

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

«__» червня 2022 р.

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

«__» червня 2022 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 1,3-пропандіолу *Clostridium butyricum*

Виконала: здобувачка 4 курсу, групи 1

ПОПОВА Юлія Олегівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

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

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

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Оксана ЯНЧУК
(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 - 2022 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

“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПОПОВОЇ Юлії Олегівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез 1,3-пропандіолу *Clostridium butyricum*

керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна, к.б.н., доц.,

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 01.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Clostridium butyricum* AKR102a,
цільовий продукт: 1,3-пропандіол, об'єм виробничого ферментера – 0,4 м³,
коефіцієнт заповнення – 0,8

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика 1,3-пропандіолу. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика *Clostridium butyricum*. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми виробництва 1,3-пропандіолу. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва 1,3-пропандіолу.

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виробництва 1,3-пропандіолу – 2 аркуші формату А2. Апаратурна схема виробництва 1,3-пропандіолу – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика 1,3-пропандіолу	04.04.22-09.04.22	
2	Обґрунтування вибору та характеристика <i>Clostridium butyricum</i>	10.04.22-15.04.22	
3	Техніко-економічне обґрунтування	16.04.22-01.05.22	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва 1,3-пропандіолу	02.05.22-07.05.22	
5	Специфікація обладнання	08.05.22-13.05.22	
6	Опис технологічної схеми виробництва 1,3-пропандіолу	14.05.22-19.05.22	
7	Контроль виробництва 1,3-пропандіолу	20.05.22-25.05.22	
8	Оформлення пояснювальної записки	26.05.22-31.05.22	
9	Виконання графічної частини проекту	01.05.22-01.06.22	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юлія ПОПОВА
(ім'я та прізвище)

Оксана СКРОЦЬКА
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню апаратурної та технологічної схем біосинтезу 1,3-пропандіолу *Clostridium butyricum*. На основі аналізу та порівняння потенційних продуцентів 1,3-пропандіолу, складу та цін поживних середовищ для їх культивування було обрано штам *Clostridium butyricum* AKR102a, який порівняно з іншими характеризується вищою здатністю до синтезу 1,3-пропандіолу (концентрація 1,3-пропандіолу – 93,7 г/л). Розрахована потужність виробництва становить 300 кг 1,3-пропандіолу на рік.

Технологічний процес складається з допоміжних робіт (підготовка азоту, приготування та стерилізація титрувальних агентів, підготовка та зберігання підживлювального розчину гліцерину, приготування та стерилізація поживних середовищ) та основних робіт (вирощування посівного матеріалу у флаконах, закритих гумовими пробками, інокуляторі та ферментері).

Кваліфікаційна робота викладена на 57 сторінках друкованого тексту, містить 11 таблиць, 3 рисунки і складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (35 джерел) та графічної частини (2 креслення формату A1 і A2).

Ключові слова: 1,3-пропандіол, гліцерин, бактерія *Clostridium butyricum* AKR102a, анаеробний біосинтез.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ЗМІСТ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Характеристика 1,3-пропандіолу.....	7
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика <i>Clostridium butyricum</i> ...	9
2.1. Обґрунтування вибору <i>Clostridium butyricum</i> та поживного середовища для його культивування.....	9
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Clostridium butyricum</i>	13
2.3. Таксономічний статус <i>Clostridium butyricum</i>	14
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	15
3.1. Потреба у 1,3-пропандіолі.....	15
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	16
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів...	20
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	21
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	24
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	24
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	24
4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки азоту.....	26
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	26
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	31
4.1.5. Обґрунтування внесення підживлювального розчину гліцерину під час виробничого біосинтезу.....	32
4.1.6. Обґрунтування вибору розчинів для стабілізації рН.....	33
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	34
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	36
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва 1,3-пропандіолу.....	44
7.1. Мікробіологічний контроль.....	44
7.2. Показники росту <i>Clostridium butyricum</i> AKR102a і синтезу 1,3-пропандіолу.....	45
7.2.1. Визначення концентрації біомаси і 1,3-пропандіолу.....	45
7.2.2. Визначення концентрації джерела вуглецю (гліцерину) та азоту (хлориду амонію).....	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	54

ВСТУП

1,3-Пропандіол – цінна сполука з широким спектром застосування. В основному застосовується в таких галузях, як косметична, лакофарбова, харчова промисловість, виготовлення антифризу та синтез різних поліефірів [1].

Пропандіол в косметичних засобах має ряд переваг над іншими аналогами. Він добрий розчинник, зволожувач, пом'якшувач шкіри, зменшує липкість, діє як консервант, підвищує гідратацію та ін. [2].

Продуцент 1,3-пропандіолу - *Clostridium butyricum* AKR102a, який є анаеробною спороутворюючою грампозитивною паличкою (бацилою), що локалізується у верхніх шарах ґрунту в різних частинах світу, в тому числі і в Україні. *C. butyricum* широко застосовується для біосинтезу 1,3-пропандіолу на середовищі із технічним гліцерином [3].

Ринок пропандіолу є наповненим, а перспективи його розвитку є ще більшими. Ця перспектива – використання для поживного середовища технічного гліцерину, який є побічним продуктом виготовлення біопалива. Так як обсяги виробництва біодизелю збільшуються, теоретично можливе і збільшення обсягів виробництва 1,3-пропандіолу. Таким чином дане виробництво вирішує одразу дві проблеми – утилізація відходів виробництва біодизелю та біосинтез пропандіолу без використання не відновлювальних ресурсів [4].

Також, важливо зазначити, що *C. butyricum* здатен синтезувати 1,3-пропандіол навіть при присутності у середовищі різних домішок, що значно полегшує біотехнологічний процес [5].

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник	Попова Ю.О.				ВСТУП	Літера	Арквш	Арквшів
Керівник	Скроцька О.І.						5	57
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

Новизною кваліфікаційної роботи є використання технічного гліцерину, який являється побічним продуктом при виробництві біопалива, як основного складника поживного середовища для *C. butyricum* AKR102a при біосинтезі 1,3-пропандіолу – сполуки, яка широко використовується в багатьох галузях промисловості, зокрема у косметичних засобах [6].

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник		Попова Ю.О.			ВСТУП	Літера	Арквш	Арквшів
Керівник		Скроцька О.І.					6	57
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.Г.						

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА 1,3-ПРОПАНДІОЛУ

1,3-Пропандіол (1,3-пропіленгліколь) – органічна сполука, яка має формулу $C_3H_8O_2$. Цей трьохвуглецевий діол представляє собою прозору в'язку рідину, котра змішується з водою [7].



Рис. 1.1. Структурна формула 1,3-пропандіолу

Молярна маса – 76 г/моль;

Густина – 1,0597 г/мл;

Температура плавлення – - 27°C;

Температура кипіння – 214 °C.

1,3-Пропандіол – цінна сполука з широким спектром застосування. В основному використовується для синтезу різних полієфірів. Він також застосовується в інших галузях, таких як лакофарбова, косметична та харчова промисловість, виготовлення антифризу [1].

У фармацевтичній промисловості використовувались обидва ізомери пропандіолу. В основному пропандіол застосовували як зволожувач, консервант та розчинник. Проте з 1969 року за вимогами Міжнародної Фармакопеї для фармацевтичних потреб слід використовувати тільки 1,2-пропандіол.

Звичайним способом виробництва пропандіолу є хімічний шлях. Пропандіол зазвичай отримують шляхом гідратації акролеїну або із оксиетилену. Однак це тягне за собою використання невідновлюваних ресурсів та забруднення навколишнього середовища. Обсяг виробництва складає близько 100 тис. т на рік. Недоліками даного способу є низька селективність, енергоємність, висока вартість та негативний вплив на навколишнє середовище [8].

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник	Попова Ю.О.				РОЗДІЛ 1. Характеристика 1,3- пропандіолу	Літера	Арквш	Арквшів
Керівник	Скροцька О.І.						7	57
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

Альтернативний варіант – синтез пропандіолу за допомогою мікроорганізмів (роди *Clostridium*, *Klebsiella*, *Citrobacter* та *Enterobacter*). В останній час більш гостро стоїть питання переробки побічних продуктів виробництва. Гліцерин є побічним продуктом виробництва біодизелю. У значних масштабах він потрапляє в навколишнє середовище, стає причиною його забруднення. Використання гліцерину, може стати одним з шляхів зниження вартості виробництва біодизелю. Тому в даний час ведуться інтенсивні пошуки способів переробки технічного гліцерину в більш цінні продукти. Він може використовуватися для як джерело вуглецю для культивування мікроорганізмів з метою синтезу пропандіолу [9].

Також прикладом біотехнологічного виробництва пропандіолу є його синтез із кукурудзяного сиропу. Цим у 2004 році почали займатися компанії DuPont Tate & Lyle. Вони розробили систему біосинтезу пропандіолу із застосуванням модифікованого штаму *E.coli*. Процес біосинтезу потребує на 40 % менше затрат енергії, ніж традиційний спосіб синтезу пропандіолу [10].

Таким чином можна виділити такі переваги біотехнологічного виробництва пропандіолу:

- 1) використання відновлювальних ресурсів;
- 2) використання побічних продуктів виробництва інших галузей, замість їх накопичення та утилізації;
- 3) менші затрати енергії.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*

2.1. Обґрунтування вибору *Clostridium butyricum* та поживного середовища для його культивування

1,3-Пропандіол синтезується різноманітними мікроорганізмами, однак найбільш продуктивними продуцентами пропандіолу є штами *Clostridium butyricum* AKR102a, *Clostridium butyricum* DSP1, *Clostridium butyricum* JKT37 та *Clostridium butyricum* NCIMB 8082. Для того, щоб обрати найефективнішого, необхідно порівняти їх здатність до синтезу пропандіолу, умови культивування тощо. Така порівняльна характеристика наведена в табл. 2.1.

Дані, наведені у табл. 2.1, свідчать, що приблизно однакову тривалість культивування, як і склад поживного середовища, мають *Clostridium butyricum* AKR102a, *Clostridium butyricum* DSP1 та *Clostridium butyricum* JKT37, проте кількість 1,3-пропандіолу, що вони синтезують, різна. На наступному етапі вибору біологічного агента розраховуємо вартість поживних середовищ для культивування вибраних мікроорганізмів (табл. 2.2).

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, середовище для культивування *Clostridium butyricum* JKT37 є майже в 4 та 1,5 рази дешевшим, ніж для *Clostridium butyricum* AKR102a і *Clostridium butyricum* DSP1 відповідно. Проте кількість синтезованого пропандіолу штаму *Clostridium butyricum* AKR102a є більшою, ніж *Clostridium butyricum* JKT37.

Тому для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розраховуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що умовна вартість 1,3-пропандіолу, синтезованого штамом *Clostridium butyricum* AKR102a, є однією з менших (0,136 грн/г), а кількість утвореного пропандіолу за 1 год – найвищою (3,35 г/год).

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика <i>Clostridium butyricum</i>	Літера	Аркшш	Аркшів
Розробник	Попова Ю.О.						9	57
Керівник	Скроцька О.І.					Кафедра БТМ		
Н. контр								
Консульт								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

Особливості одержання 1,3-пропандіолу на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація 1,3-пропандіолу, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Clostridium butyricum</i> AKR102a	Гліцерин Дріжджовий екстракт KH ₂ PO ₄ NH ₄ Cl MgSO ₄ ×7H ₂ O CaSO ₄ ×2H ₂ O FeSO ₄ ×7H ₂ O	180 (початкова – 28) 5 2,71 2,69 0,1857 0,025 0,015	28	93,7	t°=32°C; n=50 об/хв; pH=6,95	E. Wilkens, A. K. Ringel, D. Hortig, T. Willke, K. D. Vorlop. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by <i>Clostridium butyricum</i> AKR102a. <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> (2012) 93:1057–1063. doi:10.1007/s00253-011-3595-6.
<i>Clostridium butyricum</i> DSP1	Гліцерин K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ ×7H ₂ O CaCl ₂ ×2H ₂ O FeCl ₂ ×7H ₂ O Дріжджовий екстракт	50 0,26 0,02 1,23 0,1 0,01 0,01 2	33	37	t°=37°C; n=50 об/хв; pH=7	D. Szymanowska-Powałowska, W. Białas. Scale-up of anaerobic 1,3-propanediol production by <i>Clostridium butyricum</i> DSP1 from crude glycerol. <i>BMC Microbiol.</i> (2014) 14:45. doi:10.1186/1471-2180-14-45.
<i>Clostridium butyricum</i> JKT37	Гліцерин K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ ×7H ₂ O CaCl ₂ ×2H ₂ O Дріжджовий екстракт	40 3,4 1,3 2 0,2 0,02 1	24	19,6	t°=35°C; n=50 об/хв; pH=7	Z. K. Tee, J. M. Jahim, J. P. Tan, B. H. Kim. Preeminent productivity of 1,3-propanediol by <i>Clostridium butyricum</i> JKT37 and the role of using calcium carbonate as pH neutraliser in glycerol fermentation. <i>Bioresource Technology</i> (2017) 233:296-304. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.110.
<i>Clostridium butyricum</i> NCIMB 8082	Гліцерин K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ ×7H ₂ O CaCl ₂ ×2H ₂ O CaCO ₃ Дріжджовий екстракт	20 3,4 1,3 2 0,2 0,02 2 1	30	14	t°=37°C; n=50 об/хв; pH=7	T. Ferreira, V. Saab, P. Matos, C. Ribeiro, M. Coelho. Evaluation of 1,3-propanediol production from glycerine by <i>Clostridium butyricum</i> NCIMB 8082. <i>Chemical Engineering Transactions</i> (2014) 38:475-480. doi:10.3303/CET1438080.

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів 1,3-пропандіолу

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації*
1	2	3	4	5	6
<i>Clostridium butyricum</i> AKR102a	Гліцерин	180	30	5,4	1
	Дріжджовий екстракт	5	1440	7,2	2
	KH ₂ PO ₄	2,71	50	0,1355	3
	NH ₄ Cl	2,69	19	0,05111	4
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1857	10,8	0,002	5
	CaSO ₄ ×2H ₂ O	0,025	3,9	0,0000975	6
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,015	6,6	0,000099	7
Вартість 1 л середовища – 12,80 грн					
<i>Clostridium butyricum</i> DSP1	Гліцерин	50	30	1,5	1
	K ₂ HPO ₄	0,26	90	0,0234	8
	KH ₂ PO ₄	0,02	50	0,001	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,23	10,2	0,012546	9
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	10,8	0,00108	5
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,01	3,9	0,000039	6
	FeCl ₂ ×7H ₂ O	0,01	6,6	0,000066	7
Дріжджовий екстракт	2	1440	2,88	2	
Вартість 1 л середовища – 4,42 грн					
<i>Clostridium butyricum</i> JKT37	Гліцерин	40	30	1,2	1
	K ₂ HPO ₄	3,4	90	0,306	8
	KH ₂ PO ₄	1,3	50	0,065	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2	10,2	0,0204	9
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,2	10,8	0,00216	5
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,02	3,9	0,000078	6
	Дріжджовий екстракт	1	1440	1,44	2
Вартість 1 л середовища – 3,04 грн					

Примітка. * Ціни наведено станом на січень 2021 р.

- <https://www.systopt.com.ua/ru/item-glitseryn-dystylovanyj>
- <http://mspartner.com.ua/pitatelnye-sredy/drozhzhevoj-ekstrakt-detail>
- <https://kiev.flagma.ua/uk/kaliy-fosfornokisly-1-zameshchenny-o9380126.html>
- <https://kiev.flagma.ua/uk/hlorid-ammoniya-o4233031.html>
- <https://www.systopt.com.ua/ru/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu>
- <https://www.systopt.com.ua/ru/item-kaltsij-sirchanokyslyj-kaltsiyu-sulfat-2-vodnyj>
- <https://www.systopt.com.ua/ru/item-zalizo-sirchanokysle-7-vodne>
- <https://www.systopt.com.ua/ru/item-kalij-fosfornokyslyj-kaliyu-fosfat-2-zamishhenyj>
- <https://www.systopt.com.ua/ru/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amoniyu>

**Умовна вартість 1 г 1,3-пропандіолу, синтезованого на суміші
ростових субстратів**

Біологічний агент	Концентрація 1,3-пропандіолу, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного 1,3-пропандіолу за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Clostridium butyricum</i> AKR102a	93,7	28	3,35	12,80	0,136
<i>Clostridium butyricum</i> DSP1	37	33	1,12	4,42	0,119
<i>Clostridium butyricum</i> JKT37	19,6	24	0,82	3,04	0,155

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

Clostridium butyricum

Clostridium butyricum – суворо анаеробна грампозитивна, спороутворююча паличка, названа за своєю здатністю виробляти велику кількість масляної кислоти. Вперше її виділили із кишечника свині у 1880 році [11].

Морфолого-культуральні ознаки

C. butyricum – грампозитивні прямі або злегка зігнуті палички, розміром 0,5-1,7 x 2,4-7,6 мікрметри, із закругленими кінцями; трапляються поодинокі, парами або короткими ланцюжками, іноді у вигляді довгих ниток. Рухаються перитрихіальними джгутиками. Бактерії є спороутворюючими, спори мають овальну форму та змінюють форму материнської клітини. Споруляція може відбуватися як у рідкому, так і на твердому середовищі [11].



Рис. 2.1. Клітини *C. butyricum* під мікроскопом.

Ріст на агарі або м'ясному бульйоні слабкий або відсутній. Росте на глюкозному агарі: колонії діаметром 1-3 мм, від білого до кремового кольору, від глянцевого до матового поверхневого покриву. На кров'яному агарі колонії діаметром 1-6 мм, круглі або неправильної форми, опуклі, напівпрозорі, біло-сірі, блискучі або тьмяні, гладкі, із зернистою або строкатою внутрішньою структурою [12].



Рис. 2.2. Колонії *C. butyricum* на кров'яному агарі.

Фізіолого-біохімічні ознаки

C. butyricum виробляє масляну, оцтову та мурашину кислоту.

Може гідролізувати крохмаль, здатний фіксувати атмосферний азот, може використовувати як субстрат гліцерин, целобіозу, фруктозу, галактозу, глюкозу, лактозу, мальтозу, манозу, рафінозу, рибозу, трегалозу та ксилозу.

Не здатний гідролізувати казеїн та желатин, виробляти індол, ліпазу, лецитиназу. Не росте на середовищі із 6,5% NaCl.

Ріст відбувається легко на середовищі з гліцерином та мінеральними солями. Оптимальна температура для росту 25-37°C [13].

2.3. Таксономічний статус *Clostridium butyricum*

Сучасна класифікація *C. butyricum* згідно з таксономією NCBI [14].

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Clostridia*

Порядок: *Clostridiales*

Родина: *Clostridiaceae*

Рід: *Clostridium*

Вид: *Clostridium butyricum*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у 1,3-пропандіолі

1,3-Пропандіол залучається до виробництва косметичних засобів, антифрізів, засобів для догляду за одягом, фарб для малювання, будівельних матеріалів, мийних засобів та клеїв. Отже, спектр застосування цієї речовини є достатньо великим [1].

В косметичних засобах 1,3-пропандіол використовується як зволожувач, розчинник, підсилювач консервантів, носій активних косметичних інгредієнтів, натуральний ефір у косметичних інгредієнтах. Також 1,3-пропандіол підвищує гідратацію при використанні у засобах для волосся та тіла [15]. Свіжі наукові дослідження вказують, що його застосування більш рентабельне, ніж пропіленгліколю та бутиленгліколю. У поєднанні з гліцерином 1,3-пропандіол проявляє синергетичний ефект, який зменшує липкість гліцерину, одночасно підсилюючи рівень гідратації. Навіть при високих концентраціях він має низький потенціал до подразнення або сенсibilізації шкіри [10].

Наукові дослідження у сфері косметології демонструють ряд переваг 1,3-пропандіолу над іншими аналогами [16]:

- Відсутність ефекту липкої шкіри;
- Підсилювач загальної в'язкості косметичного засобу, що запобігає розтіканню;
- Підсилювач чіткості для систем ПАР;
- Підвищена стійкість до заморожування/розморожування та нагрівання;
- Ефективний розчинник для важкорозчинних інгредієнтів, а також рослинних екстрактів;

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробник</i>		Попова Ю.О.					15	57
<i>Керівник</i>		Скροцька О.І.						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.Г.						
						Кафедра БТМ		

- Підвищує ефективність консервантів;
- Гігроскопічний, добре зволожує шкіру та волосся.

З віком у жінок сповільнюються обмінні процеси в організмі, шкіра втрачає вологу та колаген, стає менш пружною й еластичною, починається формування «гусячих лапок», складок біля носа та губ, вікових і мімічних зморшок на лобі. Якщо не займатися своєю зовнішністю, шкіра швидко почне ставати в'ялою й обвисати, з утворенням брилів і глибоких зморшок. Зупиняти старіння повністю лікарі поки що не навчилися, але його можна значно сповільнити за допомогою косметичних засобів [17].

Станом на 1 жовтня 2021 року загальна чисельність населення України становила 41,4 млн осіб (дані Державної служби статистики України <http://www.ukrstat.gov.ua/>). Звідси загальна чисельність жінок складає близько 54%, тобто 22,4 млн осіб.

Оскільки проблема зморшок у жінок віком від 55 до 65 років є найбільш актуальною, частина жінок даної вікової категорії (приблизно 30%) використовує протизморшкові засоби для догляду за шкірою. До таких засобів найчастіше відносять креми від зморшок або сироватки. Серед загальної кількості жінок України дана вікова категорія складає приблизно 13%, тобто 2,9 млн осіб. Тоді кремами від зморшок користуються близько 870 тис. жінок.

3.2. Розрахунок потужності виробництва 1,3-пропандіолу

Наразі на косметичному ринку України можна побачити засоби проти зморшок таких виробників: Vichy, La Roche-Posay, Garnier, L'Oreal, CeraVe, Avène, Clarins (Франція); Біокон (Україна); Mizon, Elizavessa (Корея); Nivea (Німеччина); Lamel (Англія); Oriflame (Швейцарія); Ziaja (Польща); Вітекс (Білорусь); Natura Siberica, Green Mama (Росія); Estée Lauder (США) та ін. [18].

Перелік найпопулярніших кремів проти зморшок в Україні представлено в таблиці 3.1.

Перелік найпопулярніших кремів проти зморшок в Україні

Назва	Країна-виробник	Об'єм, мл	Ціна, грн.	Джерело інформації*
1	2	3	4	5
Крем від зморшок La Roche-Posay Nutritic Intense Riche	Франція	50	596	1
Денний крем Garnier Skin Naturals Intensive Restore	Франція	50	125	2
Крем для корекції зморшок і відновлення пружності Vichy Liftactiv Supreme	Франція	50	725	3
Крем-ліфтинг проти глибоких зморшок Біокон	Україна	50	76	4
Крем-ліфтинг денний для обличчя Вітэкс Lift Intense	Білорусь	50	210	5
Зволожуючий крем проти зморшок L'Oreal Paris Triple Active Day	Франція	50	171	6

Денний крем Nivea проти зморшок з маслом винограду та вітаміном Е	Німеччина	50	130	7
Natura Siberica Caviar заповнювач зморшок поліколагеновий	Росія	50	420	8
Крем Zaija натуральний оливковий проти зморшок	Польща	50	109	9
Універсальний крем для молодості шкіри Estée Lauder Revitalizing Supreme + Global Anti-Aging Cell Power Creme	США	50	300	10

Примітка. * Ціни наведено станом на жовтень 2021 р.

1. https://baby.maudau.com.ua/product/pozhyvnyi-krem-shcho-rekonstruiue-la-roche-posay-nutritic-intense-riche-dlia-sukhoi-shkiry-50-ml?gclid=Cj0KCQiAk4aOBhCTARIsAFWFP9Hgnoe9f5f9vwBT6LyJW1Fd6sl2G6-SSJhGpH3tL3emL0DTJQUyi5waAo7REALw_wcB

2. https://makeup.com.ua/product/78007/?gclid=Cj0KCQiAk4aOBhCTARIsAFWFP9F-ZCMDuISjUJVHbWV_Obiir7EFnQK8Bb1eRV4DLf8R7cBnK-XGdsaAljbEALw_wcB

3. https://parfums.ua/ua/product/sredstvo-protiv-stareniya-dlya-normalnoy-i-kombinirovannoy-kozhi-vichy-liftactiv-supreme?skuId=497954&gclid=Cj0KCQiAk4aOBhCTARIsAFWFP9FdUg24iP2o3qauNVsQOR_5-PoqHnbni2otC_jniJOA7f5c-8dPvdsaAmt-EALw_wcB

4. https://parfums.ua/product/krem-dlya-litsa-protiv-glubokikh-morshchin-lifting-naturalnyy-ukhod-biokon?skuId=410968&gclid=Cj0KCQiAk4aOBhCTARIsAFWFP9Gs038Cp1ifB9wxWDsGCBZfHqXKjGWA7yuIPGDf71VVNfMW3gRvpUkaAqi2EALw_wcB

5. https://parfums.ua/product/krem-lifting-dnevnoj-dlya-lica-podtyagivanie-i-uvlazhnenie-viteks-lift-intense?skuId=705596&gclid=Cj0KCQiAk4aOBhCTARIsAFWFP9ETLP3jz2cpiIyFXiSJ7ycXRbsLCfYocBh9vHloNNXVGi3R5teHkeQaAoglEALw_wcB

6. https://makeup.com.ua/product/34585/?gclid=Cj0KCQiAk4aOBhCTARIsAFWFP9ErHtuyacfKnX51bOByyR_Vz93He2NM6HjClvzxe5Zwm6rgC_TpfUaAqYhEALw_wcB

7. https://rozetka.com.ua/nivea_4005900450876/p58500016/?gclid=Cj0KCQiAk4aOBhCTARIsAFWFP9HGjqu3Na9MOAHji1S2qvPbncUCVHklx4NKGIOOdSYWK9gBsU7KUNcaAnz_EALw_wcB

8. https://naturasiberica.ua/natura-siberica-caviar-zapolnitel-morshchin-polikollogenovyy-40ml/?gclid=Cj0KCQiAk4aOBhCTARIsAFWFP9Gs7N02jRBh9yTZPIiBaR0sUx1O4dsRpIzZ8y98rt6QGn5byV0H8bIaAh2cEALw_wcB

9. https://www.watsons.ua/wtcua/oblichchya/doglyad-dlya-oblichchya/krem-zaija-naturalniy-olivkoviy/p/BP_926784?varSel=926784&gclid=Cj0KCQiAk4aOBhCTARIsAFWFP9EvLDge5-ipyfXAr_4r3rSCXUNkUCJNiswFG47v9aBOaGOQRqSx5wsaAktbEALw_wcB&gclsrc=aw.ds

10. https://princess-shop.com.ua/ua/universalnyy-krem-dlya-molodosti-kozhi-estee-lauder-revitalizing-supreme-global-anti-aging-cell-power-creme-5ml/?gclid=Cj0KCQiAk4aOBhCTARIsAFWFP9HRFbvjEm3GGGRjQnPisVyyegIiRfaXbK83acUnEa00_-33capa1dYaAmUIEALw_wcB

Близько 80-90 % косметичного ринку України складають імпортні продукти. Отже, для початку можемо забезпечити кремом від зморшок ту частину, яка залишилася, візьмемо 17 %. Так, теоретична кількість жінок, які можуть скористатися таким продуктом:

$$870\,000 \times 0,17 = 148 \text{ тис. осіб.}$$

Враховуючи, що на рік для однієї жінки потрібно приблизно 100 мл крему (50 мл крему від зморшок вистачає на 5-7 місяців для однієї жінки), то на загальну кількість жінок потрібно:

$$148\,000 \times 0,1 = 14\,800 \text{ л продукту.}$$

Розрахуємо масу 1,3-пропандіолу у складі крему проти зморшок на 1 рік для усіх жінок. З вищенаведених розрахунків, на 1 рік потрібно 14 800 л крему. В одній баночці з кремом 50 мл міститься 2% 1,3-пропандіолу [19], тобто 20 г міститься в 1 л крему. Отже, 1,3-пропандіолу потрібно:

$$G_{\text{ГП}} = 14\,800 \times 20/1 = 296\,000 \text{ г, або близько } 300 \text{ кг/рік.}$$

Отже, для забезпечення ринку України косметичним засобом, а саме кремом від зморшок, необхідно отримувати 300 кг 1,3-пропандіолу в рік.

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

Вихідні дані для розрахунку:

Потужність виробництва – $G_{\text{ГП}} = 300 \text{ кг}$;

Мінімальна кількість робочих днів у рік – $T_{\text{рд}} = 30$;

Концентрація біомаси в КР – $X_{\text{кр}} = 93,7 \text{ г/л}$;

Час циклу роботи ферментера – $T_{\text{цф}} = 38 \text{ год}$ (28 год – тривалість виробничого культивування, 10 год – час підготовки ферментера до роботи);

Коефіцієнт запасу (втрати КР або посівного матеріалу від нестерильних операцій) – $K_1 = 1,1..1,5$;

Коефіцієнт заповнення ферментера для анаеробного процесу – $K_3 = 0,7..0,8$

Сумарні втрати активності при виділенні готового продукту (сума всіх втрат по стадіям виділення готового продукту) – $E_{\text{св}} = 0,2$;

Втрати КР при біосинтезі – $E_{\phi} = 0,1$.

Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів) та геометричного об'єму ферментера

1. Кількість циклів:

$$N = T_{рд} \times 24 / T_{цф} = 30 \times 24 / 38 = 19 \text{ циклів};$$

2. Кількість продукту за цикл:

$$G_{ц} = G_{гп} / N = 300 / 19 = 16 \text{ кг/цикл};$$

3. Об'єм КР за цикл:

$$V_{кр} = K_1 \times G_{ц} / (X_{кр} \times (1 - E_{св})) = 1,2 \cdot 16 / (93,7 \cdot (1 - 0,2)) = 0,26 \text{ м}^3;$$

4. Робочий об'єм ферментера:

$$V_{рф} = V_{кр} / (1 - E_{\phi}) = 0,26 / (1 - 0,1) = 0,3 \text{ м}^3;$$

5. Можливий геометричний об'єм ферментера при $K_3 = 0,8$:

$$V_{мф} = V_{рф} / K_3 = 0,3 / 0,8 = 0,38 \text{ м}^3;$$

6. Найближчий $V_{гф} = 0,4 \text{ м}^3$;

7. Уточнюємо $K_3 = V_{рф} / V_{гф} = 0,3 / 0,4 = 0,75$, що відповідає визначеним межам (0,7-0,8).

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 0,26 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр} / (1 - E_{\phi}) = 0,26 / (1 - 0,1) = 0,3 \text{ м}^3,$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 0,3 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_3 = 0,7-0,8$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить $V_{\phi} = V_{роб.1} / K_3 = 0,3 / 0,8 = 0,38 \text{ м}^3$.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0,4 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{31} = V_{роб.1} / V_{сф} = 0,3 / 0,4 = 0,75.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 0,3 / (1 + 0,1) = 0,27 \text{ м}^3,$$

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

Кількість посівного матеріалу становить $V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 0,3 - 0,27 = 0,03 \text{ м}^3$.

Для одержання $0,03 \text{ м}^3$ інокуляту кількість поживного середовища та посівного матеріалу становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,03 / (1 - 0,1) = 0,03 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 0,03 / (1 + 0,1) = 0,027 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,03 - 0,027 = 0,003 \text{ м}^3 \text{ або } 3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 0,03 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом $V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{з}} = 0,03 / 0,8 = 0,038 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 0,04 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$K_{\text{з2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 0,03 / 0,04 = 0,75$. Отже, прийнятий ферментер був правильним.

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм2}} = 3 \text{ л}$ можна одержати культивуванням *S. butyricum* у флаконах, закритих гумовими пробками, оскільки біологічний агент є анаеробом. Для цього використовують флакони об'ємом $V_{\text{фл}} = 250 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зф}} = 0,8$.

Тоді кількість флаконів для отримання посівного матеріалу становитиме:

$N_{\text{фл}} = V_{\text{пм2}} / (V_{\text{фл}} \cdot K_{\text{зф}}) = 3 / (0,25 \cdot 0,8) = 15$. Для одержання посівного матеріалу необхідно 15 флаконів.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу 1,3-пропандіолу у ферментері об'ємом 0,4 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,8 буде проходити у два етапи.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу 1,3-пропандіолу приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 0,4 м³ та інокулятор об'ємом 40 л.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Умови і спосіб культивування безпосередньо залежить від фізіолого-біохімічних особливостей біологічного агента - *Clostridium butyricum* AKR102a:

1. Культивування продуцента може здійснюватися поверхневим або глибинним способами. Оскільки усі продукти бродіння отримуються в глибинний спосіб, обираємо саме його.

2. Виробництво 1,3-пропандіолу можна здійснювати періодичним і безперервним способами. Але під час періодичного процесу можна досягти більш повного споживання субстрату мікроорганізмами. На відміну від періодичного процесу під час безперервного можливе вимивання ще неспожитого середовища з ферментера. Зважаючи на це, обираємо періодичний спосіб культивування.

3. Культивування продуцента 1,3-пропандіолу може здійснюватися з підживленням, якщо його концентрація у культуральній рідині є достатньо високою і для його біосинтезу необхідна висока концентрація субстрату. У той же час початкова концентрація субстрату у середовищі не повинна перевищувати 40-60 г/л, оскільки за вищої концентрації буде спостерігатися явище катаболічної репресії і збільшення тривалості лаг-фази. Надалі субстрат вноситься дробно певними порціями у процесі культивування.

4. Виробниче культивування і вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 32 °C і рН 6,95.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літера	Арквш	Арквшів
Розробник		Попова Ю.О.						
Керівник		Скροцька О.І.					24	57
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.Г.						

Оскільки за таких умов розвивається переважна більшість мікроорганізмів, то постає питання про забезпечення асептичних умов під час отримання 1,3-пропандіолу. Для запобігання контамінації проводиться стерилізація обладнання (інокулятори, збірники, реактори, ферментери), комунікацій, поживних середовищ для культивування, розчину титрувального агента.

5. Під час виробничого культивування у ферментері повинні бути створені безкисневі умови, оскільки спиртове бродіння проходить лише в анаеробних умовах. Для забезпечення таких умов можна підтримувати безперервну подачу азоту.

6. Оскільки під час споживання субстрату, окрім 1,3-пропандіолу, можуть утворюватися незначні кількості органічних кислот (лактат тощо), які можуть спричинити підкислення середовища, то необхідно передбачити наявність титрувального агента (розчину лугу) для регуляції рН.

Отже, культивування продуцента 1,3-пропандіолу здійснюється періодично з підживленням глибинним способом в анаеробних умовах із забезпеченням асептики проведення процесу.

Залежно від умов культивування біологічного агента конструкція і оснащення ферментера можуть відрізнятися. Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента, обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення даних умов:

1. У процесі культивування продуцента 1,3-пропандіолу анаеробні умови створюються в результаті відсутності подачі повітря в ферментер, проте для відведення надлишку CO_2 з середовища за необхідності може здійснюватися подача азоту через барботер у ферментер. Тому ферментер повинен бути оснащений барботером для подачі азоту, датчиками $p\text{O}_2$ (для контролю анаеробних умов), газоаналізатором (для контролю концентрації CO_2).

2. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер

оснащується сорочкою і датчиком температури.

3. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН.

4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки азоту

Clostridium butyricum AKR102a - анаеробна бактерія, що не потребує кисню для розмноження. Крім того, кисень здатен інгібувати ріст бактерії. Тому немає необхідності при біотехнологічних процесах проводити аерацію в посівному апараті. Для створення анаеробних умов під час виробничого біосинтезу забезпечують подачу азоту у біореактор. В такому випадку в технологічній схемі передбачається підготовка азоту, яка включає його подачу від балону до інокулятора та ферментера, при цьому відбувається очищення азоту в індивідуальних фільтрах.

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво 1,3-пропандіолу *Clostridium butyricum* AKR102a здійснюється впродовж 30 днів, що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 400 л, інокулятор об'ємом 40 л, реакторизмішувачі та збірники. Відомо, що внутрішній діаметр ферментера об'ємом 400 л становить 0,8 м, а інокулятора об'ємом 40 л – 0,4 м. Відстань між апаратами та стінами повинна становити не менше 1 м, а між ферментером та інокулятором – не менше 2 м для забезпечення безпечного та швидкого переміщення персоналу, а також зручного встановлення комунікацій. Висота стін – 2,5 м. Отже, площа підлоги з урахуванням усіх вимог становить приблизно $7 \times 5 = 35 \text{ м}^2$, площа стін – $((7 \times 2,5) + (5 \times 2,5)) \times 2 = 60 \text{ м}^2$.

З метою забезпечення чистоти виробничих приміщень, миття підлоги проводиться щодня, тобто 30 разів. Також, раз на місяць здійснюється генеральне прибирання (оброблюються стіни, підлога, вікна тощо), тобто 1 раз.

Кількість виробничих циклів для синтезу поверхнево-активних речовин становить 19. Оскільки миття обладнання відбувається перед

кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 20 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$0,8 \times 20 = 16 \text{ м}^3$$

Таблиця 4.1

Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва 1,3-пропандіолу *Clostridium butyricum* AKR102a

Об'єкт миття та дезінфекції	Об'єм оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання, інвентар, комунікації	0,8 м ³	20	16 м ³
Підлога	35	30	1050
Стіни, двері, вікна	60	1	60

Щоб обрати миючий та дезінфікуючий засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м² витрачається 100 мл робочого розчину мийного чи деззасобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Каустична сода (NaOH) являє собою білі, непрозорі та дуже гігроскопічні кристали. Речовина добре розчинна у воді — при з'єднанні з водою виділяється велика кількість тепла. Гідроксид натрію є їдкою

сполукою, при потраплянні на шкіру викликає омилення жирів та хімічні опіки, спричиняє корозію окремих металів (2-й клас небезпеки). Гарячі розчини каустичної соди при (60-70 °С) виявляють дезінфікуючу дію.

Концентрація каустичної соди у миючому розчині не повинна перевищувати 0,2% при ручному митті обладнання та 2,0% при механічному митті обладнання [20].

Біомой – багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом. Рекомендований Міністерством здоров'я України та затверджений до застосування Головним державним санітарним лікарем України.

Препарат являє собою порошок світлих тонів. Добре розчиняється у воді. Робочі розчини безбарвні, не ушкоджують оброблювані вироби і володіють вираженими емульгуючими і миючими властивостями, легко видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях. Не сумісний з катіонами поверхнево-активних речовин.

Біомой належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки), при попаданні в шлунок і на шкіру не проявляє кумулятивних, шкіро-подразнюючих і сенсебілізуєчих властивостей. У концентраціях рекомендованих до застосування, не подразнює слизову оболонку очей.

Робочий розчин Біомою готують у тарі шляхом розчинення у питній воді. Використовується у концентраціях 0,15-0,5% [21].

Хлорантоїн - хлорактивний, багатокомпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом. Рекомендований Міністерством здоров'я України та затверджений до застосування Головним державним санітарним лікарем України та начальником Головного управління ветеринарної медицини та держветінспекцією Мінсільгосппроду України.

Препарат являє собою сипучий порошок світлих тонів зі слабким запахом хлору. Розчинність у воді - не менше 20 г/дм³. Водні розчини

прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору. Робочі розчини засобу мають миючі, дезінфікуючі та передстерилізаційні властивості, не ушкоджують об'єкти, добре емульгують жири, видаляють білково-жирову плівку з оброблюваних поверхонь, легко з них змиваються, не залишаючи нальоту. Гомогенізують мокротиння та інші виділення.

Хлорантоїн не сумісний з катіонними поверхнево-активними речовинами, а також з одно-і багатоатомними спиртами [22].

Дезактін – хлорвмісний препарат у вигляді порошку. Склад засобу, %: дихлорантин - 21,0-23,0; 5,5-діметілгідантоїн - 12,4-16,4; диспергатор - 9,0-12,0; аніонні поверхнево-активні речовини - 3,2-5,0; інгібітор корозії до 10,0; наповнювач до 100,0. Вміст активного хлору становить не менше 14,0%. Дезактін має широкий спектр антимікробної активності: бактерицидні, віруліцидні та фунгіцидні властивості. Препарат призначений для дезінфекції та очищення поверхонь всіх видів. Має миючі якості. Зручний для персоналу при приготуванні і використанні. Дезактін відноситься до групи малонебезпечних речовин [23].

Таблиця 4.2

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва 1,3-пропандіолу

Clostridium butyricum AKR102a

Назва мийного/ дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	16 м ³	8000	85 ¹	13600
Біомой		0,3			240 ²	5760
Дезактін	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	1110	111	438 ³	97,2
Хлорантоїн					425 ⁴	94,4

Примітка. Ціни вказані станом на листопад 2021 р.

1. <https://prom.ua/p1476446636-soda-kausticheskaya-fasovka.html?&primelead=My4zMQ>
2. <https://prom.ua/p1177427502-miyuchij-zasib-biomoj.html?>
3. <https://prom.ua/p1125335917-poroshok-dezaktin-original.html?>
4. <https://prom.ua/p1125335913-poroshok-hlorantoyin-original.html?>

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез 1,3-пропандіолу (93,7 г/л за 28 год) досягається за умов росту *Clostridium butyricum* AKR102a на середовищі такого складу (г/л): початкова концентрація гліцерину – 30; дріжджовий екстракт – 5; K_2HPO_4 – 2,71; NH_4Cl – 2,69; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1857; $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015 [24]. У процесі культивування, починаючи з 4 год, через кожні 4 год здійснюють дробне внесення гліцерину до кінцевої концентрації 180 г/л. Розрахунок складу підживлювального розчину гліцерину наведений у підрозділі 4.1.5.

Згідно розрахунків, наведених у розділі 3, виробничий біосинтез 1,3-пропандіолу здійснюється у ферментері об'ємом 0,4 м³, що містить 0,27 м³ середовища. Одержання інокуляту відбувається у два етапи (у флаконах, закритих гумовими пробками та в інокуляторі об'ємом 40 л).

Гліцерин є компонентом поживного середовища, який вноситься без попереднього приготування та стерилізації. Кількість гліцерину, необхідного для вирощування посівного матеріалу у флаконах, закритих гумовими пробками, становить 80 мл, для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л – 0,8 л, для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 0,4 м³ – 8 л. Тоді об'єм поживних середовищ, які необхідно приготувати та простерилізувати, становить: 2,62 л – для флаконів, закритих гумовими пробками, 26,2 л – для інокулятора об'ємом 40 л, 262 л – для ферментера об'ємом 0,4 м³.

Приготування і стерилізація поживних середовищ. На першому етапі для вирощування посівного матеріалу у флаконах потрібно 2,62 л поживного середовища. Тому для стерилізації компонентів обираємо автоклав з вертикальним завантаженням Panasonic (SANYO) MLS-3781L, об'ємом 10 л [25]. Розчин дріжджового екстракту стерилізуємо в окремому флаконі при $t = 112$ °C (30 хв). Розчин K_2HPO_4 та розчини інших солей (NH_4Cl , $\text{MgSO}_4 \times$

$7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) також стерилізуємо в окремих флаконах при $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$ (40 хв).

Для одержання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л об'єм середовища становить 26,2 л. Кількість дріжджового екстракту, необхідного для приготування середовища, є невеликою (135 г), тому його розчин (1 л) стерилізуємо в автоклаві. Розчин солей стерилізуємо разом безпосередньо в інокуляторі об'ємом 40 л. Оскільки кількість солей також є невеликою, для приготування розчину перед інокулятором наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 1 л питної води та перемішують до повного розчинення компонентів. Після розчинення компонентів розчин переливають в інокулятор об'ємом 40 л та додають решту питної води.

Для виробничого ферментера об'єм середовища становить 262 л. Розчин дріжджового екстракту для приготування середовища, необхідного для одержання посівного матеріалу у ферментері об'ємом 400 л, стерилізуємо в окремому реакторі об'ємом 5 л (1,35 кг дріжджового екстракту та 2,65 л води). Розчин солей стерилізуємо безпосередньо у ферментері об'ємом 400 л. Перед ферментером передбачаємо реактор-змішувач об'ємом 5 л для приготування цього розчину.

4.1.5. Обґрунтування внесення підживлювального розчину гліцерину під час виробничого біосинтезу

У процесі виробничого біосинтезу загальний вміст гліцерину у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (25 г/л) та 1,3-пропандіолу (93,7 г/л), становить 180 г/л. Початкова концентрація гліцерину у середовищі - 30 г/л, решта субстрату (150 г/л) вноситься у процесі культивування порціями – дробно (так зване підживлення).

Розрахунок складу підживлювального розчину гліцерину. Отже, у вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести у процесі культивування продуцента 1,3-пропандіолу 150 г/л гліцерину. Тривалість культивування становить 28 год. Прийmemo, що підживлення додається у середовище кожні 4 год. Тоді кількість порцій підживлення становить (28-

4)/4=6. Отже, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись $150/6 = 25$ г/л гліцерину.

Для приготування підживлювального розчину гліцерину передбачаємо окремий реактор об'ємом 50 л.

4.1.6. Обґрунтування вибору розчинів для стабілізації рН

Для інокулятора об'ємом 40 л та виробничого ферментера об'ємом 400 л розчини солей кальцію і магнію та розчини фосфорних солей можна приготувати разом (в одному реакторі-змішувачі), але перед стерилізацією довести рН до 4,5-5,0 (у цьому разі осаді фосфатів кальцію і магнію не утворюються). Після охолодження середовища і подачі його в ферментер (інокулятор) перед внесенням посівного матеріалу рН треба довести до оптимального рівня.

У разі використання такого способу приготування і стерилізації поживних середовищ необхідно передбачити приготування відповідних розчинів кислоти (зазвичай 6% розчин соляної кислоти) і лугу (зазвичай 6% розчин гідроксиду натрію). При цьому слід враховувати, що розчин соляної кислоти не потребує стерилізації (добавляється у нестерильне поживне середовище).

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Позиція	Найменування	Технічна характеристика (виробник)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Б-1	Балон з азотом	Балон з азотом для забезпечення анаеробних умов в інокуляторі та ферментері
ІФ-2	Фільтр індивідуальної очистки	Фільтр індивідуальної очистки GateKeeper® NX Series (США), E=99,99% [26]
ІН-3	Інокулятор	Інокулятор BioFlo (Німеччина). Об'єм 40 л, внутрішній діаметр – 400 мм, потужність приводу – 0,75-1,5 кВт, частота обертання – 25-1500 хв ⁻¹ [27]
Н-4	Насос перистальтичний	Перистальтичний насос фірми Delasco серії DL 12 (Франція), продуктивність 10-45 л/год [28]
Р-5	Реактор-змішувач для приготування підживлювального розчину гліцерину	Реактор-змішувач оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 50 л, швидкість перемішування 50 об/хв

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ					
Зм	Арк	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання			Літера	Арквш	Арквшів
Розробник	Попова Ю.О.							34	57	
Керівник	Скороцька О.І.									
Н. контр										
Консульт										
Зав. каф.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ					

Н-6	Насос перистальтичний	Перистальтичний насос фірми Delasco серії DL 12 (Франція), продуктивність 10-45 л/год [28]
Р-7	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації дріжджового екстракту	Реактор-змішувач оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 5 л, швидкість перемішування 50 об/хв
Р-8	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину солей	Реактор-змішувач оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 5 л, швидкість перемішування 50 об/хв.
ІФ-9	Фільтр індивідуальної очистки	Фільтр індивідуальної очистки GateKeeper® NX Series (США), E=99,99% [26]
Ф-10	Ферментер	Ферментер BioFlo (Німеччина). Об'єм 400 л, внутрішній діаметр – 800 мм, потужність приводу – 0,75-11,0 кВт, частота обертання – 16-1000 хв-1 [29]
Н-11	Насос перистальтичний	Перистальтичний насос фірми Delasco серії DL 12 (Франція), продуктивність 20-100 л/год [28]

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ 1,3-ПРОПАНДІОЛУ

ДР 1. Підготовка азоту для технологічного процесу

ДР 1.1. Подача та очищення азоту

Для забезпечення анаеробних умов культивування азот подається від балону (Б-1) з інертним газом (азотом) через вентиль до інокулятора об'ємом 40 л (ІН-3) та ферментеру об'ємом 400 л (Ф-10) (до ТП 5.5, ТП 6.1 відповідно) через індивідуальні фільтри (ІФ-2, ІФ-9), ступінь очищення становить 99,99 %.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування та стерилізація титрувальних агентів для інокулятора об'ємом 40 л

ДР 2.1.1. Приготування 6% розчину HCl

Для 26,2 л поживного середовища потрібно приготувати 52,4 мл 6%-го р-ну соляної кислоти для його підкислення в інокуляторі об'ємом 40 л (ІН-3). Для цього треба у колбу об'ємом 100 мл налити 43,7 мл питної води і за допомогою піпетки додати, при перемішуванні, 8,7 мл концентрованої 36% соляної кислоти. Готовий розчин зливають в інокулятор об'ємом 40 л (ІН-3) з композицією Б перед стерилізацією солей (до ДР 4.2.2).

ДР 2.1.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH

Для 26,2 л поживного середовища потрібно приготувати 52,4 мл 6%-го р-ну гідроксиду натрію для його підлуження в інокуляторі об'ємом 40 л (ІН-3). Для цього треба на технічних терезах зважити 3,2 г кристалічного гідроксиду натрію. Наважку помістити у колбу об'ємом 100 мл, додати піпеткою 49,2 мл дистильованої води і ретельно перемішати до повного розчинення кристалів та закрити ватно-марлевою пробкою.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	<i>Літера</i>	<i>Арквш</i>	<i>Арквшів</i>
<i>Розробник</i>	Попова Ю.О.						36	57
<i>Керівник</i>	Скряцька О.І.					Кафедра БТМ₃₅		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	Стабніков В.П.							

Стерилізацію здійснюють в автоклаві при температурі 131 °С впродовж 40 хв. Готовий розчин зливають в інокулятор об'ємом 40 л (ІН-3) (до ТП 5.5).

ДР 2.2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів для ферментера об'ємом 0,4 м³

ДР 2.2.1. Приготування 6% розчину HCl

Для 262 л поживного середовища потрібно приготувати 524 мл 6%-го р-ну соляної кислоти для його підкислення в ферментері об'ємом 400 л (Ф-10). Для цього треба у колбу об'ємом 1 л налити 437 мл питної води і додати, при перемішуванні, 87 мл концентрованої 36% соляної кислоти, яку відміряти мірним циліндром. Готовий розчин зливають у ферментер об'ємом 400 л (Ф-10) з композицією Б перед стерилізацією солей (до ДР 4.3.2).

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH

Для 262 л поживного середовища потрібно приготувати 524 мл 6%-го р-ну гідроксиду натрію для його підлуження в ферментері об'ємом 400 л (Ф-10). Для цього треба на технічних терезах зважити 32 г кристалічного гідроксиду натрію. Наважку помістити у колбу об'ємом 1 л, додати 492 мл дистильованої води і перемішати до повного розчинення кристалів та закрити ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію здійснюють в автоклаві при температурі 131 °С впродовж 40 хв. Готовий розчин зливають у ферментер об'ємом 400 л (Ф-10) (до ТП 6.1).

ДР 3. Підготовка та зберігання підживлювального розчину

ДР 3.1. Підготовка та зберігання підживлювального розчину гліцерину

Для виробничого біосинтезу необхідно підготувати підживлювальний розчин гліцерину. Спочатку у виробничий ферментер об'ємом 400 л (Ф-10) додають 8 л гліцерину, для підживлення ж вносять ще 40,5 л гліцерину порціями. Гліцерин подають в реактор об'ємом 50 л (Р-5), де відбувається зберігання при температурі 20 °С при постійному перемішуванні (50 об/хв). Підживлювальний розчин в кількості 6,75 л (6 порцій) за допомогою насосу

(Н-6) додається в поживне середовище починаючи з 4 год культивування кожні 4 год.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у флаконах, закритих гумовими пробками

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у флаконах, закритих гумовими пробками наведений у табл. 4.1. Необхідно зазначити, що для невеликих (до 10 л) об'ємів поживного середовища з загальною невисокою концентрацією компонентів (наприклад, вмістом солей до 10 г/л) при визначенні об'єму води, яку необхідно додати в процесі підготовки окремих композицій, їх масою можна знехтувати. Це зумовлено тим, що під час стерилізації середовища в автоклаві в результаті випаровування через ватно-марлевий корок його об'єм зменшується.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,62 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2,62 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	5	13,5	А	1,23
Вода		1,23		
NH ₄ Cl	2,69	7,3	Б	0,67
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1857	0,5		
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,025	0,07		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,015	0,04		
Вода		0,67		
KH ₂ PO ₄	2,71	7,3	В	0,72
Вода		0,72		
Разом:		2,6		2,62

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 13,5 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, додають 1,23 л дистильованої води,

перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С впродовж 30 хв. Перед внесенням поживного середовища у флакони, у колбу об'ємом 5 л із стерильною композицією А додають стерильні композиції Б і В, перемішують. Утворене поживне середовище розливають у флакони, закриті гумовими пробками (до ТП 5.4).

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 7,3 г NH_4Cl і 0,5 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, на торсійних терезах – 0,07 г $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ і 0,04 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 670 мл дистильованої води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С впродовж 40 хв. Стерильну композицію Б зливають у колбу об'ємом 5 л із стерильною композицією А, додають стерильну композицію В, все перемішують і розливають у флакони, закриті гумовими пробками (до ТП 5.4).

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 7,3 г KH_2PO_4 . Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 720 мл дистильованої води, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С впродовж 40 хв. Стерильну композицію В зливають у колбу об'ємом 5 л із стерильною композицією А і Б, все перемішують і розливають у флакони, закриті гумовими пробками (до ТП 5.4).

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 40 л

Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 40 л наведений у табл. 4.2.

Так як стерилізація композиції буде відбуватись в посівному апараті необхідно врахувати конденсат (10%).

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 26,2 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 26,2 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	5	135	А	1
Вода		1		
KH ₂ PO ₄	2,71	73	Б	22,9
NH ₄ Cl	2,69	73		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1857	5		
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,025	0,7		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,015	0,4		
Вода		22,7		
Конденсат		2,3		2,3
Разом:		26,2		26,2

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 135 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л та додають 1 л питної води. Розчин перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С впродовж 30 хв. Стерильну композицію А подають в інокулятор об'ємом 40 л (ІН-3) із стерильною композицією Б (до ТП 5.5).

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 73 г KH₂PO₄ і NH₄Cl, 5 г MgSO₄·7H₂O, 0,7 г CaSO₄·2H₂O і 0,4 г FeSO₄·7H₂O. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 1 л питної води та перемішують до повного розчинення компонентів. Після розчинення компонентів розчин переливають в інокулятор об'ємом 40 л (ІН-3) та додають 21,7 л питної води. До отриманого розчину при перемішуванні додають 6%-й розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.1) до рН 4,5. Стерилізація відбувається в інокуляторі при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,4 м³

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 400 л наведений у табл. 4.3.

Так як стерилізація композиції буде відбуватись в посівному апараті необхідно врахувати конденсат (10%).

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 262 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 262 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	5	1,35	А	4
Вода		2,65		
Конденсат		0,4		
K_2HPO_4	2,71	0,73	Б	234,2
NH_4Cl	2,69	0,73		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1857	50 (г)		
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025	7 (г)		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,015	4 (г)		
Вода		232,7		
Конденсат		23,4		
Разом:		262		262

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 1,35 кг дріжджового екстракту. Наважку поміщають реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-7) та додають 2,65 л питної води. Стерилізація відбувається в реакторі при температурі 112 °С впродовж 30 хв. Стерильну композицію А самоплином подають у виробничий ферментер об'ємом 400 л (Ф-10) із стерильною композицією Б (до ТП 6.1).

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 0,73 кг K_2HPO_4 і NH_4Cl , 50 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7 г $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і 4 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-8), додають 2,7 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів. Після

розчинення компонентів розчин самоплином подають в ферментер об'ємом 400 л (Ф-10) та доливають 230 л питної води. До отриманого розчину при перемішуванні додають 6%-й розчин соляної кислоти (від ДР 2.2.1) до рН 4,5. Стерилізація відбувається в ферментері при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Clostridium butyricum* AKR102a зберігають у ліофілізованому стані при температурі 0-5 °С.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

У чашку Петрі вносять нагріте поживне середовище з кров'яним агаром, заливають його стерильною олією і через олію роблять засів колекційної культури (від ТП 5.1). Культивують при температурі 32 °С (48 год) в анаеростаті, звідки відкачують повітря, а потім заповнюють сумішшю азоту (80-90%) та вуглекислого газу (10-20%), за рахунок якої створюється надлишковий тиск, який перешкоджає проникненню кисню з повітря.

ТП 5.3. Вирощування робочої культури

В пробірки вносять поживне середовище з кров'яним агаром, поверхню пробірок заливають стерильною вазеліною олією. Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 5.2) пересівають в ці ж пробірки (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). Пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в анаеростаті при температурі 32 °С (24 год).

ТП 5.4. Вирощування інокуляту у флаконах, закритих гумовими пробками

В асептичних умовах у колбу об'ємом 5 л з стерильною композицією А (від ДР 4.1.1) вносять стерильні композиції Б (від ДР 4.1.2) та композицію В (від ДР 4.1.3). Туди ж з колби об'ємом 100 мл додають 80 мл гліцерину, який вноситься без попереднього приготування та стерилізації. Все перемішують і розливають по 180 мл у флакони об'ємом 250 мл (всього 15

флаконів). У пробірку з робочою культурою *Clostridium butyricum* AKR102a (від *ТП 5.3*) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у флакони з поживним середовищем. Для засіву одного флакона використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують у термостаті при температурі 32 °С (24 год).

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л

У попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 40 л (ІН-3) з композицією Б (від *ДР 4.2.2*) вносять стерильну композицію А (від *ДР 4.2.1*). З колби об'ємом 1 л подають 0,8 л гліцерину, який додається до середовища без попереднього приготування та стерилізації. Вмикають перемішувач пристрій і доводять 6%-м розчином гідроксиду натрію (від *ДР 2.1.2*) рН середовища за показником датчика рН до 6,95. Вносять посівний матеріал (від *ТП 5.4*). Для створення анаеробних умов забезпечують подачу азоту (від *ДР 1.1*). Культивують при температурі 32 °С (24 год) з частотою обертів перемішувача пристрою 50 об/хв.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 0,4 м³

У ферментер об'ємом 0,4 м³ (Ф-10) з стерильною композицією Б (від *ДР 4.3.2*) самоплином подають стерильну композицію А (від *ДР 4.3.1*). З реактора об'ємом 50 л (Р-5) за допомогою перистальтичного насоса (Н-6) подають 8 л гліцерину (від *ДР 3.1*), який вноситься без попередньої стерилізації. Вмикають перемішувач пристрій і доводять 6%-м розчином гідроксиду натрію (від *ДР 2.2.2*) рН середовища за показником датчика рН до 6,95. За допомогою перистальтичного насоса (Н-4) з інокулятора об'ємом 40 л (ІН-3) подають посівний матеріал (від *ТП 5.5*). Культивують з дробним внесенням гліцерину (від *ДР 3.1*) до концентрації 1,3-пропандіолу та біомаси 93,7 і 25 г/л відповідно, при температурі 32 °С (28 год) за подачі азоту для створення анаеробних умов (від *ДР 1.1*), з частотою обертів перемішувача пристрою 50 об/хв.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА 1,3-ПРОПАНДІОЛУ

7.1. Мікробіологічний контроль

Зважаючи на те, що культивування бактерій *Clostridium butyricum* AKR102a з метою одержання 1,3-пропандіолу проводиться в асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Кожні 8 год з інокулятора і ферментера відбирають зразки культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль здійснюється посівом у товщу агаризованого середовища.

Посів культуральної рідини у товщу агаризованого середовища проводиться стерильною градуйованою піпеткою, якою набирають 0,1, 0,5 або 1,0 мл матеріалу і виливають його в стерильні чашки Петрі. Після цього матеріал заливають 15-20 мл розтопленого й охолодженого до 45-50 °С МПА. Обережно похитуючи чашку, круговими рухами по поверхні стола перемішують в ній матеріал, досягаючи його рівномірного розподілу в середовищі. Чашку залишають закритою до повного застигання агару, а потім перевертають догори дном.

За відсутності сторонньої мікробіоти можна побачити клітини *Clostridium butyricum* AKR102a. Бактерії розташовані поодинокі, парами або короткими ланцюжками, іноді у вигляді довгих ниток. Це грампозитивні прямі або злегка зігнуті палички, розміром 0,5-1,7 x 2,4-7,6 мікрометри, із закругленими кінцями. Рухаються перитрихіальними джгутиками, є спороутворюючими, спори мають овальну форму та змінюють форму материнської клітини [30].

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник		Попова Ю.О.			РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва 1,3- пропандіолу	Літера	Арквш	Арквшів
Керівник		Скроцька О.І.					44	57
Н. контр								
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.П.					Кафедра БТМ	

7.2. Показники росту *Clostridium butyricum* AKR102a і синтезу 1,3-пропандіолу

7.2.1. Визначення концентрації біомаси і 1,3-пропандіолу

Концентрацію біомаси визначають вимірюванням оптичної густини культуральної рідини при 650 нм з відповідним розведенням за допомогою системи УФ-видимої спектроскопії [31].

Концентрацію 1,3-пропандіолу визначають за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) - методу аналізу, який включає попереднє розділення початкової складної суміші на відносно прості, котрі потім аналізуються звичайними фізико-хімічними методами або спеціальними методами, створеними для хроматографії [32].

Пробопідготовка. Для підготовки зразків для аналізу ВЕРХ склад культуральної рідини розділяли центрифугуванням при 10000 об/хв протягом 20 хв. Отриманий таким чином супернатант фільтрували через нейлонові шприцеві фільтри (розмір пор 0,45 мкм; Mdi фільтри, Індія).

Хід аналізу. Концентрацію 1,3-пропандіолу визначали за допомогою системи ВЕРХ Shimadzu 10AVP (Shimadzu Corp., Кіото, Японія), оснащеної аналітичною колонкою Aminex HPX-87H (300 мм × 7,8 мм; Bio-Rad, Palo AHO, Каліфорнія, США) та 5 мМ H₂SO₄ у вигляді рухомої фази. Швидкість потоку рухомої фази підтримували на рівні 0,6 мл/хв при температурі колонки 60 °С. Об'єм введення становив 20 мкл і для визначення концентрації 1,3-пропандіолу використовували детектор показника заломлення RID-10A (Shimadzu Corp., Японія) [33].

7.2.2. Визначення концентрації джерела вуглецю (гліцерину) та азоту (хлориду амонію)

Пробопідготовка. Для підготовки зразків для визначення концентрації джерела вуглецю та азоту склад культуральної рідини розділяли центрифугуванням при 10000 об/хв протягом 20 хв. Отриманий таким чином супернатант фільтрували через нейлонові шприцеві фільтри (розмір пор 0,45 мкм; Mdi фільтри, Індія).

Джерелом вуглецю в процесі біосинтезу 1,3-пропандіолу виступає гліцерин, концентрацію якого визначають методом ВЕРХ.

Хід аналізу. Концентрацію гліцерину визначали високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ, Varian ProStar) у колонці Polypore (H 250 мм × 7 мм). Температуру підтримували на рівні 65 °С, а об'єм введення становив 10 мкл. Рухлива фаза складалася з ізократичного 0,04 М розчину сірчаної кислоти і швидкість потоку становила 0,9 мл/хв. Для визначення концентрації гліцерину використовували детектор показника заломлення [34].

Джерелом азоту у процесі біосинтезу 1,3-пропандіолу виступає хлорид амонію.

Хід аналізу. Вміст хлориду амонію визначали за допомогою реактиву Неслера. 100 мкл супернатанту змішували з 50 мл дистильованої води. Потім додавали 1 мл реагенту Неслера (Prolabo, Париж, Франція), інкубували (10 хв, 25 °С) та аналізували при 430 нм за допомогою спектрофотометра (Shimadzu UV-160A, Кіото, Японія) [35].

Карту постадійного контролю біосинтезу 1,3-пропандіолу наведено у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю біосинтезу 1,3-пропандіолу

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кт 1.1 <i>Подача та очищення азоту</i>	Азот очищений, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки азоту в індивідуальному фільтрі	E=99,99%
Кт, Кх, Км 2.1.2, 2.2.2 <i>Приготування стерилізація гідроксиду натрію</i>	Розчин гідроксиду натрію Температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 3.1 <i>Підготовка та зберігання підживлювального розчину гліцерину</i>	Гліцерин Температура, періодичність внесення, частота обертів мішалки	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються протягом всього часу зберігання	t = 20 °С, τ = кожні 4 год, ω = 50 об/хв

<p>Кт, Км, Кх 4.1.1 <i>Приготування стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у флаконах, закритих гумовими пробками</i></p> <p><i>Приготування стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Температура, час, стерильність</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 4.1.2 <i>Приготування стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у флаконах, закритих гумовими пробками</i></p> <p><i>Приготування стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Температура, час, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>

<p>Кт, Км, Кх 4.1.3 <i>Приготування стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у флаконах, закритих гумовими пробками</i></p> <p><i>Приготування стерилізація композиції В</i></p>	<p>Композиція В Температура, час, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.2.1 <i>Приготування стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 40 л</i></p> <p><i>Приготування стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Температура, час, стерильність</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 4.2.2 <i>Приготування стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 40 л</i></p> <p><i>Приготування стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Температура, час, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.3.1 <i>Приготування стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,4 м³</i></p> <p><i>Приготування стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Температура, час, стерильність</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 4.3.2</p> <p><i>Приготування стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 0,4 м³</i></p> <p><i>Приготування стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Температура, час, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1</p> <p><i>Підготовка посівного матеріалу</i></p> <p><i>Підтримання колекційної культури</i></p>	<p>Колекційна культура <i>Clostridium butyricum</i> AKR102a Температура, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 год</p>	<p>t = 0-5 °С, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Км 5.2 <i>Підготовка посівного матеріалу</i></p> <p><i>Одержання робочої культури</i></p>	<p>Колекційна культура <i>Clostridium butyricum</i> AKR102a Температура, тривалість, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин</p>	<p>t = 32 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.3 <i>Підготовка посівного матеріалу</i></p> <p><i>Вирощування робочої культури</i></p>	<p>Робоча культура <i>Clostridium butyricum</i> AKR102a Температура, тривалість, відсутність сторонньої мікробіоти</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин</p>	<p>t = 32 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.4 <i>Вирощування інокуляту у флаконах, закритих гумовими пробками</i></p>	<p>Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура контролюється і підтримується протягом всього часу вирощування, контроль – кожні 8 годин</p>	<p>t = 32 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Км, Кх 5.5 <i>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л</i></p>	<p>Посівний матеріал, Температура, рН, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються протягом всього часу вирощування, контроль – кожні 8 годин</p>	<p>$t = 32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24\text{ год}$, $\omega = 50$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 6.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 0,4 м³</i></p>	<p>Посівний матеріал, Температура, рН, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються протягом всього часу вирощування, контроль – кожні 8 годин</p>	<p>$t = 32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 28\text{ год}$, $\omega = 50$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. R.K. Saxena, Pinki Anand, Saurabh Saran, Jasmine Isar. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* (2009) 27, 895–913. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.07.003.
2. Daria Szymanowska-Powałowska. 1,3-Propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum* DSP1 in repeated batch. *Electron J Biotechnol*, 2014. doi:10.1016/j.ejbt.2014.10.001.
3. *Clostridium butyricum* AKR102a. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://bacdive.dsmz.de/strain/23852>.
4. Дирина Е., Винаров А., Быков В.. Проблемы и перспективы разработки биотехнологии утилизации отходов производства биодизеля из растительного сырья. *Сельскохозяйственная биология*. 2008, № 3, с. 24-32. УДК 661.188.1:579.69:577.15.
5. N. Cassir, S. Benamar, B. La Scola. *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen. *Clin Microbiol Infect*, 2016. doi:10.1016/j.cmi.2015.10.014.
6. Oscar Rosales Calderon, Valdeir Arantes. A review on commercial scale high value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnol Biofuels* (2019) 12:240. doi:10.1186/s13068-019-1529-1.
7. C. J. Sullivan, A. Kuenz, & K.-D. Vorlop. Propanediols. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2018), 1–15. doi:10.1002/14356007.a22_163.pub2.
8. Shanthi Priya Samudrala. Glycerol Transformation to Value-Added 1,3-Propanediol Production: A Paradigm for a Sustainable Biorefinery Process. *Glycerine Production and Transformation - An Innovative Platform for Sustainable Biorefinery and Energy* (2019). doi: 10.5772/intechopen.83694.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ					
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ					
Розробник		Попова Ю.О.						Літера	Арквш	Арквшів
Керівник		Скροцька О.І.							54	57
Н контр								Кафедра БТМ		
Консульт										
Зав. каф.		Стабніков В.Г.								

9. Nina Kolesarova, Miroslav Hutnan, Igor Bodík, and Viera Spalkova. Utilization of Biodiesel By-Products for Biogas Production. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2011) 1-15. doi:10.1155/2011/126798.
10. Qing Kong, Guoqing HE, Qihe Chen, Feng Chen. Optimization of medium composition for cultivating *Clostridium butyricum* with response surface methodology. *Journal of Food Science*, 2004. Doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb13614.x.
11. *Clostridium butyricum*. ABIS Encyclopedia. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://www.tgw1916.net/Clostridium/butyricum.html>
12. *Clostridium butyricum* CB 401 (MTCC 5399). Mystical Biotech. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://www.mysticalbiotech.com/portfolio/clostridium-butyricum-cb-401-mtcc-5399-2/>
13. Y. Dong, Y. Li, D. Zhang, S. Nguyen, N. Maheshwari, Y. Hu, Y. Cao. Epidemiological and genetic characterization of *Clostridium butyricum* cultured from neonatal cases of necrotizing enterocolitis in China. *Inf. Contr. & Hosp. Epidem.* 2020, 41(8), pp. 900 – 907. doi: <https://doi.org/10.1017/ice.2019.289>.
14. *Clostridium* taxonomy. The National Center for Biotechnology Information. Taxonomy Browser. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1492>
15. Zhu C., Fang B., Wang S. Effects of culture conditions on the kinetic behavior of 1,3-propanediol fermentation by *Clostridium butyricum* with a kinetic model. *Biores. Tech.* 2016, 212, 130–137. doi:10.1016/j.biortech.2016.04.02
16. Daria Szymanowska-Powałowska. 1,3-Propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum* DSP1 in repeated batch. *Electron J Biotechnol*, 2014. doi:10.1016/j.ejbt.2014.10.001.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	Літера	Арквш	Арквшів
Розробник		Попова Ю.О.					55	57
Керівник		Скряцька О.І.						
Н. контр								
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.Г.			Кафедра БТМ			

17. Омолодження обличчя після 40 років: процедури та догляд. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://vivaton.com.ua/ua/statti/omolodzhennya-oblichchya-pislya-40-rokiv-proczeduri-ta-doglyad/>.
18. Аналіз ринку косметики в Україні за 2021 р. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://pro-consulting.ua/ua/issledovanie-rynka/analiz-rynka-kosmetiki-v-ukraine-2021-god>.
19. 1,3-пропандіол в косметичних засобах, його концентрація. Електронний ресурс // [Режим доступу]: http://cosmetic.ua/propandiol_v_kosmetike.
20. Каустична сода. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/article-kaustycheskaya-soda-dlya-dezynfekcyu>
21. Біомой. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://farmakos.ua/ua/bimoj.html>
22. Хлорантоїн. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://farmakos.ua/ua/hlor.html>
23. Дезактін. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://medrynok.com.ua/goods/view/13982100/all/dezaktin-zasib-dlya-dezinfekciyi-instrumentiv-i-poverhon/>
24. Wilkens E., Ringel A.K., Hortig D., Willke T., Vorlop K.D. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by Clostridium butyricum AKR102a. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012, 93:1057–1063. doi:10.1007/s00253-011-3595-6.
25. Автоклав вертикальний Sanyo (Panasonic) MLS-3781L. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <http://pharmaspb.com/products/mls-3781l>.
26. Фільтр для очищення азоту. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://www.directindustry.com.ru/prod/entegris/product-34826-1654621.html>.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	<i>Літера</i>	<i>Арквш</i>	<i>Арквшів</i>	
<i>Розробник</i>	Попова Ю.О.							56	57
<i>Керівник</i>	Скряцька О.І.								
<i>Н. контр</i>									
<i>Консульт</i>									
<i>Зав. каф.</i>	Стабніков В.Г.					Кафедра БТМ			

27. Інокулятор 40 л. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://online-shop.ependorf.com/OC-en/Bioprocess-44559/Bioprocess-Systems-60767/BioFlo320-PF-109106.html>.
28. Насос перистальтичний. Електронний ресурс // [Режим доступу]: https://www.pompmechanic.com/dl_seria.
29. Ферментер 400 л. Електронний ресурс // [Режим доступу]: <https://www.directindustry.com.ru/prod/ependorf-se/product-22548-1480749.html>.
30. Sasaki J. Autoclave sterilization of dental handpieces: A literature review / J. Sasaki, S. Imazato. // J Prosthodont Res. – 2020. – №64. – P. 239–246.
31. Thompson J.C., He B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. Appl. Engin. in Agricul. 2006, 22(2):261-265.
32. Xiao-Li Wang, Jin-Jie Zhou, Jun-Tao Shen, Ya-Feng Zheng, Ya-qin Sun, Zhi-Long Xiu. Sequential fed-batch fermentation of 1,3-propanediol from glycerol by Clostridium butyricum DL07. Applied Microbiology and Biotechnology (2020). doi:10.1007/s00253-020-10931-2.
33. Волошина О.С. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / О.С.Волошина – К.: НУХТ, 2015. – 206 с.
34. P. Anand, R.K. Saxena, R.G. Marwah. A novel downstream process for 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2011) 90:1267–1276. doi:10.1007/s00253-011-3161-2.
35. R. Malek, P. Bonnarme, F. Irlinger, P. Frey-Klett, D. Onésime, J.Aubert, J.-M. Beckerich. Transcriptomic response of Debaryomyces hansenii during mixed culture. International Journal of Food Microbiology (2018) 264, 53–62. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.026.

					НУХТ БТЕК 04.01.33 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	<i>Літера</i>	<i>Арквш</i>	<i>Арквшів</i>
<i>Розробник</i>		Попова Ю.О.					57	57
<i>Керівник</i>		Скряцька О.І.						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.Г.				Кафедра БТМ		