оператора.

Автоматичний метод передбачає використання спеціалізованих пакувальних апаратів, які здійснюють упаковку без прямого втручання оператора. Ці апарати можуть бути налаштовані на певний тип пакування, і вони зазвичай використовуються для великих обсягів виробництва [44].

Можна зрозуміти, що фасувально-пакувальний обладнання для виробництва вітаміну B_{12} є значно важчим і дорожчим, а також має обмеження в діапазоні зважування. Оскільки в чистоті продукту немає основної потреби в контексті виробництва вітаміну B_{12} , ми вирішили використати ваговий вібротковий дозатор прямого дії FOYER FZ-2000 (див. рисунок 3.4). Продукт фасують у

поліетиленові пакети з фольгованим шаром вагою по 15 мг, так норма на день для однієї корови 500 мкг, курс триває 30 днів[45]. Термін зберігання в сухому місці -12 місяців [46].



Рис.5.4. Дозатор ваговий FOYER FZ-2000

5.7 Методи ідентифікації цільового продукту

Концентрацію вітаміну в пробі пропонується визначати спектрофотометрично. Для цього проводять вимірювання оптичної густини в максимумі поглинання при довжині хвилі 361 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Вміст вітаміну визначають за формулою, яка розраховується за певними параметрами [47,48]:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot N \cdot 10^6}{A_0 \cdot V}$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 – оптична густина стандартного зразка ціанокобаламіну;

a_0 – наважка стандартного зразка ціанокобаламіну (у перерахунку на 100%),

Г;

N – розведення;

V – об'єм , узятий для аналізу, мл.

Для підготовки розчину стандартного зразка ціанокобаламіну близько 0,05 г (точна вага) стандартного зразка ціанокобаламіну поміщають в мірну колбу об'ємом 100 мл, додають 80 мл води, збовтують протягом 10 хвилин, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують. З отриманого розчину переносять 2,0 мл в мірну колбу об'ємом 50 мл, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують. При відсутності стандартного зразка ціанокобаламіну можна використовувати значення питомого показника поглинання ціанокобаламіну при довжині хвилі 361 нм, яке дорівнює 207 [49, 50].

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 3.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрязабірник	1	Проточні повітрязабірники серії 5.903-20 і 5.903-2, які належать до типу АІІ, встановлюються як горизонтально, так і вертикально. Виробник: Україна [51]
Ф – 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал – поліестер, швидкість фільтрування 3 м ³ /год, Е = 80 %[52].
К – 3	Компресор	1	Компресор серії «ВКП F Industrial». Кількість циліндрів/ступенів стиснення 2/2 Продуктивність, вхід л/хв 500 Продуктивність, вихід л/хв: 330 Тиск нагнітання (мах), атм 10 Потужність приводного електродвигуна, кВт 3,0 Напруга живлення, 380 Маса (кг) 122 Виробник: Україна[53].
ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Витрата: до 640 м ³ /год Робочий тиск: 140 атм. Температура: -195 °С- +220 °С Нержавіюча сталь AISI 316 Виробник: Швеція [54].
Р – 5	Ресивер	1	Виробник: ЗЕЛКО, Україна Робоче середовище: Повітря/азот Номинальний робочий тиск: 11,5 бар Габаритні розміри: Діаметр х Довжина 638 х 1800 мм [55].

					НУХТ БТЕК 04.03.32 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піхало В. О.			Розділ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т. Л.					73	119
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Продовження табл. 6.1

ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	1	Кількість повітря, м ³ /год: 7500 Необхідна теплова потужність, кВт (від –100С до +200С): 80 кВт Виробник: Україна[56].
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтри повітряні касетні є найбільш часто використовуваним типом фільтра для систем вентиляції та кондиціонування повітря в промислових приміщеннях. Фільтрувальний матеріал: міроскловолокно; E>95% [57].
33-8	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об'ємом 5л. Корпус обладнаний верхньою якірною мішалкою з розвинутою поверхнею перемішування із плаваючими шкребками з тефлону й зовнішнім контуром циркуляції продукту. Вивантаження готового продукту проводиться при знижених оборотах гомогенізатора й перемиканні руху продукту з контуру циркуляції на вигрузочний патрубок. Матеріал AISI 316L. Виробник: Україна [58].
33-11 33-18	Збірник - змішувач	2	Реактор нержавіючий 300л із сорочкою нагріву. Оснащений мішалкою та диспергатором для перемішування продукту. Кришка піднімається пневмоциліндрами, виготовлений зі сталі AISI 316L. Виробник: Україна [59].
33-15	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об'ємом 30л. Технічні характеристики: Матеріал скла - GG-17 (ТЗ); Матеріал рами - Нержавіюча сталь марки 304; Метод переміщення - Універсальні колеса з ножним гальмом; Місткість - 30л; Обсяг оболонки - 10л; Реакційна кришка - 5+1 портів; Відстань між отвором розвантажувального клапана і підстави - 450мм; Діапазон робочих температур - -120 - 300°C; Ступінь вакуумизации - 0.098 Мпа; Швидкість перемішування - 0 - 600 об./хв; Діаметр вала перемішування (мм) - 12 мм; Потужність двигуна (Вт) - 90; Харчування,(Напруга / частота) - 220 В / 50 Гц;.Виробник: Україна [60].

P3-9	Реактор - змішувач	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 5л. Технічні характеристики: JGR-5 л Матеріал скла - GG-17 (TC); Матеріал рами – Нержавіюча сталь марки 304; Метод переміщення - Універсальні колеса з ножним гальмом; Місткість – 5л; Об'єм оболонки - 2л; Реакційна кришка – 5 портів; Відстань між отвором розвантажувального клапана та основи - 30 мм; Діапазон робочих температур -120-300°C; Ступінь вакуумізації – 0.098Мпа; Швидкість перемішування - 0 - 600 об/хв; Діаметр валу перемішування (мм) – 8 мм; Потужність двигуна - 180 (Вт) Живлення, (Напруга / частота) - 220 В / 50 Гц; Розмір установки (мм*мм*мм) – 350*410*1250; Виробник: Україна [61].</p>
P3-10	Реактор - змішувач	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 400л. Корпус обладнаний верхньою якірною мішалкою з розвинутою поверхнею перемішування із плаваючими шкребками з тефлону й зовнішнім контуром циркуляції продукту. Вивантаження готового продукту проводиться при знижених оборотах гомогенізатора й перемиканні руху продукту з контуру циркуляції на вивантажувальний патрубок. Матеріал AISI 316L. Виробник: Україна [62].</p>
ОВД – 13	Об'ємно-ваговий дозатор	1	<p>Дозатор марки ДВСВ-50. Дозатор напівавтоматичний (гравітаційного типу). Виробник: Україна[63].</p>

Продовження табл. 6.1

P3-12	Реактор - змішувач	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 500л. Реактор 500 літрів може мати наступні характеристики і комплектацію: Виробництво за стандартами GMP Виробництво з кислотостійкої сталі AISI 316L або з харчової неіржавкої сталі AISI 304. Сорочка для обігріву або охолодження; Робота під тиском Робота з вакуумом; Термоізоляція; Гомогенізатор; Щоперемішує пристрій; Датчики для контролю ваги; Пульт керування нагріванням, охолодженням; Датчики для вимірювання температури; Датчики для вимірювання тиску; Пульт управління технологічним процесом з можливістю доступу до нього з будь-якої точки світу; Механізм підйому кришки; Механізм перекидання; Оглядове вікно; Підсвічування; Різні технологічні патрубки[64].</p>
P3-16	Реактор - змішувач	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 10л Модель: S212 - 10L Об'єм (л): 10 Об'єм сорочки (л): 3 Швидкість обертання (про/хв): 0~680 Харчування (напруга/частота): 220В/60Гц Матеріал скла: високоякісне боросилікатне скло 3.3 Діапазон температур: вода - 90°C, олія - 300°C Мішалка: Усередині нержавіюча сталь, зовні PTFE, титан [65].</p>

Продовження табл. 6.1

РЗ-17	Реактор - змішувач	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 40л. Хімічний реактор являє собою ємність з нержавіючої сталі технічних або харчових марок AISI 304 або AISI 316, оснащена теплоізолююваною сорочкою нагріву, приводом обертання, вузлом ущільнення і щитом управління. Ємність реактора має герметичні вузли завантаження та вивантаження. Щит управління, обладнаний датчиком-регулятором нагріву, частотним перетворювачем, кнопками запуску і зупинки перемішуючого пристрою, кнопками запуску і зупинки насоса (встановлюється додатково), кнопкою аварійної зупинки і системою захисту управління двигуна. Виробник: Україна [66].</p>
НВ – 14 НВ – 24	Насос відцентровий	2	<p>Циркуляційний насос Grundfos Насос відцентровий герметичний, матеріал чугун. Продуктивність від 3,2 м³/год, Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Данія[67].</p>
ІН-19	Інокулятор	1	<p>Необхідний простір Підлогова версія 1900 x 1020 x 750 мм (максимально) Керуючий ПК промислового типу Основний пристрій Матеріал корпусу нержавіюча сталь AISI 304, 316L З'єднання з комп'ютером локальна мережа Робочі параметри 30 л Швидкість обертання мішалки 20–600 об/хв Температура: 0–150°C рН: 2–12 рО₂: 0-100% Тиск: (-0,5) - 2 бар (опція) Мутність 0–6 AU (опція) Red/Ох-потенціал -2000 - 2000 мВ (опція) Виробник: Україна [68].</p>

Закінчення табл. 6.1

ІН-21	Інокулятор	1	Інокулятор геометричний об'єм 300л, швидкість перемішування 20–1500об/хв. Контроль температури, рН, тиску Необхідне контрольно-вимірювальне обладнання Система аерації Габарити реактора: 1500x1135x3122 Матеріал корпусу: сталь AISI 316 L Виробник: Німеччина [69].
Ф-20 Ф-22 Ф-24	Індивідуальний фільтр очистки повітря	2	Стерилізуючі фільтри з політетрафторетилену. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9999 %.[70].
ФР-23	Ферментер	1	Виробничий ферментер геометричний об'єм 3000л нержавіюча сталь AISI 304 Температура: робоча до +50 (при стерилізації +122) Діапазон швидкості мішалки: 300 rpm для клітинних культур, 1000 - 1500 rpm (в залежності від розміру судин) для бактерій Повне програмування : автоматичне піногасіння та регулювання Ph Виробник: Китай [71].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ

ВІТАМІНУ В₁₂

Технологічна схема культивування *Pseudomonas denitrificans* включає допоміжні роботи (псанітарну підготовку виробництва, підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес, що передбачає підготовку посівного матеріалу та виробниче культивування.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР1.1. – Підготовка персоналу(спеціальний одяг,миття рук та ін.)

ДР1.2. – Підготовка приміщень (щоденне та генеральне прибирання)

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту яка розташована на 3 м в висоту від даху будівлі, де концентрація мікроорганізмів стабілізована. Повітрозабірник обладнаний металевою сіткою для видалення забруднень.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення

Повітря проходить через фільтр з керамічним картриджем F 0010 DF, який призначений для видалення з нього механічних частинок розміром більше 10 мкм, пропускна здатність фільтра 1170 л/хв., ефективність очищення досягає 90%.

					НУХТ БТЕК 04.03.32 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Піхало В. О.			Розділ 7. Опис технологічної схеми одержання вітаміну	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т. Л.					80	119
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 2.3. Компресування повітря

Для стискання повітря використовуємо компресор 10HP 7.5KW потужністю 1м3/хв., тиск складає 13 атм, температура 120°C.

ДР 2.4. Охолодження та видалення вологи

Для регулювання температури повітря використовується теплообмінник-охолоджувач (нагрівач) моделі МНТА-15 з продуктивністю 47 кіловат. Температура повітря на виході регулюється швидкістю подачі теплоносія, температура 25°C, вологість 60 %.

ДР 2.5. Нагрів повітря

Підігрів повітря відбувається в теплообміннику-нагрівачі МНТА-15 до температури, вищої від температури культивування на 5 – 10 0C, тобто до 35⁰C, його вологість становить 40 %. Перед теплообмінником нагрівачем встановлюються додаткові компресор та ресивер (підготовка повітря для сушарки).

ДР 2.6. Очищення на головному фільтрі

Основним елементом системи очищення повітря є головний фільтр TRION Forever Filter®, фільтруюча поверхня складається з алюмінієвих пластин, ефективність очищення досягає 95%.

ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Після головного фільтра повітря проходить через індивідуальний фільтр тонкої очистки моделі ОМІ 04А.0570.Н. зі скловолокна, продуктивністю 300 м³/год ефективність очищення досягає 99,99%.

ДР 3. Приготування титрувальних агентів для титрування поживного середовища

ДР 3.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення поживних середовищ

У реактор об'ємом 5 л за допомогою автоматизованого лічильника для води подають 3,03 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій і вносять через дозатор рідин 0,56 л 37 %-го розчину HCl.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для нейтралізації поживних середовищ

У реактор об'ємом 5 л, вносять 227,9 г кристалічного NaOH, зваженого на технічних вагах, і додають 3,59 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв). Робочий розчин стерилізують протягом 40 хв при температурі 131°C та тиску 0,15 МПа.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування та стерилізація мальтозного сиропу для підживлення

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 250 кг мальтозного сиропу, подають у реактор об'ємом 500 л. Для повного розчинення компонентів використовується комплексний підхід, що включає в себе: підвищення температури розчину до 40 °C подачею пари у кожух і в самий збірник й вмиканням перемішувального пристрою, після чого проводять стерилізацію протягом 30 хв за температури 112°C.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 72 г мальтозного сиропу, 72 г кукурудзяного екстракту, 36 г бетаїну, наважки переносять у колбу на 2 л, додають 820 мл питної води, перемішують. Колбу із розчином закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 30 хв при температурі 112 °C.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують наважки солей: 1,8 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,7 г MgSO_4 , 0,14 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки переносять у колбу на 1 л, вносять 595,5 мл питної води, перемішують. Колбу із розчином солей закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131 °С.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1,35 г KH_2PO_4 , наважку переносять у колбу на 500 мл, вносять 198,65 мл питної води, перемішують. Колбу із розчином солей закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131 °С.

ДР 4.3. Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

Для одержання інокуляту на даному етапі потрібно приготувати 16,2 л поживного середовища, необхідна кількість посівного матеріалу становить 1,8 л.

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 648 г мальтозного сиропу, 648 г кукурудзяного екстракту, 324 г бетаїну. Наважки переносять у збірник 10 л, подають 2 л питної води через автоматизований лічильник для води, після утворення розчину середовище подається в реактор 10 л, де відбувається стерилізація шляхом подачі пари в апарат та його кожух. Для повного розчинення компонентів середовища підвищують температуру розчину до 40 °С. Проводять стерилізацію протягом 30 хв при температурі 112 °С.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують наважки солей: 16,2 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 24,3 г MgSO_4 , 1,29 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12,15 г KH_2PO_4 . Наважки переносять в збірник 30 л, подають 12,6 л питної води через автоматизований лічильник для води, після утворення розчину середовище подається в інокулятор 30 л. Для повного

розчинення компонентів використовується комплексний підхід, що включає в себе: підвищення температури розчину до 40 °С подачею пари у кожух і в самий збірник й вмиканням перемішувального пристрою. Приготований розчин підкислюють розчином HCl (від ДР 2.1) до рН 4-4,5 та здійснюють стерилізацію протягом 40 хв за температури 131°С.

ДР 4.4. Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л

Для одержання інокуляту на даному етапі потрібно приготувати 162 л поживного середовища, необхідна кількість посівного матеріалу становить 18 л.

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою вагового дозатора зважують 6480 г мальтозного сиропу, 6480 г кукурудзяного екстракту, 3240 г бетаїну та подають в збірник 40 л, додають 20 л питної води через лічильник для води автоматизований, після утворення розчину середовище подають в реактор 40 л, де відбувається стерилізація шляхом подачі пари в апарат і в кожух апарату. Для повного розчинення компонентів використовується комплексний підхід, що включає в себе: підвищення температури розчину до 40 °С подачею пари у кожух і в самий збірник й вмиканням перемішувального пристрою. Проводять стерилізацію протягом 30 хв при температурі 112 °С.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують наважки солей: 162 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 243 г MgSO_4 , 12,9 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 121,5 г KH_2PO_4 . Наважки переносять в збірник 300 л, подають 126 л питної води через автоматизований лічильник для води, після утворення розчину середовище подають в інокулятор 300 л, де відбувається стерилізація шляхом подачі пари в апарат і в кожух апарату. Для повного розчинення солей підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух апарата, вмикають перемішувальний пристрій. Приготований розчин

підкислюють розчином HCl (від ДР 2.1) до рН 4-4,5 та здійснюють стерилізацію протягом 40 хв за температури 131°C.

ДР 4.5. Приготування поживного середовища для проведення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 3 м³

Для виробничого біосинтезу ціанокобаламіну на даному етапі потрібно приготувати 1620 л поживного середовища, необхідна кількість посівного матеріалу становить 180 л. Вміст компонентів для приготування поживного середовища для ферментера об'ємом 3 м³.

ДР 4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою вагового дозатора зважують 324 кг мальтозного сиропу, 64,8 кг кукурудзяного екстракту, 32,4 кг бетаїну, 0,12 кг DMBI та подають в збірник 400 л, додають 200 л питної води через лічильник автоматизований для води, після утворення розчину подаємо середовище в реактор 400 л, де відбувається стерилізація шляхом подачі пари в апарат і в кожух апарату. Для повного розчинення компонентів середовища підвищують температуру розчину до 40 °C подачею пари у кожух апарату, вмикають перемішуючий пристрій. Проводять стерилізацію протягом 30 хв при температурі 112 °C.

ДР 4.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують наважки солей: 1,62 кг (NH₄)₂SO₄, 2,43 кг MgSO₄, 0,12 кг ZnSO₄•7H₂O, 0,22 кг CoCl₂•6H₂O, 1,2 кг KH₂PO₄. Наважки переносять у збірник 300 л, подають 150 л питної води через лічильник автоматизований лічильник для води (весь інший залишок води, а саме 1100 л води подають безпосередньо в ферментер), після утворення розчину середовище подають в ферментер 3 м³. Для повного розчинення компонентів використовується комплексний підхід, що включає в себе: підвищення температури розчину до 40 °C подачею пари у кожух і в самий збірник й вмиканням перемішувального пристрою. Приготований розчин підкислюють

розчином HCl (від ДР 1.1) до рН 4-4,5 та здійснюють стерилізацію протягом 40 хв за температури 131°C.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

*ТП 5.1. Підтримання колекційної культури *Pseudomonas denitrificans**

Колекційну культуру штаму *Pseudomonas denitrificans* 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 5.2. Отримання *Pseudomonas denitrificans* на агаризованому середовищі*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з середовищем МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з агаризованим середовищем МПА в асептичних умовах. Вирощують при температурі 28-30°C упродовж 24 год.

*ТП 5.3. Вирощування робочої культури *Pseudomonas denitrificans* на агаризованому середовищі*

Після вирощування ізольованих колоній на чашках Петрі здійснюється їх пересів в пробірки зі скошеним середовищем МПА із розрахунку – одна ізольована колонія на окрему пробірку. Вирощування робочої культури здійснюють у пробірках при 28-30°C впродовж 24 год.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

У колбу об'ємом 2 л із 1000 мл розчину композиції А (від ДР 3.2.1) в асептичних умовах вносять 600 мл розчину композиції Б (від ДР 3.2.2), 200 мл розчину композиції В (від ДР ДР 3.2.3). Розчин перемішують і розливають по 150 мл у 12 стерильних качалочних колби об'ємом 750 мл.

У пробірки з *Pseudomonas denitrificans* (від ТП4.3) вносять по 15 мл фізіологічного розчину, суспендують та вносять у колби з поживним

середовищем. Культивування клітин продуцента проводять у колбах на качалці (78 об/хв) при 32°C упродовж 24 год.

Після завершення культивування здійснюють відбір проб для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

В інокулятор об'ємом 30 л, де знаходиться композиція Б (від ДР 3.3.2), подають самопливом композицію А (від ДР 3.3.1) з реактора. Для досягнення оптимального рН=7,0 для культивування продуцента ціанокобаламіну в поживне середовище вносять 6 % розчин NaOH (від ДР 2.2). Після закінчення підготовки посівного апарату додається посівний матеріал з ТП 4.4 та вмикаються необхідні системи для забезпечення оптимальних умов ферментації.

Культивування здійснюють протягом 24 год за температури 32 °С.

Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л

В інокулятор об'ємом 300 л, де знаходиться композиція Б (від ДР 3.4.2), за допомогою відцентрового насоса перекачують композицію А (від ДР 3.4.1) з реактора. Для досягнення оптимального рН=7,0 для культивування продуцента ціанокобаламіну в поживне середовище вносять 6 % розчин NaOH (від ДР 2.2). Потім подають посівний матеріал від ТП 4.5 та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату.

Культивування здійснюють протягом 24 год за температури 32 °С,

Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 3 м³

У ферментер об'ємом 3 м³, де знаходиться композиція Б (від ДР 3.5.2), за допомогою відцентрового насоса перекачують композицію А (від ДР 3.5.1) з реактора. Для досягнення оптимального рН=7,0 для культивування продуцента ціанокобаламіну в поживне середовище вносять 6 % розчин NaOH (від ДР 2.2).

Подають посівний матеріал від ТП 4.6 та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату. У процесі культивування кожні 30 годин порціями насосом з реактора подають мальтозний сироп від ДР 3.1.

Виробниче культивування здійснюють протягом 180 год за температури 32 °С, перемішування середовища 78 об/хв. Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби для проведення мікробіологічного контролю.

Біосинтез закінчують по досягненню рівня синтезу вітаміну В₁₂ С_в = 198,27 мг/л.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1 Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
1	2	3	4	5
Кт 2.3 <i>Компресування повітря</i>	Стиснене повітря Тиск	Манометр технічний	Повітря після компресування	P=0,5 МПа
Кт 2.4 <i>Охолоджене повітря та зменшення надлишкової вологості</i>	Охолоджене повітря Температура, вологість	Термометр технічний, Психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	t = 19 °С, W=60%
Кт 2.5 <i>Нагрів повітря</i>	Підігріте повітря температура	Термометр технічний	Після нагріву повітря	t = 30 °С,
Кт 2.7 <i>Очищення повітря на індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Перевірка ступеня очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах	E = 99,99998%

<h3 style="margin: 0;">НУХТ БТЕК 04.03.32 КР ПЗ</h3>				
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Піхало В. О.		
Перевір.		Сулейко Т. Л.		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
<h3 style="margin: 0;">Розділ 8. Контроль виробництва</h3>			Літ.	Арк.
			89	119
<h3 style="margin: 0;">Кафедра БТМ</h3>				

Продовження таблиці 8.1

Кх Кт 3.1 <i>Приготування 6% розчину HCl для підкислення поживних середовищ</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
Кх Кт 3.2 <i>Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для нейтралізації поживних середовищ</i>	Розчин натрій гідроксиду Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
Кт Км 3.1 <i>Приготування та стерилізація мальтозного сиропу для підживлення</i>	Мальтозний сироп Температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту в колбах на качалці</i> <i>Приготування та стерилізація композиції А</i>	Композиція А Температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2 <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

<p>Кт, Км 3.2.3 <i>Приготування та стерилізація композиції В</i></p>	<p>Композиція В Температура, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 120 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 3.3.1 <i>Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л</i> <i>Приготування та стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Температура, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км Кх 3.3.2 <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Температура, час, рівень рН відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, датчик рН мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, рівень рН, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131°С, τ = 40 хв, рН = 4-4,5 відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 3.4.1 <i>Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л</i></p>	<p>Композиція А Температура, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>

<p>Кт, Км Кх 3.4.2 <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Температура, час, рівень рН відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, датчик рН мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, рівень рН, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131°C, τ = 40 хв , рН = 4-4,5 відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт Км 3.5.1 <i>Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері³ об'ємом 3 м³</i> <i>Приготування та стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Температура, час, відсутність мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 112 °С, τ = 30 хв , відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт Км Кх 3.5.2 <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Температура, час, відсутність мікробіоти, рівень рН</p>	<p>Термометр, годинник мікробіологічний контроль, датчик рН</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, рівень рН мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131°C, τ = 40 хв , відсутність мікробіоти рН = 4-4,5</p>
<p>Кт Км 4.1 <i>Підготовка посівного матеріалу</i> <i>Підтримання колекційної культури Pseudomonas denitrificans</i></p>	<p>Колекційна культура Pseudomonas denitrificans Температура, час, морфологічна однорідність відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під збереження культури, мікробіологічний контроль перед пересівом</p>	<p>t = 2-8°C, τ = 3-4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Продовження таблиці 8.1

<p>Кт Км 4.2 <i>Одержання Pseudomonas denitrificans на агаризованом у середовищі</i></p>	<p>Колекційна культура Pseudomonas denitrificans Температура, час, морфологічна однорідність відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний контроль проводять кожні 3-4 год</p>	<p>t = 28-30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт Км 4.3 <i>Вирощування робочої культури Pseudomonas denitrificans на агаризованом у середовищі</i></p>	<p>Колекційна культура Pseudomonas denitrificans Температура, час, морфологічна однорідність відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний контроль проводять кожні 3-4 год</p>	<p>t = 28-30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт Км 4.4 <i>Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці</i></p>	<p>Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 3-4 годин</p>	<p>t = 32°С, τ = 24 год, ω= 78 об/хв відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт Км Кх 4.5 <i>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л</i></p>	<p>Посівний матеріал, Температура, рівень рН, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів</p>	<p>Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, мікроскоп</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, рівень рН мікроскопіювання – кожні 3-4 годин</p>	<p>T = 32°С, τ=24 год, 850-1100 м3/год, ω =78 об/хв рН = 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Закінчення таблиці 8.1

Кт Км Кх 4.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л	Посівний матеріал, Температура, рівень рН, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, рівень рН мікроскопіювання – кожні 3-4 годин	t= 32°C, τ=24 год, 850-1100 м ³ /год, ω =78 об/хв рН = 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт Км Кх 5.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 3 м ³	Культуральна рідина Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологічна чистота культури, концентрація вітаміну В ₁₂	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик рН, мікроскоп	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, мікроскопіювання – кожні 3-4 годин	t = 32°C, τ=180 год, 850-1100 м ³ /год, ω=78 об/хв, рН = 7,0, Св =198,27 мг/мл відсутність сторонньої мікробіоти

8.2. Мікробіологічний контроль

Для багатьох промислових підприємств різних галузей мікробіологічні показники вироблюваної продукції є ключовим фактором, що гарантує її якість та безпеку. [72].

Так як культивування *Pseudomonas denitrificans* при виробництві вітаміну В₁₂ проводиться в асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль для підтвердження стерильності середовища.

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища проводять так: з простерилізованого поживного середовища забирається стерильною піпеткою проба об'ємом 50 мл. Відібрана проба розсіюється на поверхню чашок Петрі з агаризованим поживним середовищем. Чашки Петрі з посівом інкубуються при оптимальних умовах для вирощування мікроорганізмів

(температура, вологість, газова атмосфера). Після інкубації чашки Петрі оглядаються на наявність росту мікроорганізмів [73].

Посів мікроорганізмів здійснюється за допомогою стерильних інструментів на поживні середовища. Відбір проби: З об'єму досліджуваного матеріалу стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл суспензії. Нанесення проби: Відібрану пробу рівномірно розподіляють по поверхні двох поживних середовищ: СА (саборозний агар): для виявлення грибів і дріжджів. МПА (м'ясо-пептонний агар): для виявлення бактерій. Інструменти: Для розподілу суспензії на середовищі використовують один з двох стерильних інструментів: * Бактеріологічну петлю: застосовується для більш точного розподілу і посіву невеликих об'ємів. Шпатель Дригальського: використовується для посіву більших об'ємів суспензії та рівномірного розподілу по поверхні середовища. [73].

Мікробіологічний контроль культури здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Прямий висів на агаризоване середовище. З готового посівного матеріалу забирається стерильною піпеткою проба. Відібрана проба розсіюється на поверхню чашок Петрі з агаризованим поживним середовищем методом вичерпуючого штриха. Чашки Петрі з посівом інкубуються при оптимальних умовах для вирощування мікроорганізмів. Після інкубації з вирощених на чашках Петрі ізольованих колоній за допомогою мікроскопа готується мазок для вивчення морфології мікроорганізмів [73].

Методика мікроскопіювання :

Приготування препарату для мікроскопії мікроорганізмів здійснюється в асептичних умовах та складається з наступних етапів:

1. Відбір матеріалу: З окремих колоній, які вирости на поживному середовищі після інкубування, стерильною петлею відбирають невелику кількість мікроорганізмів. Мазок наносять на чисте знежирене предметне скло.

2. Висушування мазка: Мазок висушують без нагрівання при кімнатній температурі до повного випаровування вологи.

3. Фіксування препарату: Для фіксування препарат тричі проводять крізь верхню частину пальчика.

4. Фарбування препарату: На фіксований препарат наносять кілька крапель барвника (метиленового синього).

Барвник розподіляють по всій поверхні мазка і фарбують препарат протягом 5 хвилин. Після фарбування барвник зливають і препарат ретельно промивають дистильованою водою.

5. Висушування та нанесення імерсійної олії: Скло з країв протирають фільтрувальним папером і висушують препарат при кімнатній температурі. На абсолютно сухий препарат наносять краплину імерсійної олії.

6. Мікроскопіювання: Препарат мікроскопують під збільшенням мікроскопа ($\times 90$) [74].



Рис.5.1 Фото клітин *Pseudomonas denitrificans* [75]

Якщо зразок не містить сторонньої мікрофлори під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Pseudomonas denitrificans*. Клітини будуть мати паличкоподібну форму з джгутиками. Розмір бактерій коливається приблизно в $1,05 \times 0,8$ мкм [76].

8.3 Визначення концентрації цільового продукту (вітаміну В₁₂)

Концентрацію вітаміну в пробі пропонується визначати спектрофотометрично. Для цього проводять вимірювання оптичної густини в максимумі поглинання при довжині хвилі 361 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Щоб визначити вміст вітаміну, використовують формулу, яка розраховується за певними параметрами [47,48]:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot N \cdot 10^6}{A_0 \cdot V}$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 – оптична густина стандартного зразка ціанокобаламіну;

a_0 – наважка стандартного зразка ціанокобаламіну (у перерахунку на 100%), г;

N – розведення;

V – об'єм, узятий для аналізу, мл.

Для підготовки розчину стандартного зразка ціанокобаламіну близько 0,05 г (точна вага) стандартного зразка ціанокобаламіну поміщають в мірну колбу об'ємом 100 мл, додають 80 мл води, збовтують протягом 10 хвилин, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують. З отриманого розчину переносять 2,0 мл в мірну колбу об'ємом 50 мл, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують. При відсутності стандартного зразка ціанокобаламіну можна використовувати значення питомого показника поглинання ціанокобаламіну при довжині хвилі 361 нм, яке дорівнює 207 [49, 50].

8.4 Визначення концентрації джерела вуглецевого і азотного живлення у поживному середовищі

Джерелом вуглецю в середовищі виступає мальтозний сироп. Його концентрацію визначали поляриметричним методом [77].

Метод ґрунтується на визначанні кута питомого обертання (поляризації основного розчину мальтозного сиропу) з подальшим переведенням значень показів сахариметра в масову частку редуку вальних речовин у перерахуванні на суху речовину [77].

Засоби контролювання та допоміжні пристрої

Сахариметр з кварцовим компенсаційним клином або з компенсатором, що обертається, зі шкалою, яка оснащена монохроматичним джерелом світла типу СУ-4 або СУ-5 [77].

Трубка поляриметрична довжиною $(100,00 \pm 0,02)$ мм з покривним склом з прозорого оптичного скла товщиною від 1 мм до 2 мм з паралельними і рівними поверхнями [77].

Ваги лабораторні загального призначення 4-го класу точності з найбільшою границею зважування 500 г або 3-го класу точності з найбільшою границею зважування 1000 г згідно з ГОСТ 24104.

Термометр рідинний скляний з ціною поділки шкали 1°C і діапазоном вимірювання температури від 0°C до 100°C - згідно з ГОСТ 28498.

Стакан Н(В)-1(2)-100 згідно з ГОСТ 25336. Колба мірна 2-250-2 — згідно з ГОСТ 1770.

Лійка В-100-150 згідно з ГОСТ 25336.

Папір фільтрувальний лабораторний згідно з ГОСТ 12026.

Вода здистильована згідно з ГОСТ 6709.

Паличка скляна [77].



Рис 5.1 Цукорметр СУ-5

Технічні характеристики:

- діапазон вимірювання в міжнародних цукрових градусах за довжини хвилі $\lambda = 589,3 \text{ nm}$, оS - від мінус 40 до плюс 130
- ціна поділки відлікового пристрою, оS - 0,05
- поріг чутливості, оS - 0,05
- межа похибки, що допускається, оS - $\pm 0,05$ [78].

Проведення випробування:

Одержаний основний розчин заливають у поляриметричну трубку так, щоб не утворились буль башки повітря, вміщують в камеру сахариметра. Проводять три вимірювання з похибкою, яка дорівнює точності приладу, і обчислюють середнє арифметичне.

Покази сахариметра P , у відсотках, у перерахуванні на суху речовину крохмальної патоки обчислюють за формулою:

$$P = \frac{P_0 \times 100}{A}$$

де P_0 - середнє арифметичне відліків по шкалі сахариметра, $^{\circ}S$;

A - масова частка сухих речовин у мальтозному сиропі, %;

100 – коефіцієнт перерахування масової частки сухих речовин у відсотки [77].

Джерелом азоту в поживному середовищі є кукурудзяний екстракт та сульфат амонію.

Вміст амінного азоту в бульйоні визначали кількісно методом формольного титрування [79].

Принцип методу: Метод визначення азоту амінокислот ґрунтується на титруванні формольною сумішшю в лужному середовищі.

Процедура:

Підготовка розчину: 2 мл досліджуваного розчину змішують з 18 мл дистильованої води. Додають 5 крапель 0,04% розчину бромтимола синього. Нейтралізація суміші: За допомогою 0,05 н розчину HCl або 0,05 н $NaOH$ доводять рН суміші до 7,0 (слабо-зелене забарвлення). Титрування: До 2 мл формольної суміші, доданої з мірного циліндра, додають досліджуваний розчин. Титрують 0,05 н розчином $NaOH$ до стійкого синьо-фіолетового забарвлення. Паралельно титрують дистильовану воду (контроль). Розрахунок: Різницю між об'ємами лугу, використаного для титрування досліджуваного та контрольного розчинів, множать на 0,7. Отримане значення відповідає кількості міліграмів азоту амінокислот у 2 мл досліджуваної рідини.

Реактиви:

1. Гліцин або гідролізат білка, розчин, 0,25%.
2. Досліджувана проба
3. Фенолфталеїн, спиртовий розчин, 0,1%.
4. NaOH, натрій гідроксид, розчин, 0,1 н.
5. Формольна суміш [80]

Джерелом азоту в поживному середовищі є кукурудзяний екстракт та сульфат амонію.

Вміст сульфату амонію визначали методом Несслера[81].

Метод полягає в тому, що в культуральні рідини додають реактив Несслера (K_2HgI_4), який реагує з аміаком, присутнім у зразку (в сильних лужних умовах) для отримання жовтого кольору. Інтенсивність кольору прямо пропорційна концентрації аміаку[81].

Реактиви :

1. Дистильована вода
2. Калій тартрат
3. Реактив Несслера [81].

Приготування: Вміст $N-NH_4^+$ визначали методом Несслера за довжини хвилі 410 нм. Для цього в мірну колбу 100 мл з дистильованою водою відсмоктували 1 мл культуральної рідини, додавали 2 мл 2% розчину калію тартрату і 2 мл реактиву Несслера. Потім її доповнювали дистильованою водою до об'єму 100 мл [81].

8.4 Визначення концентрації біомаси

Клітинну біомасу кількісно визначали за масою сухої клітини (DCW).

Центрифужна пробірка (50 мл), яка містить 30 мл культурального бульйону центрифугували при 5000 об/хв протягом 10 хв. Після дворазового промивання дистильованою водою клітинний осад сушили до постійної ваги при 105° С, і потім було переведено в стандартизовану DCW (г/л) [82].

РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

Відходи біотехнологічних виробництв:

- Це речовини, які утворюються під час виробництва, але не мають подальшого застосування.
- Можуть бути рідкими, газоподібними або твердими.
- небезпечні для людей, тварин та довкілля.
- Потребують правильного знешкодження та утилізації.

9.1. Системи знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи під час виробництва вітаміну B₁₂ за допомогою бактерій *Pseudomonas denitrificans* складаються з:

- відпрацьованих залишків мийних і дезінфікуючих засобів;
- відпрацьованої води для ополіскування обладнання;
- культуральної рідини.

Вибір режиму очищення стічних вод (періодичний або безперервний) залежить від загальної кількості стічних вод, які утворюються на підприємстві. Загальні витрати стічних вод підприємства визначаються на основі середніх норм вироблення стічних вод на одиницю продукції та добової потужності виробництва. Нижче наведено відповідні розрахунки.

НУХТ БТЕК 04.03.32 КР ПЗ

Розділ 9. Охорона довкілля

Літ. Арк. Акрушів

103 119

Кафедра БТМ

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Піхало В. О.					
Перевір.		Сулейко Т. Л.					
Консультант							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

9.1.1. Розрахунок орієнтовного об'єму стічних вод

Під час використання мобільної циркуляційної СІР-мийки для миття та дезінфекції обладнання важливо враховувати можливі залишки мийно-дезінфікуючих засобів (МДЗ). Рекомендована концентрація робочого розчину МДЗ для даного типу мийки становить 20-30% від об'єму ємкісного обладнання.

Відповідно до специфікації обладнання з курсового проєкту, з ємкісного обладнання маємо: реактор РЗ-12 для мальтозного сиропу, інокулятор ІН-19 для підготовки посівного матеріалу *P.denitrificans*, реактор РЗ-16 для підготовки композиції А поживного середовища для вирощування посівного матеріалу продуценту *P.denitrificans*, інокулятор ІН-21 для підготовки посівного матеріалу, реактор РЗ-17 для підготовки композиції А поживного середовища для виробничого біосинтезу, ферментер ФР-23 для здійснення виробничого біосинтезу.

Таким чином, потрібно розрахувати геометричний об'єм ємностей:

$$\begin{aligned} V_{\text{ємностей}} &= V_{\text{реактор РЗ-12}} + V_{\text{інокулятор ІН-19}} + V_{\text{реактор Р-16}} + V_{\text{інокулятор ІН-21}} \\ &\quad + V_{\text{реактор РЗ-17}} + V_{\text{ферментер ФР-23}} \\ &= 600\text{л} + 30\text{л} + 10\text{л} + 300\text{л} + 40\text{л} + 3000\text{л} = 3980\text{ л} \end{aligned}$$

Тоді об'єм мийних-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,2 = 3980 \times 0,2 = 796\text{ л.}$$

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,3 = 3980 \times 0,3 = 1194\text{ л.}$$

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 796-1194 л.

Відпрацьована вода після ополіскування обладнання. Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30%

від об'єму ємнісного обладнання. Як і розраховано вище, цей параметр дорівнює 796-1194 л.

Таким чином, в сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: $1194 \text{ л} + 1194 = 2388 \text{ л}$.

Виходячи з розрахунків курсового проекту виробництво є дрібнотонажним орієнтовний об'єм стічних вод на 1 т готової продукції дорівнює 5000 м^3 .

9.1.2 Визначення середніх витрат стічних вод від промислового підприємства

Відповідно до ТЕО, річна потужність виробництва становить 1 026 450 мг вітаміну B_{12} за рік. Виходячи з того, що вітамін B_{12} синтезується у кількості 198,27 мг/л, отримаємо 7 395 л культуральної рідини за рік. Добова потужність підприємства з урахуванням кількості трудоднів $T_{рд} = 35$, становить 211 л ($0,211 \text{ м}^3$) вітаміну B_{12} .

Середні за зміну витрати виробничих стічних вод, м³ /добу, визначають за формулою:

$$Q_v = q_v \times n$$

де q_v - норма водовідведення в м³ на одиницю продукції, яку випускає підприємство (орієнтовно $5000 \text{ м}^3/\text{м}^3$);

n - кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу) . Вищерозраховано, що $n = 0,211 \text{ м}^3/\text{добу}$.

$$Q_v = 5000 \text{ м}^3/\text{м}^3 \times 0,211 \text{ м}^3/\text{добу} = 1050 (\text{м}^3/\text{добу})$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод, що надходять від підприємства, м³ /зміну, обчислюють за формулою:

$$Q_n = q_n \times N$$

де qn - норма відведення побутових стічних вод в м³ /зм на одного робітника. Приймаємо для холодних цехів 0,025 м³; N - кількість робітників, що працюють в зміну (змінний майстер, технолог, мікробіолог, 2 апаратчика, 2 прибиральника, оператор).

$$Q_n = 0.025 \text{ м}^3 \text{ зм люд} \times 8 \text{ людей} = 0,2 \frac{\text{м}^3}{\text{зм}}$$

Перерахунок даного показнику на добу:

$$(0,2 \times 3 \times 24)/8 = 1,8 \text{ м}^3/\text{добу}.$$

де 3 – кількість змін на добу;

24 – кількість годин у добі;

8 – тривалість однієї зміни, год.

Загальна витрата атмосферних стічних вод Q_a . Орієнтовно можна прийняти у об'ємах у 5 – 30 разів меншому за витрати побутових стічних вод).

$$Q_a = Q_n/5 = 0,2/5 = 0,04 \text{ (м}^3/\text{добу)}.$$

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві,

обраховують за формулою:

$$Q = Q_v + Q_n + Q_a = 1050 + 1,8 + 0,04 = 1051,8 \text{ м}^3/\text{добу}$$

9.1.3 Система очищення стічних вод

Так як загальні витрати стічних вод перевищують 100 м³ , доцільно їх очищати у безперевному режимі. Пропонуємо установку ВІОТАЛ (Україна) як основний елемент очищення стічних вод підприємства. Продуктивність 10-2400 м³ /добу [83].

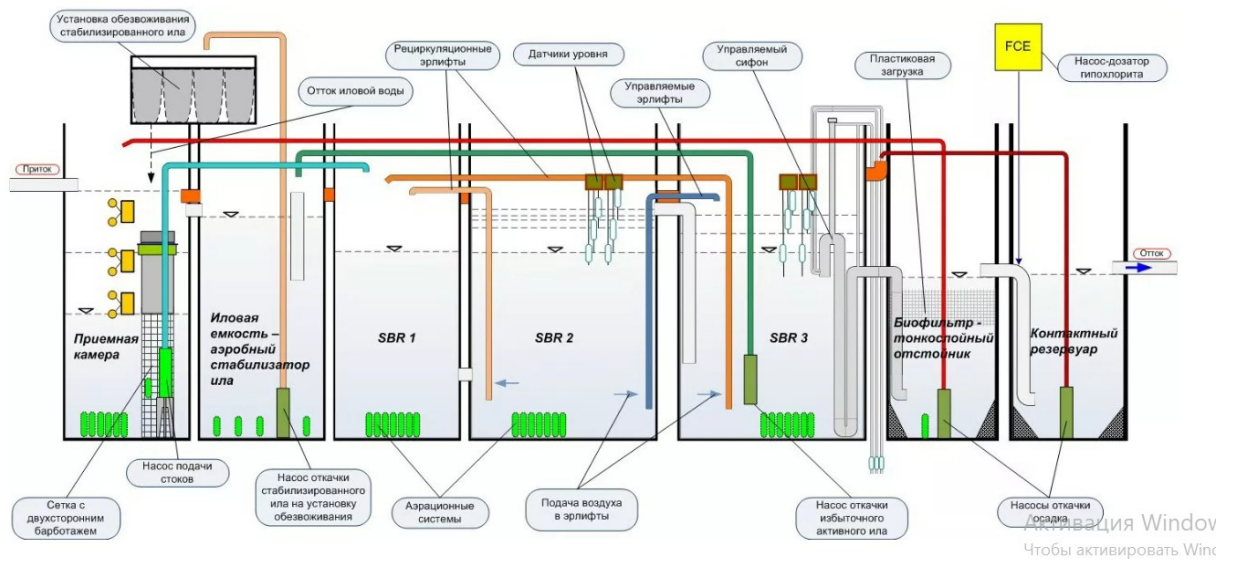


Рис. 3.1 Технологічна схема установки BIOTAL [9]

Установка BIOTAL включає вісім зон обробки стічних вод:

1. нержавіюча сітка, яка захищає насос подачі стоків з ПК-Д в SBR-1 від грубих нечистот;
2. приймальна камера-денітрифікатор;
3. реактор SBR першого ступеня;
4. реактор SBR другого ступеня;
5. реактор SBR третього ступеня;
6. самопромивний аерований біологічний фільтр;
7. тонкошаровий відстійник;
8. контактний резервуар і дві зони обробки надлишкового активного мулу: аеробний стабілізатор надлишкового активного мулу та установка зневоднення [83].

Очистка стічних вод на установці BIOTAL відбувається у такому порядку:

- 1 – стічні води, що щойно надійшли на установку, попередньо оброблюються у приймальній камері-денітрифікаторі;

2 – стічні води, що надійшли в установку у попередньому циклі оброблюються у 1-му і 2-му реакторах SBR;

3 – у 3-му реакторі SBR оброблюються стічні води, що надійшли на установку два цикли назад;

4 – в біологічному фільтрі-тонкошаровому відстійнику оброблюються стічні води, що надійшли на очистку три цикли назад;

5 – в контактному резервуарі оброблюються стічні води, що надійшли на установку чотири цикли назад. Стічні води, що очищуються, під час цього процесу ступінчасто переміщуються від першого до останнього ступеня очистки МОС, шляхом періодичного гідравлічного сполучення цих ступенів з допомогою гідро-автоматичних пристроїв чи насосів.

Стічні води, позбавлені від грубих нечистот на автоматизованій ступінчастій решітці, перетікають в приймальну камеру-денітрифікатор (ПК-Д), що працює в режимі реактора SBR, як накопичувач, що приймає нерівномірний скид стічних вод, що надходять, і денітрифікатор першого ступеня. В приймальній камері-денітрифікаторі знаходяться: самоочищувані нержавіючі сітки з двостороннім барботажем для затримання і розбивання дрібних нечистот, системи аерації і перемішування, електродні датчики рівня, що самоочищуються, і насоси перекачки в 1-й реактор SBR. Стічні води, що надійшли в приймальну камеру денітрифікатор, змішуються з зворотним активним мулом з третього реактора, що містить нітриту і нітрати. В умовах режиму перемішування відбувається процес денітрифікації з подвійним ефектом – денітрифікація з відривом газоподібного азоту і окислення органічних забруднень стічних вод, що надходять, киснем, відщепленим від нітритів в процесі денітрифікації. В ПК-Д автоматично підтримується необхідна концентрація активного мулу шляхом зміни висоти встановлення насоса перекачування попередньо очищених в ПК стічних вод. Цей насос,

перекачуючи мулову суміш в SBR-1 після відстоювання ПК-Д, одночасно відкачує надлишковий активний мул з ПК-Д до рівня всмоктування насоса.

9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів

Утворення газоподібних відходів, що містять аерозоль клітин, у вигляді відпрацьованого повітря після аерації культуральної рідини на стадіях:

- отримання посівного матеріалу *P.denitrificans* в інокуляторі об'ємом 30 л;
- отримання посівного матеріалу *P.denitrificans* в інокуляторі об'ємом 300 л;
- виробничого біосинтезу вітаміну В₁₂ у ферментері об'ємом 3000 л.

Розрахуємо об'єм відпрацьованого повітря, знаючи, що він приблизно дорівнює об'ємам аераційного повітря:

1. в інокуляторі об'ємом 30 л: робочий об'єм становить 18 л. отже аераційного повітря потрібно 36 л/хв, тобто 2160 л/год. Процес отримання посівного матеріалу *P.denitrificans* триває 24 год, для цього необхідно відповідно 51 840 л аераційного повітря на виробничий цикл.
2. в інокуляторі об'ємом 300 л: робочий об'єм становить 180 л, отже аераційного повітря потрібно 360 л/хв, тобто 21 600 л/год. Процес отримання посівного матеріалу *P.denitrificans* становить 24 год, для цього необхідно 518 400 л аераційного повітря за виробничий цикл;
3. у ферментері об'ємом 3000 л: робочий об'єм становить 18000 л, отже аераційного повітря потрібно 3600 л/хв, тобто 216 000 л/год. Процес виробничого біосинтезу вітаміну В₁₂ становить 180 год, для цього необхідно 38 880 000 л аераційного повітря за виробничий цикл.
4. У сумі $51,84 \text{ м}^3 + 518,4 \text{ м}^3 + 3888 \text{ м}^3 = 4458,24 \text{ м}^3$ відпрацьованого повітря за цикл. Зважаючи на незначну кількість газоподібних відходів, доцільно встановити головні фільтри для очищення та знешкодження повітря безпосередньо на інокуляторах та ферментері.

5. В нашому випадку, оскільки використовується пілотне та лабораторне обладнання, головні фільтри вже включені до комплексу постачання та є невід'ємною частиною підбраного набору обладнання.

9.3. Системи знешкодження твердих відходів

Тверді відходи на підприємстві:

1. Біомаса *P.denitrificans* після виробничого біосинтезу;
2. бруд на фільтрах;
3. непридатні хімічні реактиви (порошки для приготування м'ясо-пептонного агару, якщо термін придатності збіг, агаризовані середовища з чашок Петрі після мікробіологічного контролю і випадково розсипані солі при приготуванні поживних середовища);
4. матеріали (картон, полівінілхлорид, поліетилен); ар скло (у результаті склобою лабораторного посуду);

Біомаса. Розрахуємо скільки біомаси приблизно утвориться за один виробничий цикл. Відповідно до розрахунків з курсової рооти, за один цикл отримаємо 1800 л культуральної рідини з концентрацією абсолютно сухої біомаси 32 г/л. Проте, після центрифугування біомаса не буде сухою, її волога складає 70%. У свою чергу, 70% від 32 г/л становить 22,4 г/л (вологість біомаси), тоді концентрація вологої біомаси дорівнює 54,4 г/л. Тоді у 1800 л культуральної рідини вміст вологої біомаси становить 97,92 кг. Невеликі обсяги біомаси можна ефективно інактивувати за допомогою убойного автоклава. Після інактивації таку біомасу можна передати іншим підприємствам для виготовлення добрив.

Тверді відходи, що утворюються на фільтрах, можуть містити живі клітини продуцента та індуктора. З метою запобігання поширенню цих клітин та забезпечення безпечної утилізації, рекомендується: Піддати використані фільтри термічній обробці в автоклаві. Це дозволить знищити будь-які живі клітини, які могли залишитися на фільтрах.

Передати оброблені фільтри спеціалізованим організаціям, які мають ліцензію на прийняття та утилізацію біологічних відходів.

Непридатні хімічні реактиви та агаризовані середовища повинні утилізуватися відповідно до встановлених правил. Хімічні реактиви варто зберігати окремо в спеціально відведеній і промаркованій шафі, а потім передати спеціальним організаціям на утилізацію. Агаризовані середовища з чашок Петрі з вирослими колоніями попередньо інактивувати в убойному автоклаві.

Інші відходи. Рекомендується сортувати відходи в окремі контейнери з кришками

за видом матеріалу (мукулатура, ПВХ, поліетилен, скло тощо). Після сортування такі відходи необхідно передавати на переробку до спеціальних пунктів прийому вторсировини.

Список використаної літератури:

1. Стаття ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ СФЕРИ ФАРМАЦЕВТИКИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІЗ ПРИЄДНАННЯМ УКРАЇНИ ДО УГОДИ ПРО АСОЦІАЦІЮ З ЄВРОПЕЙСЬКИМ СОЮЗОМ Груздова Т.В., Юхновська Т.М. [Режим доступу]: chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://ukr-socium.org.ua/wp-content/uploads/2014/07/63-77__no-3__vol-50__2014__UKR.pdf
2. Стаття Health Benefits of Vitamin B12 Poonam Sachdev [Режим доступу]: <https://www.webmd.com/diet/health-benefits-vitamin-b12>
3. Кормові добавки для птахів і тварин [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://kreon-d.com.ua/ua/a456741-osobennosti-ispolzovaniya-vitamina.html>
4. Електроний ресурс Нормативно -директивні документи МОЗ України [Режим доступу] : <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=21436>
5. Стаття Dorothy Hodgkin Robert Burns Woodward Karl August Folkers vitamin B12 chemical compound [Режим доступу]: <https://www.britannica.com/science/vitamin-B12>
6. Стаття Health Benefits of Vitamin B12 Poonam Sachdev [Режим доступу]: <https://www.webmd.com/diet/health-benefits-vitamin-b12>
7. Інтернет джерело: PubChem [Режим доступу]: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cobalamin>
8. Yamada K (2013). "Cobalt: Its Role in Health and Disease". In Sigel A, Sigel H, Sigel RK (eds.). Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Metal Ions in Life Sciences. Vol. 13. Springer. pp. 295–320.
9. Стаття Álvaro Calvillo, Teresa Pellicer, Marc Carnicer, and Antoni Planas Bioprocess Strategies for Vitamin B12 Production by Microbial Fermentation and Its Market Applications
10. Fang Huan; Kang Jie; Zhang Dawei. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. Microbial Cell Factories. 2017, 16(1):15. doi:10.1186/s12934-017-0631-y.

11. Xia Wei; Chen Wei; Peng Wei-fu; Li Kun-tai. Industrial vitamin B12 production by *Pseudomonas denitrificans* using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2015, 38(6): 1065–1073. doi:10.1007/s00449-014-1348-5.
12. Wang Peng, Shen Chen, Li Luwei, Guo Jinfeng, Cong Qinqin, Lu Jialin. Simultaneous production of propionic acid and vitamin B12 from corn stalk hydrolysates by *Propionibacterium freudenreichii* in an expanded bed adsorption bioreactor. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2020: 1–5. doi:10.1080/10826068.2020.1734942.
13. Yeruva Thirupathaiah; Chiliveri Swarupa Rani; Marrivada Sudhakara Reddy; Linga Venkateswar Rao. Effect of chemical and microbial vitamin B12 analogues on production of vitamin B12. 2012, 28(5): 2267–2271. doi:10.1007/s11274-012-1011-8.
14. Microbe Wiki [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_denitrificans.
15. Todar's Online Textbook of Bacteriology [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
16. GBIF Secretariat [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.gbif.org/uk/species/4902180>
17. Vasavada, A., & Sanghavi, D. K. (2023). Cyanocobalamin. In StatPearls. StatPearls Publishing.
18. Brito, A., Chiquette, J., Stabler, S. P., Allen, R. H., & Girard, C. L. (2014). Supplementing lactating dairy cows with a vitamin B12 precursor, 5,6-dimethylbenzimidazole, increases the apparent ruminal synthesis of vitamin B12. *Animal*, 9(01), 67–75. doi:10.1017/s1751731114002201.
19. Влізло В.В., Куртяк Б.М., Сологуб, Л.І. (2007) Біохімічні основи нормування вітамінного живлення корів 2. Водорозчинні вітаміни. *Біологія тварин*. 9 (1-2), 43-54.
20. В Україні поголів'я великої рогатої худоби за рік скоротилося на 15,6% - Асоціація виробників молока [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interfax.com.ua/news/economic/900290.html>
21. REVITA-B12 BY REFIT [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://refitanimalcare.com/revita-b12-vitamin->

- [supplement/#:~:text=Vitamin%20B12%20is%20one%20of,to%20grow%20and%20develop%20rapidly](#)
22. Fang, H., Kang, J., & Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microbial cell factories*, 16(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0631-y>.
23. Xia, W., Chen, W., Peng, W. F., & Li, K. T. (2015). Industrial vitamin B12 production by *Pseudomonas denitrificans* using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(6), 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1348-5>.
24. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Електроний ресурс] Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/pae00010>
25. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П., Гуляев В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 71 с
26. Інтернет джерело: МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ із застосування засобу «Полідез» з метою дезінфекції та передстерилізаційного очищення [Режим доступу]: <chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://cci.vn.ua/wp-content/uploads/2020/04/Polydez-Ynstruktsyya-MOZ-Ukraynu-polnaya-1.pdf>
27. Інтернет джерело: МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ із застосування засобу "Мікробак форте" з метою дезінфекції та передстерилізаційного очищення [Режим доступу]: chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://dezplus.com.ua/files/45/137/Instruktsiya_Mikrobak_forte_2019.pdf
28. Інтернет джерело Лагос груп [Режим доступу]: <https://lagos.in.ua/ua/p703721320-delakson-dezinfitsiruyuschee-sredstvo.html>

29. Електронний ресурс Альфадез [Режим доступу]:
http://dezshare.ua/documents/392/Alfadez_instr_12-08_2008.pdf
30. Промислова проточна центрифуга СЕРА Z 101 / Z 101 GP. // БіоТехно.
[Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://biotechno.ru/catalog/protochnyetsentrifugi/promyshlennaya-protochnaya-tsentrifuga-sera-z-101/>
31. Стрічкові вакуумні фільтри. // ООО «КемИнС». [Електронний ресурс]
Режим доступу: https://www.cesolutions.ru/production/obezvozhivanie_i_filtratsiya/le ntochnye_vakuumnye_filtry/
32. Microbe Notes [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://microbenotes.com/cell-disruption-methods/>
33. DRAWELL Artist of Science [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://www.drawellanalytical.com/detailed-analysis-of-high-pressure-homogenizer-for-cell-disruption/>
34. DRAWELL Artist of Science [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://www.drawellanalytical.com/what-are-different-types-of-homogenizers-and-how-to-select-the-appropriate-type/>
35. Zaiput Flow Technologies [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://www.zaiput.com/product/multistage-extraction/>
36. Фармацевтична енциклопедія [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2323/ekstrakciya>
37. Букліб [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://buklib.net/books/36204/>
38. Elemash [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://elemash.com/info/convective-drying-method>
39. Barnalab [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://www.barnalab.com/en/blog/freeze-drying-process-and-stages/>

40. ScienceDirect [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/thermal-drying>
41. Waldner [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.waldner.de/en/products/process-systems/vacuum-drying-cabinets/>
42. Амінокислоти та вітаміни [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://kreon-d.com.ua/ua/>
43. Гнучка упаковка для кормів і засобів для догляду за тваринами. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://gorapaketov.ru/gibkaya-upakovka/dlyakormov-i-sredstv-dlya-uhoda-za-zhivotnymi/>
44. Автомат фасувально-пакувальний NP-SH1000 (зі шнековим дозатором). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://packhouse.com.ua/p1343292742-avtomat-fasovochno-upakovochnyj.html>
45. Дозатор ваговий FOYER FZ-2000 вібрлотковий прямої дії. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://kozakplus.ua/products/granulepackaging-machines/fz-2000>
46. Stabler S. P. Vitamin B12 deficiency. *New England Journal of Medicine*, 2013, 368(2), 149-160. doi: 10.1056/NEJMcp1113996.
47. Fire Group [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://krebs-feed.com.ua/product/%D0%B2%D1%96%D1%82%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD-%D0%B212/>
48. Вітамін В12 (кобаламін, ціанокобаламін). Опис, джерела і функції вітаміну В12 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://newmark.com.ua/?p=14194>.
49. Вітамін В12 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://harchi.info/encyclopedia/vitamin-v12>.
50. Ціанокобаламін [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medbrowse.com.ua/ua/cianokobalamin-instrukcija>.

- 51.Повітрозбірники горизонтальні та вертикальні типу АІІ серії 5.903-20 і 5.903-2 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p3866044-vozduhosborniki-gorizontalnye-vertikalnye.html>
- 52.Фільтруючий матеріал G4 від NEW FILTER [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html>
- 53.Поршневий компресор ВКП F AB 515-10-200 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://kompessor.kiev.ua/katalog/porshnevuye-kompessory/vkp-f-seriya-industrial76/kompessor-vkp-f-ab-515-10-200.html>
- 54.ТЕПЛООБМЕННИКИ ДЛЯ КОТЛОВ, ВЕНТИЛЯЦИИ, КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://termoprom.com.ua/teploobmenniki/po-naznacheniyu/teploobmenniki-dlya-kotlov-ventilyacii-kondicionirovaniya>
- 55.Ресивер повітряний горизонтальний (500 літрів, 11,5 Бар) синій ПЗГ 500-600-11-02 [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://energopak.com/kompresorna-tehnika/resiveri/resiver-povitryaniy-gorizontalnyy-500-litriv-11-5-bar-siniy-pzg-500-600-11-02/?gclid=CjwKCAiAvJarBhA1EiwAGgZl0ATjKEQmFypG9zKRGsw4kUv_Y_NltTUOT4PF2o9QKs6H6jHQ3V52MxoCjpAQA_vD_BwE
- 56.Система підігріву повітря [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php
- 57.Повітряні фільтри карманні, клас фільтрації F9 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/vozdushnye-filtry-karmannyye-klass-filtratsii-f9/>
- 58.Реактор лабораторний 5 л. 1 Бар, 10Бар. Для диспергування, емульгування, гомогенізації, розчинення, одержання емульсій і суспензій у лабораторних умовах. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ua.all.biz/uk/reaktor-laboratornyj-5-l-1-bar-10bar-dlya-g397718>

59. Реактор нержавіючий 300л із сорочкою нагріву [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://suntehno.com.ua/ua/p1655155437-reaktor-nerzhaveyuschij-300l.html>
60. СКЛЯНИЙ ХІМІЧНИЙ РЕАКТОР НА 30 Л [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ukrchemgroup.com/ua/p1331231533-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html>
61. СКЛЯНИЙ ХІМІЧНИЙ РЕАКТОР НА 5 Л С СОРОЧКОЮ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ukrchemgroup.com/ua/p1387839012-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html>
62. Виготовлення реакторів із неіржавкої сталі в Харкові [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p77565666-izgotovlenie-reaktorov-nerzhavejki.html?&primelead=Mі4x>
63. Комбінований дозатор [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://sweda.com.ua/ua/produksiya/kombinirovanniyi-dozator/>
64. Реактор 500 літрів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://stprom.com.ua/ua/p1016492596-reaktor-500-litrov.html>
65. СКЛЯНИЙ РЕАКТОР ІЗ СОРОЧКОЮ S212 ОБ'ЄМ 10 ЛІТРІВ, РЕАКЦІЙНИЙ КОТЕЛ [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://hms-ua.com/p1445439783-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html?source=merchant_center&utm_source=a5o5_adwords&utm_medium=cpc&utm_campaign=cid_20813693912_search&utm_term=&gclid=Cj0KCQiAgqGrBhDtARIsAM5s0_kwNX2XpSqfDTV2KJIWIHes_ZJMHXwjEFbQY-pjVzYGNue54sADqoEaAuQLEALw_wcB
66. РЕАКТОР ГОМОГЕНІЗАТОР 40Л [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://khimmix.ua/ua/himicheskie-reaktory/reaktor-gomogenizator-40l>
67. Насос Grundfos UPS [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://modernsys.com.ua/tsirkulyatsionnyu-nasos-grundfos-ups-25-60-130-19121.html>

68. Ферментер | Біореактор із нержавіючої сталі для вашої лабораторії [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D1%83%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B5-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/biostat%C2%AE-cplus.html>
69. Біореактори з нержавіючої сталі, що виготовляються на замовлення. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D1%83%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B5-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/%D0%B8%D0%B7%D0%B3%D0%BE%D1%82%D0%B0%D0%B2%D0%BB%D0%B8%D0%B2%D0%B0%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BF%D0%BE%D0%B4-%D0%B7%D0%B0%D0%BA%D0%B0%D0%B7-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B-%D0%B8%D0%B7-%D0%BD%D0%B5%D1%80%D0%B6%D0%B0%D0%B2%D0%B5%D1%8E%D1%89%D0%B5%D0%B9-%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BB%D0%B8.html>
70. Стерилізуючі фільтри для газів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://novafilter.tech/products/f%D1%96ltri/steril%D1%96zuyushh%D1%96/dlya-gaz%D1%96v>
71. ЦКТ на 3000 літрів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://termopab.com.ua/ua/p773370876-tskt-3000-litrov.html>
72. Мікробіологічний моніторинг (мікробіологічний контроль) підприємств. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.interdez.com.ua/mikrobiologicheskij-monitoring-predpriyatij>

- 73.Красінько В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія». – К.: НУХТ, 2019. – с. 144-157.
- 74.Пирог Т. П., Антонюк М.М. Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум для студ. освітнього ступеня «Бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія». – К.: НУХТ, 2016. – с. 21-35.
- 75.Todar's Online Textbook of Bacteriology [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
- 76.Microbe Wiki [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_denitrificans .
77. Патока крохмальна ДСТУ 4498:2005 [Електронний ресурс]. Режим доступу: chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://ksv.do.am/GOST/DSTY_ALL/DSTY2/dsty_4498-2005.pdf
78. Spectro LAB [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://spectrolab.com.ua/ua/p16688132-saharimetr.html>
- 79.Agilent [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography/hplc-systems/analytical-hplc-systems/1260-infinity-ii-lc-system>
80. G. Prabakaran · S. L. Hoti InXuence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of -endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the large-scale production of the mosquito control agent DOI 10.1007/s10295-008-0370-5
81. Justyna Bohacz , Teresa Kornilowicz Kowalska Ignacy Kitowski, Anita Ciesielska Degradation of chicken feathers by *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* strains from pellets of predatory birds and its practical aspect <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104968>
82. Justyna Bohacz , Teresa Kornilowicz Kowalska Ignacy Kitowski,

Anita Ciesielska Degradation of chicken feathers by *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* strains from pellets of predatory birds and its practical aspect <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104968>

83. Biotal [Електроний ресурс] / Режим доступу: <https://biotal.ua/tekhnohiiia-biotal/>