

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)

« ___ » _____ лютого _____ 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« ___ » _____ лютого _____ 2025 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

На тему: «Біосинтез вітаміну В₁₂ Propionibacterium shermanii»

Виконала: здобувачка 5 курсу, групи 1

КОЛОДНІКОВА Дар'я Ігорівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАБНІКОВ Віктор Петрович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент _____

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я як здобувачка Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2025 р

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична
промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” листопада 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОЛОДНІКОВОЇ Дар'ї Ігорівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез вітаміну V_{12} *Propionibacterium shermanii*

керівник роботи СТАБНИКОВ Віктор Петрович, д.т.н., проф.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05 листопада 2024 року № 932-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 07.02.2025

3. Вихідні дані до роботи Продуцент
вітаміну V_{12} *Propionibacterium shermanii*; геометричний об'єм ферментера
6,3 куб.м; коефіцієнт заповнення 0,7

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

5. Перелік графічного матеріалу

1 аркуші формату А1 (технологічна схема) і 1 аркуш формату А1
(апаратурна схема)

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 20234 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Розділ 1. Характеристика кінцевої продукції виробництва</i>	<i>01.11.2024 – 10.11.2024</i>	
2	<i>Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>11.11.2024 – 20.11.2024</i>	
3	<i>Розділ 3. Техніко-екномічне обґрунтування</i>	<i>21.11.2024 – 25.11.2024</i>	
4	<i>Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>26.11.2024 – 01.12.2024</i>	
5	<i>Розділ 5. Специфікація обладнання</i>	<i>07.12.2024 – 13.12.2024</i>	
6	<i>Розділ 6. Опис технологічної схеми</i>	<i>14.12.2024 – 20.12.2024</i>	
7	<i>Розділ 7. Контроль виробництва</i>	<i>21.12.2024 – 25.12.2024</i>	
8	<i>Розділ 8. Охорона довкілля</i>	<i>26.12.2024 – 09.01.2025</i>	
9	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>10.01.2025 - 20.01.2025</i>	
10	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>01.02.2025 - 07.02.2025</i>	

Здобувач _____
(підпис)

Дар'я КОЛОДНИКОВА
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Віктор СТАБНИКОВ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці промислового біосинтезу, технологічної та апаратурної схем, вітаміну В₁₂ *Propionibacterium shermanii*, що здатний синтезувати до 0,25 мг/г клітин цільового продукту. Проаналізувавши наукову літературу, було визначено найоптимальніший метод виробничого біосинтезу. Вітамін В₁₂ відповідає за синтез майже 100 біологічних молекул, включаючи нуклеїнові кислоти ДНК і РНК, а через них – за синтез величезної кількості білків.

Розрахована потужність виробництва становить 0,546427 кг (408 м³ культуральної рідини) вітаміну В₁₂ за рік. Технологічна схема біосинтезу ціанкобаламіну включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,7). Технологія отримання вітаміну В₁₂ передбачає культивування глибинним безперервним способом.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, 8 розділів, списку використаних джерел, технологічної схеми (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної схеми (формат А1, 1 аркуш). Загальний обсяг роботи – 66 сторінок, 8 таблиць.

Ключові слова: вітамін В₁₂, ціанкобаламін, *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673, біосинтез.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of industrial biosynthesis, technological and hardware schemes, vitamin B12 *Propionibacterium shermanii*, which is capable of synthesizing up to 0.25 mg/g of cells of the target product. After analyzing the scientific literature, the most optimal method of industrial biosynthesis was determined. Vitamin B12 is responsible for the synthesis of almost 100 biological molecules, including nucleic acids DNA and RNA, and through them - for the synthesis of a huge number of proteins.

The calculated production capacity is 0.546427 kg (408 m³ of culture fluid) of vitamin B12 per year. The technological scheme of cyanocobalamin biosynthesis includes auxiliary works (preparation of aeration air, sterilization of nutrient media) and the technological process (four stages of growing seed material and biosynthesis in a fermenter with a volume of 6.3 m³ with a filling factor of 0.7). The technology for obtaining vitamin B12 involves deep continuous cultivation.

The qualification consists of an introduction, 8 chapters, a list of sources used, a technological scheme (format A1, 1 sheet) and an apparatus scheme (format A1, 1 sheet). The total volume of the work is 63 pages, 8 tables.

Key words: vitamin B12, cyanocobalamin, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673, biosynthesis

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА.....	10
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	14
2.3 Таксономічний статус біологічного агента.....	16
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	17
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	17
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби продукту і геометричного об'єму ферментера.....	22
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	23
3.5 Схема біотрансформації ростового субстрату.....	24
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	26
4.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	26
4.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	28
4.3 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	29
4.3.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	30
4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	30
4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 6,3 м ³	31
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	32
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	36
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	47
7.1 Карта постадійного контролю.....	47
7.2 Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ.....	48
7.3 Мікробіологічний контроль чистої культури.....	50

7.4	Визначення концентрації джерела вуглецю.....	50
7.5	Визначення концентрації джерела азоту.....	51
7.6	Визначення концентрації біомаси.....	52
7.7	Визначення концентрації цільового продукту.....	52
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....		54
8.1.	Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	54
8.2.	Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	57
8.3	Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	59
8.4.	Система знешкодження газоповітряних викидів.....	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....		62

ВСТУП

Вітамін В₁₂ (кобаламін) - це водорозчинний вітамін, що належить до класу кориноїдів за своєю хімічною будовою складається з двох частин: кобальтвмісної порфіриноподібної та нуклеотидної структур. В організмі людини він виконує такі функції як розщеплення метилмалонілу-КоА, який утворюється при метаболізмі амінокислот, та бере участь у продукуванні метіоніну. При недостатній кількості кобаламіну в організмі може розвиватися така хвороба як В₁₂-залежна анемія. [1]

Актуальність. В організмі людей та тварин вітамін В₁₂ синтезується мікрофлорою кишківника та накопичується у невеликих кількостях у печінці та нирках, повністю потреба у цьому вітаміні не забезпечується таким чином. Тому частина якої не вистачає потрапляє в організм з їжі тваринного походження. Також завдяки своїй хімічній структурі, а саме наявністю іону кобальту у молекулі, кобаламін перешкоджає засвоєнню інших вітамінів (наприклад, В₁ та В₆), а засвоєнню вітаміну В₁₂ сприяє спеціальний глікопротеїн, що формує стійкий до пепсину комплекс, в нормі він наявний у нижньому відділі шлунково-кишкового тракту. З вище сказаного можна зробити висновок, що у багатьох людей може бути виявлений дефіцит кобаламіну, а насамперед у тих, хто обирає як спосіб життя вегетаріанство. [2]

Дефіцит вітаміну В₁₂ також виникає внаслідок неправильного споживання їжі у хворих, які страждають від недоїдання, наприклад у людей похилого віку або при надмірному вживанні алкоголю. Серед внутрішніх станів, що можуть призвести до нестачі кобаламіну визначають нездатність вивільняти вітамін В₁₂ з його транспортних білків. Наприклад, гастрит, гастректомія та застосування антацидів призводять до зниження секреції соляної кислоти, тим самим зменшуючи вивільнення вітаміну В₁₂ з харчових білків.

Нестача вітаміну В₁₂ може мати різні наслідки від хронічної втоми до дегенерації спинного мозку, хоч виявлення у пацієнтів дефіциту кобаламіну зазвичай виявляється уже після визначення у них анемії. Стани, спричинені нестачею вітаміну, мають три виначені напрямки: гематологічний, неврологічний та нервово-психіатричний. У першому випадку можуть

					НУХТ БТЕК 05.01.06 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Колоднікова Д. І.					Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив	Стабніков В.П.						8	66
Реценз.					ВСТУП Кафедра БТМ			
Н. контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

розвинулися такі симптоми, як низький гемоглобін, тромбоцитопенія; у другому – дегенерація спинного мозку, нетримання та еректильна дисфункція; а у випадку нервово-психіатричних розладів – хвороба Альцгеймера, депресія та психоз.

З усього вище сказаного можна зробити висновок, що у світі існує потреба у виготовленні кобаламіну та його похідних, які будуть зручними для приймання та легкозасвоюваними в організмі. [3]

Новизна кваліфікаційної роботи є використання пропіонібактерії для біосинтезу вітаміну B₁₂ з використанням агропромислових залишків, рідкого кислотного білкового залишку сої, як недорогого альтернативного культурального середовища, що не містить похідних тваринного походження. У повністю рослинному поживному середовищі *Propionibacterium shermanii* здатні продукувати велику кількість вітаміну B₁₂ (0,25 мг/г клітин). Ці результати свідчать про можливість виробництва вітаміну B₁₂ для задоволення потреб певних груп населення, одночасно знижуючи витрати на виробництво цього важливого вітаміну. [4]

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Вітамін В₁₂ - це речовина, яку називають ціанкобаламіном, хімічна формула: C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P (α-(5,6-диметилбензимідазол-2-іл)кобамід ціанід), з молекулярною масою 1355,4 г/моль.

Основні фізіологічні функції вітаміну В₁₂: кофермент у синтезі нуклеїнових кислот, білка та ліпідів; бере участь у метилюванні; підтримує епітеліальні клітини та нервову систему (мієлінова оболонка); бере участь в утворенні еритроцитів, гранулоцитів, лімфоцитів та моноцитів у червоному кістковому мозку (еритропоез та лейкопоез). Добовою нормою вітаміну В₁₂ на день для людини є 2-3 мкг в залежності від ваги та стану (наприклад, вагітність у жінок).

Фізико-хімічні властивості вітаміну В₁₂: має вигляд темно-червоних кристалів або червоного кристалічного порошку без запаху. Розчиняється у воді та етанолі, не розчиняється у ацетоні. Температура плавлення від 300°C. Ціанкобаламін гігроскопічна сполука, тому зберігати речовину необхідно в сухому та прохолодному місці. [5]

За міжнародною класифікацією АТС вітамін В₁₂ визначається як В03ВА:

В – Кров та кровотворні органи

В03 – Протианемічні препарати

В03В – Вітамін В₁₂ та фолієва кислота

В03ВА – Вітамін В₁₂ (ціанкобаламін та аналоги). [6]

Ціанкобаламін має доволі широкий спектр застосування. У медичній та оздоровчій сфері використовується для лікування різних типів дефіциту вітаміну В₁₂, наприклад для лікування мегалобластної анемії, анемії, спричиненої отруєнням, апластичної анемії та лейкопенічного психозу, разом із застосуванням пантотенової кислоти, може запобігти злоякісній анемії, допомагає поглинанню Fe²⁺ і секреції шлункової кислоти, також використовується для лікування артрити, паралічу лицевого нерва, невралгії трійчастого нерва, гепатиту, герпесу, астми та інших алергій, atopічного дерматиту, кропив'янки, екземи та бурситу, вітамін В₁₂ також можна

					НУХТ БТЕК 05.01.06 КР ПЗ					
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА					
Розробив		Колоднікова Д. І.						Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Стабніков В.П.							10	66
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

використовувати для лікування нервозності, дратівливості, безсоння, втрати пам'яті, депресії.

Нові дослідження показують, що дефіцит вітаміну B₁₂ також може спричинити депресію, психічне захворювання. Вітамін B₁₂ не викликає отруєння при внутрішньовенному чи внутрішньом'язовому введенні.

У сільськогосподарській сфері використовується як добавка для кормів. Вітамін B₁₂ може сприяти росту та розвитку домашньої птиці, худоби. Обробка ікри та мальків розчином вітаміну B₁₂ для збільшення стійкості до бензолу та важких металів, а також зниження смертності. Наразі світове виробництво вітаміну B₁₂ в основному використовується для кормової промисловості.

У сучасній промисловості комплекс вітаміну B₁₂ з іншими речовинами часто використовується в косметиці. Вітамін B₁₂ також використовується при дегалогенізації ґрунту, для захисту навколишнього середовища від забруднюючих речовин, у поверхневих водах від органічних галогенідів. [5]

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Вітамін В₁₂ (або кобаламін) – це водорозчинний вітамін, що грає важливу роль у кровотворенні, формуванні та підтриманні нервової системи та синтезі ДНК. Вітамін В₁₂ є складною молекулою, що складається з тетрапіролового кільця з атомом кобальту в центрі.

Найчастіше для біосинтезу вітаміну В₁₂ використовують факультативно анаеробні бактерії роду *Propionibacterium*, адже вони є безпечними. У цьому випадку культивування проходить у два етапи: анаеробна та аеробна стадія. Для культивування використовують глюкозомінеральне середовище, до складу якого входять іони кобальту, в якості попередника цільового продукту. [6]

Наприклад, штам *P. freudenreichii* CICC 10019, культивують на середовищі із глюкозою, дигідрофосфатом калію та хлористим кобальтом. На останніх етапах ферментації збільшують концентрацію пропіонової кислоти (до 20 мг/л). В такому випадку бактерія здатна продукувати до 59 мг/л вітаміну В₁₂. [7]

Продуцентом кобаламіну може бути також бактерія *Escherichia coli* – прокаріот, що є продуцентом для багатьох хімічних речовин. У ході еволюції бактерія втратила можливість самостійно синтезувати вітамін В₁₂, але може продукувати його шляхом відновлення, таким чином економити ресурси та енергію. Рекомбінантний штам *E. coli* може продукувати вітамін В₁₂ як в анаеробних, так і в аеробних умовах. Завдяки оптимізації умов культивування сконструйований штам синтезує близько 0,65 мкг/г коензиму В₁₂. [8]

Також відомо, що, наприклад, *Pseudomonas spp.* здатні промислово виробляти різні органічні сполуки, включаючи вітамін В₁₂. Серед *Pseudomonas spp.* штами *P. aeruginosa* та *P. putida* були описані як кращі продуценти кобаламіну, але патогенність цих штамів ускладнює їх використання у фармацевтичній та харчовій промисловості для потреб людини. Ці штами можуть успішно синтезувати понад 200 г/л кобаламіну. Однак біосинтез

					НУХТ БТЕК 05.01.06 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Лт.	Арк.	Аркушів
Розробив		Колоднікова Д. І.					12	66
Перевірив		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

вітаміну В₁₂ у цих штаммах є складним через тривалий процес ферментації (до 180 годин), складний і вартісний склад середовища та відсутність відповідних генетичних методів для штамової інженерії.

Останнім часом поширене вивчення бактерій для використання їх у промисловому виробництві необхідних речовин. Однією з таких є *Bacillus megaterium*, на відміну від *E. coli*, описаних вище, *B. megaterium* не виробляє ендотоксинів, пов'язаних із зовнішньою мембраною, що в поєднанні з її зростанням на різноманітних вуглецевих джерелах (наприклад, сирий гліцерин з виробництва біодизелю) та простих середовищах зробило її придатною для харчових та фармацевтичних процесів. Ця бактерія може синтезувати до 13 мкг/л вітаміну В₁₂. [9]

Також було вивчено синтез вітаміну В₁₂ генетично модифікованим штамом *Sinorhizobium meliloti*, культивування бактерії відбувалося аеробним шляхом на сольовій основі з додаванням пептону, дріжджового екстракту та глюкози. Для збільшення росту та виходу цільового продукту, до середовища додавали біотин та антибіотики. Завдяки цьому, *S. meliloti* може продукувати до 156 мг/л кобаламіну. [10]

З усього вище сказаного, можна зробити висновок, що використання бактерій роду *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 1367 для синтезу кобаламіну є найдоцільнішим. Завдяки таким фактам як найпростіший склад поживного середовища, відносно нетривалий час культивування та простий процес ферментації, а також доступність та безпечність продуцента, на виході ми маємо достатню кількість цільового продукту (до 0,3 мг/г), який можна використовувати для подальших цілей.

Для виробничого біосинтезу вітаміну В₁₂ *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673 використовуємо поживне середовище наступного складу (г/л):

5,6-диметилбензимідазол (DMBI) – 30;

CoCl₃ (хлорид кобальту) – 0,25;

C₃H₈ClNO₂S (цистеїн гідрохлорид) – 1,2;

FeSO₄ (сульфат заліза (II)) – 0,03;

LAPRS (рідкий кислотний залишок білка сої)

Джерелами Карбону у середовищі виступають стахіоза, а джерелами Нітрогену: LAPRS. [4]

2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

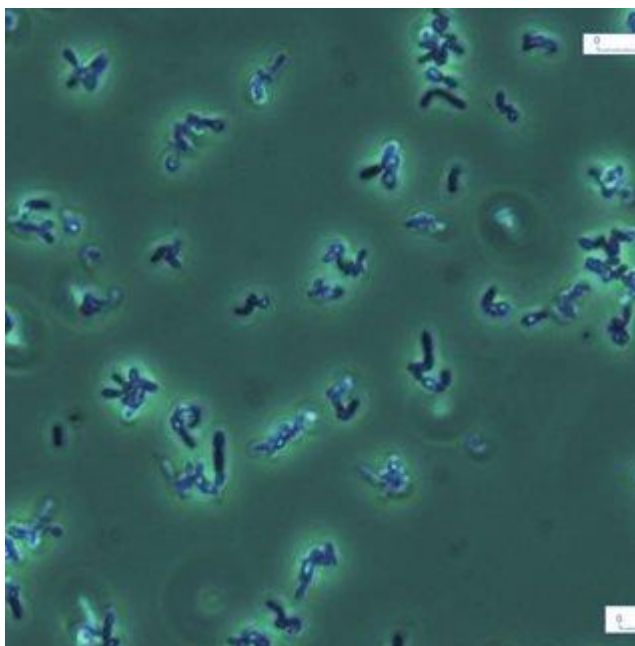


Рис.2.1 Мікроскопія *Propionibacterium shermanii*

Propionibacterium freudenreichii subsp. *shermanii* ATCC 1367 є грампозитивною бактерією, мезофільною, мікроаеротолерантною, нерухливою, неспороутворюючою, плеоморфною та мезофільною бактерією, яка має низькі потреби в харчуванні та виживає в суворих умовах. Вони є хемоорганотрофами, і їхній метаболізм характеризується здатністю ферментувати вуглеводи та органічні кислоти, такі як молочна кислота, до суміші пропіонової, оцтової та янтарної кислот і CO₂ як основних кінцевих продуктів метаболізму. Пропіонібактерії повільно ростуть, особливо на твердому середовищі. Оптимальна швидкість їх росту відбувається при температурі від 25 до 37°C. Що стосується морфології, то це плеоморфний паличкоподібний мікроорганізм, який має тенденцію до агрегації, утворюючи кластери, що нагадують китайські ієрогліфи (рис 2.1). [11]

Морфологія варіюється від маленьких коків до паличок, але також може бути подвійною або навіть розгалуженою. Пропіонібактерії часто групуються у формі «китайського ієрогліфа», але також можуть з'являтися поодиночі, парами або розташованими короткими ланцюжками. Крім того, багато штамів

можуть продукувати некапсульні екзополісахариди, які також називають «позаклітинним слизом». Коли пропіонові бактерії мають форму плеоморфних паличок, вони мають розміри $0,5\pm 0,8$ мкм в діаметрі і 1 ± 5 мкм в довжину. [12]

Клітинна стінка пропіонібактерій складається з пептидоглікану (муреїну) і додаткової матриці, що містить полісахариди, тейхоеві кислоти (гліцеринтейхоеві кислоти) і білки. Суха маса клітинної стінки пропіонібактерій представлена приблизно 30% пептидоглікану, 50% полісахаридами та 20% білками та тейхоевими кислотами. Лише два штами мають кристалічний поверхневий шар (S-шар) на додатково до загальних компонентів клітинної стінки. Клітинна стінка пропіонібактерій має імуностимулюючі властивості.

Клітинні ліпіди містять велику кількість 12-метилтетрадеканової кислоти та 13-метилтетрадеканової кислоти та меншу кількість 14-метилгексадеканової кислоти, пентадеканової кислоти, гексадеканової кислоти, 8-метилдеканової кислоти та 9-метилдеканової кислоти. 12-Метилтетрадеканова кислота має нижчу температуру плавлення (23°C), ніж 13-метилтетрадеканова кислота ($51,8^{\circ}\text{C}$) і таким чином, ймовірно, підтримує цілісність мембрани при низькій температурі.

Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii ATCC 1367 ростуть повільно і є вибагливим родом. Щоб досягти стаціонарної фази росту, їм потрібно щонайменше 2 дні в насиченому рідкому середовищі при 30°C і початковому рН 7. Збагачене середовище, як правило, складається з основного джерела вуглецю, такого як лактат або глюкоза, дріжджового екстракту та ферментативного розщеплення білка, наприклад гідролізат триптон, пептон або казеїну. [12]

Пропіонібактерії аеротолерантні. Вони володіють каталазою, цитохромами, менахінонами. Витримують парціальний тиск кисню до 300 мм рт.ст., але за присутності кисню перемикають свій метаболізм на накопичення піровиноградної кислоти. [12]

Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii ATCC 1367 зазвичай вирощують в анаеробних або мікроаерофільних умовах і визначають як анаеробів. Однак останні дослідження також повідомляють про окислювальну здатність з вільним киснем на різноманітних субстратах у пропіонобактерій. Відповідно, усі гени, необхідні для аеробного дихання, наявні в геномі P.

freudenreichii: гени, що кодують НАДН-дегідрогеназу, сукцинатдегідрогеназу, комплекс цитохрому, АТФ-азу. При високих концентраціях кисню синтез цитохрому, а отже, і ріст *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* АТСС 1367 пригнічуються. Перехід від анаеробної культури до аеробної викликає споживання пропіонової кислоти, що була вироблена в анаеробних умовах. Такий зсув був застосований для підвищення виходу виробництва вітаміну В₁₂ і виробництва 1,4-дигідрокси-2-нафтоїної кислоти. В анаеробних умовах акцептором електронів у *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* АТСС 1367 може бути сульфат, фумарат, нітрат, менахінон (вітамін К₂) або пул двовалентного заліза та гумінової кислоти в ґрунті. [13]

Пропіонібактерії можуть рости в діапазоні рН від 5,0 до 8,0, але оптимальний діапазон рН - від 6,0 до 7,5. Зростання дуже повільне при рН 5,5. Деякі штами можуть рости при рН 4,5, але вироблення пропіонової та оцтової кислот припиняється. [12]

Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii АТСС 13673 має низькі потреби в харчуванні. Він здатний синтезувати всі амінокислоти. Отже, *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* АТСС 13673 може рости на середовищах, що містять вуглець та джерело енергії, NH₄ як джерело азоту, мінерали та деякі вітаміни (пантотенат, біотин, тіамін). *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* АТСС 13673 синтезує, зокрема, вітамін В₁₂ (кобаламін), кофактор метилмалоніл-КоА-мутази, анаеробним шляхом. Вітамін В₁₂ вже давно виробляється промисловим шляхом і є найскладнішим вітаміном, синтезованим бактеріями. [13]

2.3 Таксономічний статус біологічного агента

За класифікацією Ейнсворта бактерії роду *Propionibacterium* мають таке систематичне положення [14]:

Домен	<i>Eukarua</i>
Царство	<i>Bacteria</i>
Відділ	<i>Actinomycetota</i>
Клас	<i>Actinomycetes</i>
Порядок	<i>Propionibacteriales</i>
Родина	<i>Propionibacteriaceae</i>

Рід	<i>Propionibacterium</i>
Вид	<i>Propionibacterium shermanii</i>
Підвид	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>Shermanii</i>

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Захворювання волосся є важливою медико-соціальною проблемою, яка пов'язана з широким розповсюдженням та значним впливом на якість життя людини. У дерматологічній практиці «проблема волосся» відіграє доволі велику роль, вона складає приблизно 4 % від загальної кількості звернень. Проблема лікування волосся, безумовно, важлива сама по собі, але здоров'я волосся та його зовнішній вигляд мають значення, що далеко виходить за рамки медицини і навіть просто соціальної психології. Тільки біологічне значення волосся не йде в жодне порівняння з їх соціально-психологічним значенням для людини [15].

Випадання волосся є поширеною проблемою, яку можна вирішити, включивши в свій раціон вітаміни та мінерали. Адекватний рівень вітамінів і мінералів має вирішальне значення для нормального розвитку та роботи клітин. Нестача цих поживних речовин може призвести до втрати волосся. Важливо мати знання про конкретні вітаміни та мінерали, які можуть ефективно боротися з втратою волосся, незважаючи на розумну вартість і легку доступність добавок. Двома поширеними формами випадіння волосся є андрогенна алопеція та телогенове випадання. Недостатня кількість основних поживних речовин може призвести до передчасного посивіння. Поживні мікроелементи відіграють вирішальну роль у циклі волосяного фолікула, сприяючи клітинному обміну, особливо в матриксних клітинах цибулини фолікула, що швидко діляться. [16].

					НУХТ БТЕК 05.01.06 КР ПЗ				
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ				
Розробив	Колоднікова Д. І.			Лт.				Арк.	Аркушів
Перевірив	Стабніков В.П.							18	66
Реценз.				Кафедра БТМ					
Н. контр.									
Затверд.	Стабніков В.П.								

З урахуванням вище зазначеного варто звернути увагу на використанні превентивних засобів для попередження випадіння волосся та їх доцільність. Доцільним є використання вітаміни груп С , В (В1, В2, В6, В12), А, Е, РР, препарати для покращення мікроциркуляції, мікроелементи (препарати міді, цинку, заліза). Є численні публікації, що вказують на високу ефективність та превентивність при попередженні випадіння волосся [17]. У дослідженні [18] проводилося вивчення впливу дефіциту вітаміну В12 на втрату волосся. Пацієнти не отримували добавки вітаміну В12 протягом періоду дослідження. Пацієнти з втратою волосся мали нижчі значення вітаміну В12 порівняно з пацієнтами без втрати волосся (243,04 проти 337,41 нг/мл). Тому консультування та корекція цього недоліку може бути профілактикою випадіння волосся [19].

Ціанокобаламін (Vit.В12)- є коферментом ферменту метіонінсинтази й, таким чином, відповідає за синтез майже 100 біологічних молекул, включаючи нуклеїнові кислоти ДНК і РНК, а через них – за синтез величезної кількості білків. Синтез нуклеїнових кислот також є фундаментальним процесом, який визначає явище розмноження клітин. І саме участь вітаміну В12 у виробленні нуклеїнових кислот однозначно вказує на те, що він повинен відігравати роль у життєдіяльності волосяного фолікула у фазі анагену, коли клітини інтенсивно розмножуються і виробляють дуже багато білків, що утворюють до 95% об'єму волосся [20].

Андрогенетична алопеція (AGA), також відома як структуроване випадання волосся, є найпоширенішим типом алопеції як у чоловіків, так і у жінок. Половина всіх чоловіків страждає від 50 років, тоді як 40% жінок – до 70 років [21].

У роботі буде розглянутий синтез вітаміну В12 для використання у лікувальному косметичному засобі, що використовується для профілактики

випадіння волосся. За даними Державної служби статистики України на території нашої країни працює понад 300 виробників парфумерно-косметичної продукції [22]. Також обсяги виробництва косметичної продукції у 2018 році зросли до 24,1 тис. т, що майже у 2 рази перевищує аналогічний показник 2017 р. [22]. В Україні засоби по догляду за волоссям є лідерами ринку косметичних засобів і займають близько 18%, обсяги продажів лікувальної косметики для волосся становлять близько 6%. Загалом, в останні роки спостерігається стрімке зростання частки ринку косметичних засобів вітчизняного виробника [23].

У засобах для догляду за волоссям вітамін В12 використовується зовнішньо. Із цим можуть бути проблеми, оскільки розмір молекули вітаміну В12 досить великі, що ускладнює процес дифузії через шкіру. Покращена трансдермальна доставка В12 можлива за допомогою ультрамаленьких ліпідних везикул (трансферсом і етосом). Кількість В12, яка потрапляє в системний кровотік, може бути максимально збільшена шляхом створення мікроканалів у роговому шарі. Таким чином, можливість місцевого лікування дефіциту вітаміну В12, уникаючи недоліків перорального та парентерального шляхів, тепер знову відкрита за допомогою цих наноносіїв. Крім того, слід зазначити, що препарати В12 можна застосовувати місцево для місцевих цілей, наприклад, для лікування атопічного дерматиту та псоріазу [24].

Доза вітаміну буде змінюватись залежно від стану, але загальний діапазон може полягати у використанні композиції, що містить від 0,1 до 10,0% за вагою вітаміну В12. Особливо бажаний діапазон коливається від приблизно 0,1 вагового відсотка до приблизно 1,0 вагового відсотка відносно композиції.

Стандартні шампуні згідно з дослідженням можуть включати: воду, лауретсульфат амонію, лаурилсульфат амонію, дистеарат гліколю,

кокоамід деа, диметикон, лимонну кислоту, гідроксид натрію, ароматизатор, ЕДТА, ксилосульфат, хлорид амонію, метилхлорізоціазолінон та метилізоціазолінон. Цю безрецептурну композицію модифікували шляхом додавання вітаміну В12 (1 мг на 100 мл шампуню, тобто той самий 1% від маси) [25].

Проведемо розрахунок потреби у цільовому продукті згідно даних Державної служби статистики України. За 2021 рік обсяг виробництва шампунів склав 1 065 876,5 дал (10 658 765 л).

Статистичні дані про виробництво саме лікувальних шампунів за 2021 рік відсутні. Але присутні дані щодо зареєстрованих медичних та косметичних шампунів для лікування найпоширеніших проблем із волоссям. Наприклад, для лікування алопеції та випадіння волосся за уніфікованою класифікаційною системою АТС (Anatomical Therapeutic Chemical) сформували інформаційний масив із 4 лікарських препаратів (сегмент «ЛЗ») і 29 косметичних (сегмент «КЗ») [26]. Для лікування себореюного дерматиту інформаційний масив складає із 59 лікарських засобів (сегмент «ЛЗ») та 28 косметичних засобів (сегмент «КЗ») [27]. Для більшості випадків лікування СД рекомендується місцеве лікування, яке включає протигрибкові, протизапальні та кератолітичні препарати. Частка препаратів ЛЗ D01A C (Похідні імідазолу і триазолу) в Державному реєстрі лікарських засобів у свою чергу становить 41 ЛЗ [28].

Припустимо, що обсяг лікарських шампунів становить 5% від загального виробництва шампунів у цілому:

$$10\ 658\ 765 \times 5\% = 532\ 938,25 \text{ л}$$

Враховуємо, що на ринку засобів для лікування та догляду за волоссям велика кількість інших препаратів, тому забезпечимо лише певний відсоток від загальної потреби, а саме приблизно 10%:

$$532\,938,25 \times 10,25297\% = 54642 \text{ кг}$$

Отже, в рік необхідно забезпечити виробництво лікувального засобу у кількості 54642 кг. Якщо врахувати випуск лікувального шампуню у емностях 1 л, із використанням вітаміну по 10 мг (0,00001 кг) на кожний літр, то маємо річну потребу у вітаміні B12 для лікування та профілактики випадіння волосся:

$$0,00001 \text{ кг} \times 54\,642 = 0,546427 \text{ кг}$$

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii ATCC 13673 продукує 0,25 мг вітаміну B12/г клітин. За 72 години виробничого культивування утворюється 7,5 г/л біомаси клітин продуцента. Відповідно, виходить, що після виробничої ферментації ми отримуємо:

$$\begin{aligned} 0,25 \text{ мг вітаміну B12} - \text{у } 1 \text{ г біомаси} & \times \text{ мг вітаміну B12} - \text{у } 7,5 \text{ г біомаси} \\ x & = (7,5 \times 0,25) / 1 = 1,875 \text{ мг вітаміну B12} \end{aligned}$$

При виході вітаміну B12 у 1,875 мг/л, або 0,001875 г/л із врахуванням потреби розраховуємо наступний необхідний об'єм культуральної рідини за рік:

$$V_{\text{к.р. річ}} = 0,546427 / 0,001875 = 291,428 \text{ м}^3$$

Із врахуванням можливих втрат у процесі виробництва (40%) маємо:

$$V_{\text{к.р. річ}} = 291,428 \times 1,4 = 408 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби продукту і геометричного об'єму ферментера

1. Розрахуємо кількість культуральної рідини, що необхідно одержати за один цикл ферментації (при прийнятій кількості трудоднів – 340 днів):

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 408/340 = 1,2 \text{ м}^3$$

2. Тоді кількість продукту за цикл:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 * V_d * T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 * 1,2 * 80,5) / 24 = 4,41 \text{ м}^3 / \text{цикл},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (72 год) та час підготовки ферментера до роботи (8,5 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

3. Визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_3 = 4,41 / 0,7 = 6,3 \text{ м}^3.$$

Обираємо ферментер об'ємом $6,3 \text{ м}^3$ із коефіцієнтом заповнення $0,7$. Об'єм культуральної рідини становить $V_{\text{к.р.}} = 4,41 \text{ м}^3 \approx 4,5 \text{ м}^3$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробниче культивування *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673 для одержання вітаміну B_{12} здійснюють у ферментері об'ємом $6,3 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення $0,7$. Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{\text{роб}} = 6,3 * 0,7 = 4,5 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 5 м^3 культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 4,5 * 0,1 = 0,45 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті об'ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення $0,7$.

Для засіву посівного апарату (одержання $0,5 \text{ м}^3$ культуральної рідини) необхідно:

$$V_{\text{роб.2}} = 0,45 * 0,1 = 45 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у посівному апараті об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення $0,7$.

45 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб.3}} = 45 \times 0,1 = 4,5 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у посівному апараті об'ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,7.

4,5 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб.4}} = 4,5 \times 0,1 = 0,45 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу вітаміну B₁₂ у ферментері об'ємом 6,3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити у чотири етапи.

Для одержання 0,45 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення 0,2. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{450}{750 \times 0,2} = 3 \text{ колби}$$

3.5 Схема біотрансформації ростового субстрату

Двома характерними особливостями метаболізму пропіонобактерій є цикл Вуда-Веркмана і присутність мультимерної транскарбоксилази, яка каталізує оборотний перенос карбоксильної групи від метилмалоніл-КоА до пірувату з утворенням пропіоніл-КоА і оксалоацетату. Перенесена карбоксильна група не вивільняється і не обмінюється з СО₂, розчиненим у середовищі, і щавлевооцтова кислота завжди утворюється в каталітичній кількості. Реакції циклу Вуда-Веркмана оборотні аж до пірувату.

Пропіонібактеріальна D-лактатдегідрогеназа і L-лактатдегідрогеназа є переважно ферментами клітинної стінки, які не вимагають НАД як кофактору. Більшість штамів пропіонобактерій мають L-лактатдегідрогеназу.

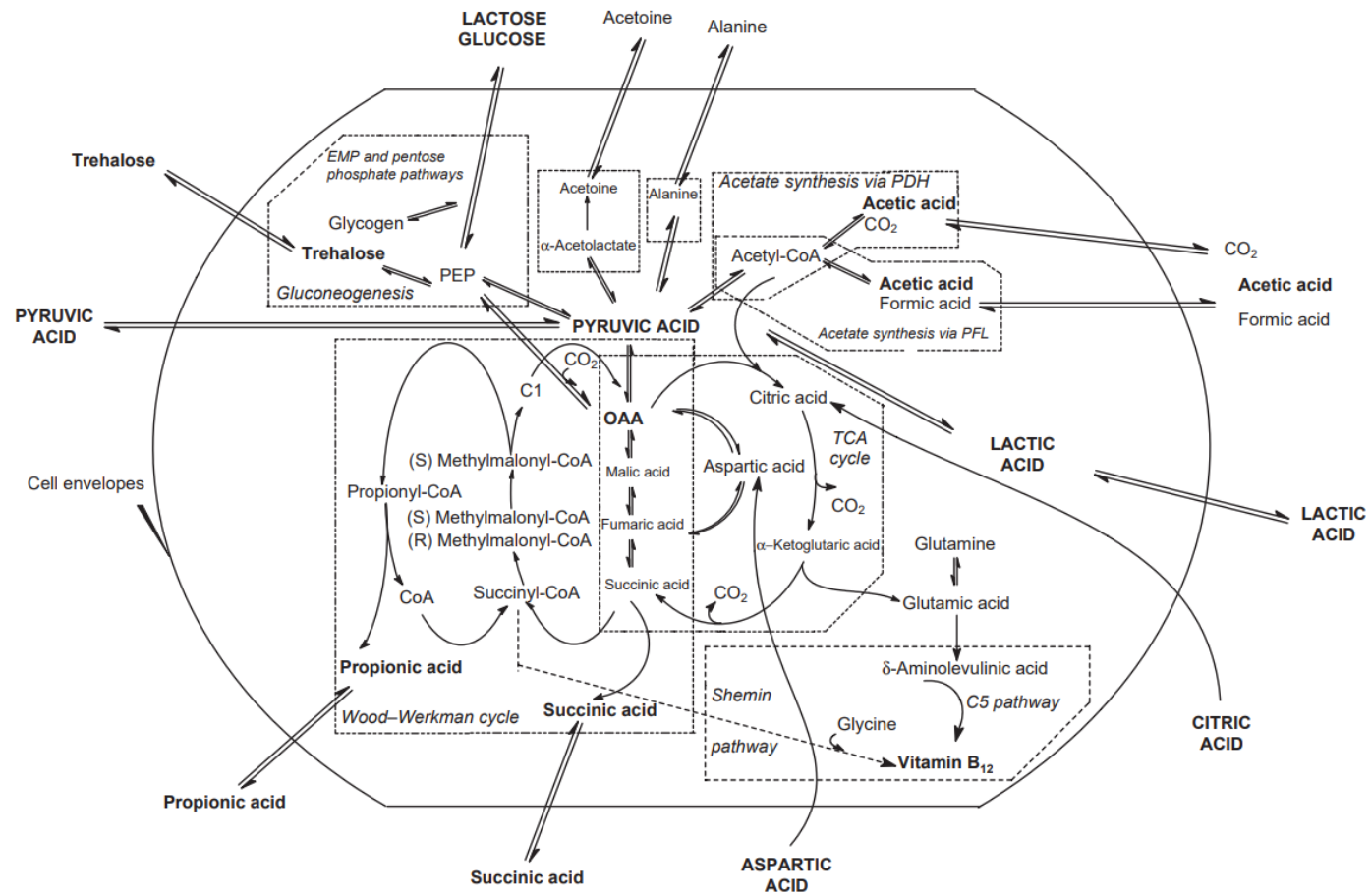


Рис 3.2 Схема біотрансформації ростового субстрату [29]

Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii ATCC 1367 використовує модифікований цикл трикарбонових кислот, оскільки активності 2-кетоглутаратдегідрогенази не спостерігалось, але повідомлялося про активність 4-амінобутаноат-2-оксоглутарат амінотрансферази. Крім того, цей цикл, ймовірно, призначений для анаболічних процесів, а не для енергетичних цілей, оскільки основна частина енергії може бути отримана з циклу Вуда-Веркмана, і жодний катаболічний шлях, окрім першої третини повороту циклу трикарбонових кислот, не використовується *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 1367 для розкладання цитрату на глутамат.

Внутрішньоклітинний і позаклітинний рН і середня концентрація CO₂ впливають на накопичення сукцинату під час лактатної або вуглеводної ферментації пропіонібактеріями. Оскільки перетворення пірувату в оксалоацетат поєднується з утворенням пропіонату, накопичення сукцинату має відбуватися лише безпосередньо до фосфоенолпірувату через фосфоенолкарбокситрансфосфорилазу та оксалоацетат. Другим шляхом біосинтезу сукцинату є катаболізм аспартату за допомогою внутрішньоклітинної аспартази або за допомогою амінотрансферази.

Пропіонібактерії метаболізують вуглеводи шляхом Ембдена-Мейєргофа або пентозофосфатним шляхом. Усі ферменти виявлені. Пропіонібактерії синтезують і зберігають вуглеводи, такі як глікоген і трегалозу, як вуглецевий резерв.

Основними амінокислотами, що метаболізуються пропіонібактеріями, є аспарагінова кислота, гліцин, серин і аланін. Іншою цікавою особливістю пропіонобактерій є високий вміст поліфосфатів, які виконують функцію запасу високоенергетичних зв'язків і беруть участь у кількох біохімічних реакціях.

З початку 1920-х років вітамін B₁₂ вироблявся промисловим способом шляхом мікробної ферментації, використовуючи види *Pseudomonas denitrificans* і *Propionibacterium*. Природний вітамін B₁₂ потім перетворюється у форму ціанокобаламіну за допомогою хімічних процесів. Тварини та люди перетворюють ціанокобаламін у метилкобаламін, який функціонує як кофермент для кількох метаболічних перетворень. Промислове виробництво вітаміну B₁₂ *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 1367 є двостадійним процесом. З 1 кг біомаси пропіонових бактерій можна отримати до 300 г вітаміну B₁₂. [29]

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Штам *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673 визначають як факультативний анаероб. На етапах, під час яких відбувається нарощення біомаси, для забезпечення найшвидшого росту, необхідно створити анаеробні умови. Для цього ферментер необхідно продувати стерильним азотом та забезпечувати перемішування 200 об/хв. Під час біосинтезу вітаміну В12 створюють мікроаерофільні умови, продуваючи ферментер стерильним повітрям, у концентрації 0,5 м³/год.

Штам *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673 належить до мезофілів, проте має високу термостійкість і витримує короточасний вплив температури 70 °С (до 20 секунд). Оптимальними умовами для його росту є температура 30 °С та рН 6,5. Такий режим сприяє розвитку сторонніх мікроорганізмів (мезофілів, нейтрофілів, аеробів), тому культивування потребує суворої асептики, включно зі стерилізацією обладнання, комунікацій, аеруючого повітря та середовища. [30]

Вітамін В12, що синтезується *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673, є екзометаболітом, тому застосовується глибинний метод культивування. Його максимальна концентрація (0,25 мг/г клітин) досягається через 96 годин, що обґрунтовує безперервний процес біосинтезу.

Отже, виробництво вітаміну В12 відбувається безперервним глибинним методом в анаеробних та мікроаерофільних умовах із дотриманням асептики. Ферментер для процесу повинен мати сорочку для подачі пари, барботер, мішалку та датчики контролю температури, тиску та розчиненого кисню.

Для біосинтезу вітаміну В12 ми обираємо ферментер об'ємо 6,3 м³ фірми Shanghai Baoxing Bio-Engineering Equipment Co., що є одним із перших виробників, що спеціалізуються на біореакторах, контролерах біопроцесів, а також постачальник біоінженерних послуг у Китаї з 1993 року. Продукти ВХВІО широко використовуються в освіті, наукових дослідженнях, біо-

					НУХТ БТЕК 05.01.06 КР ПЗ					
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ					
Розробив	Колоднікова Д. І.							Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив	Стабніков В.П.								27	66
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

виробництві тощо у світі, і сьогодні є тисячі продуктів ВХВІО, які ідеально працюють.

Ферментер Cover Lift Stainless Steel Fermenter Bioreactor виготовлений з нержавіючої сталі. Оснащений автоматизованою системою контролю рН, температури, розчиненого кисню, тиску та перемішування. Має підйомну кришку для зручного доступу, систему аерації з контролем потоку газів, стерильні фільтри та сенсори. Придатний для біотехнологічних процесів, таких як культивування бактерій, дріжджів та клітинних культур.

Перемішування здійснюється за допомогою магнітної або механічної системи мішалок з регульованою швидкістю (від 50 до 1000 об/хв). Ферментер оснащений автоматичним контролем подачі газів (O₂, CO₂, N₂, повітря) через стерильні фільтри 0,2 мкм. Має контрольовану систему нагріву та охолодження (10–80°C), автоматичний моніторинг та регулювання рівня рН та концентрації кисню. Робочий тиск 0,2–0,5 МПа. [41]

4.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii ATCC 13673 є анаеробним організмом, найшвидший приріст біомаси отримуємо при анаеробних умовах, але для виробництва ціанкобаламіну необхідно створити мікроаерофільні умови, тому ферментаційний процес на етапі виробничого біосинтезу, проводиться із безперервною подачею стерильного аераційного повітря через барботер. Таким чином, однією з ключових задач є забезпечення достатньої кількості стерильного повітря для аерації.

Процес підготовки стерильного стисненого повітря для біореакторів включає такі етапи:

1. Забір атмосферного повітря: Повітря забирається турбокомпресором через шахту на висоті 2–3 м від найвищої точки будівлі. Це зменшує кількість мікроорганізмів, адже їх концентрація знижується із підвищенням висоти. Для заданого виробництва забір відбувається на висоті 10 м.
2. Попереднє очищення повітря: Повітря очищають від пилу та великих часток за допомогою фільтрів, щоб захистити компресори та знизити рівень контамінації.
3. Стиснення повітря: У турбокомпресорі повітря стискається до 0,35–0,5 МПа, що спричиняє підвищення температури до 120–250°C і зростання вологовмісту.

4. Охолодження та осушення: Стиснене повітря охолоджується у водяному теплообміннику, після чого волога видаляється у краплевловлювачі.

5. Ресивер: Повітря надходить у ресивер для остаточного видалення вологи та стабілізації тиску.

6. Фільтрування головними фільтрами: Головні фільтри, розташовані на головному повітряному колекторі, видаляють до 98% мікроорганізмів.

7. Фільтрування на індивідуальних фільтрах: Безпосередньо перед кожним ферментером встановлюються додаткові фільтри, які затримують 99,999% мікроорганізмів.

Використання волокнистих і пористих матеріалів для очищення повітря є економічно і технологічно виправданим рішенням, оскільки дозволяє досягти ступеня чистоти до 99,9999%. Частинки в повітрі осаджуються завдяки інерційному та дифузійному механізмам.

Фільтри стерилізують шляхом нагрівання вологою парою при температурі 125–130°C, витримуючи їх певний час, після чого висушують гарячим повітрям. [31]

4.3 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу вітаміну B12 *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673 використовуємо поживне середовище наступного складу (г/л):

5,6-диметилбензимидазол (DMBI) – 30;

CoCl₃ (хлорид кобальту) – 0,25;

C₃H₈ClNO₂S (цистеїн гідрохлорид) – 1,2;

FeSO₄ (сульфат заліза (II)) – 0,03;

LAPRS (рідкий кислотний залишок білка сої)

Джерелами Карбону у середовищі виступають стахіоза, а джерелами Нітрогену: LAPRS. [4]

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

Об'єм середовища на першому етапі становить 0,45 л, тому стерилізація здійснюється в автоклаві. Поживне середовище, в залежності від режиму стерилізації, ділимо на наступні композиції:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт, натрію лактат, твін-80 та цистеїну гідрохлорид. Компоненти поміщають у колбу і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 30 хв.

Композиція Б: $MnSO_4$ (сульфат марганцю), $MgSO_4$ (сульфат магнію) та $CoCl_3$ (хлорид кобальту), $FeSO_4$ (сульфат заліза (II)). Солі поміщають у колбу та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

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

Другим етапом є вирощуванні інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л (об'єм поживного середовища 45 л). Для підготовки поживного середовища проводимо стерилізацію компонентів у колбах в автоклаві у наступних композиціях:

Композиція А: цистеїну гідрохлорид. Компоненти поміщають у колбу і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 30 хв.

Композиція В: LAPRS. До концентрованого LAPRS додають NaOH до отримання рН 8, додають трипсин (для каталітичної реакції розщеплення білків), залишають на 3 год. Після відведеного часу додають HCl, доводячи рН до 6,5, та стерилізують у колбі в автоклаві при температурі 121 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 15 хв.

Композиція Б: $CoCl_3$ (хлорид кобальту), $FeSO_4$ (сульфат заліза (II)). Солі поміщають у колбу та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв

Третім етапом є вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,1 м³ (об'єм поживного середовища 45 л). Для підготовки поживного середовища проводимо стерилізацію композицій А,Б та В у колбах в автоклаві, так як об'єм невеликий:

Композиція А: цистеїну гідрохлорид. Процес стерилізації відбувається у колбах в автоклаві. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за

показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С..

Композиція В: LAPRS. До концентрованого LAPRS додають NaOH до отримання рН 8, додають трипсин (для каталітичної реакції розщеплення білків), залишають на 3 год. Після відведеного часу додають HCl, доводячи рН до 6,5, та стерилізують у ферментері при температурі 121 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 15 хв.

Композиція Б: CoCl₃ (хлорид кобальту), FeSO₄ (сульфат заліза (II)). Солі поміщають у колбу та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

Четвертим етапом є вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³ (об'єм поживного середовища 450 л). Для підготовки поживного середовища проводимо стерилізацію композицій у реакторах:

Композиція А: цистеїн. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С..

Композиція В: LAPRS. До концентрованого LAPRS додають NaOH до отримання рН 8, додають трипсин (для каталітичної реакції розщеплення білків), залишають на 3 год. Після відведеного часу додають HCl, доводячи рН до 6,5, та стерилізують у ферментері при температурі 121 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 15 хв..

Композиція Б: CoCl₃ (хлорид кобальту), FeSO₄ (сульфат заліза (II)). Після досягнення тиску усередині апарату 0,15 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 60 хв при температурі 131 °С.

4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 6,3 м³

Виробничий біосинтез відбувається у ферментері об'ємом 6,3 м³ (об'єм поживного середовища 4410 л). Для підготовки поживного середовища проводимо стерилізацію композицій у реакторах:

Композиція А: цистеїн. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С..

Композиція Г: 5,6-диметилбензimidазол (DMBI). Після досягнення тиску усередині апарату 0,8 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 120 °С.

Композиція Б: CoCl_3 (хлорид кобальту), FeSO_4 (сульфат заліза (II)). Після досягнення тиску усередині апарату 0,15 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 60 хв при температурі 131 °С.

Композиція В: LAPRS. До концентрованого LAPRS додають NaOH до отримання рН 8, додають трипсин (для каталітичної реакції розщеплення білків), залишають на 3 год. Після відведеного часу додають HCl, доводячи рН до 6,5, та стерилізують у ферментері при температурі 121 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 15 хв

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
I-1	Посівний апарат об'ємом 10 л	1	<p>Biostat Cplus 10 л Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304, 316L, борсилікатне скло; Швидкість: 20–1500 об/хв; Температурний діапазон: 0–150 °С; Робочий тиск: від 0,5 до 2 бар; Потужність двигуна мішалки: 800 Вт; наявний датчик рН; закрита термостатована система з рециркуляційним насосом, теплообмінником для охолодження / нагрівання; Габаритні розміри, мм: 1900 x 1020 x 750. [32]</p>
I-2	Посівний апарат об'ємом 100 л	1	<p>Біореактор об'ємом 100 л Виробник: Shanghai Ritai; Матеріал: SS316L, SS304; Датчики: рН, DO, RPM, TEMP, FOAM; Робочий тиск: 0,25 МПа; Швидкість: 50-400 об/хв; Потужність двигуна мішалки: 0,75-3 кВт; Температурний діапазон: 0–150 °С; Габаритні розміри, мм: вн. діаметр 500 x 500. [33]</p>
ВД-3	Об'ємно ваговий дозатор для посівного апарату об'ємом 100 л	2 (ВД-3 та ВД-12)	<p>Дозатор ваговий сипучих продуктів F-5000 Матеріал корпусу нержавіюча сталь Діапазон зважування, г 20-5000 Продуктивність, зважувань / хв 3-10 Точність зважування, г ± 2 Потужність, кВт 0,3 Напруга живлення, В / Гц 220/50 Габаритні розміри, мм 680 x 400 x 1300 [34]</p>

НУХТ БТЕК 05.01.06 КР ПЗ				
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата
Розробив		Колоднікова Д. І.		
Перевірив		Стабніков В.П.		
Реценз.				
Н. контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ		
Лт.	Арк.	Аркушів
	33	66
Кафедра БТМ		

Продовження табл. 5.1

Н-4	Насос від посівного апарату об'ємом 100 л	1	Насос перистальтичний МР-6118.12 Виробник: Debem; Продуктивність – до 226 л/год; Робочий тиск: до 1,4 бар; Потужність двигуна: 0,09 кВт; [35]
Д-5	Дозатор води для посівного апарату об'ємом 100 л	1	Насос-дозатор "Exactus" Виробник: Fluidra; Продуктивність: 20 л/год; Робочий тиск: 5 бар; [36]
І-6	Посівний апарат об'ємом 1000 л	1	Stainless Steel Microbial Fermenter INOFE-JS 1 м ³ Виробник: Innova; Матеріал: SUS 316L stainless steel; Датчики температури, швидкості обертання, рН, DO, піногасник, подачі; Швидкість: до 1000 об/хв; Потужність двигуна мішалки: 1,5-15 кВт; Габаритні розміри, мм: 1200 x 1000 [37]
ВД-7	Об'ємно ваговий дозатор для посівного апарату об'ємом 1000 л	1	Ваговий дозатор ВДСВ-3 Виробник: ABC Tech; Діапазон зважування: до 15 кг; Потужність: 0.6 кВт; Продуктивність: 6 шт./хв; Габаритні розміри, мм: 780 x 780 x 1780. [38]
Н-8	Насос від посівного апарату об'ємом 1000 л	1	Мембранний пневматичний насос Yamada NDP-20BST-PP Виробник: YAMADA; Матеріал: Нерж. AISI 316; Матеріал мембран: PTFE; Продуктивність: 6,2 м ³ /год; [39]
Д-9	Дозатор води для посівного апарату об'ємом 1000 л	2 (Д-9 та Д-20)	Дозатор-змішувач води Polin DOSER FULL MIX Виробник: Polin; Продуктивність: 25 л/хв (1,5 м ³ /год); Матеріал: Нерж. AISI 316; Потужність: 0,18 кВт; [40]

Продовження табл. 5.1

Ф-9	Ферментер об'ємом 6,3 м ³	1	Cover Lift Stainless Steel Fermenter Bioreactor 6,3 м ³ (замовлення у виробника) Виробник: Shanghai Baoxing Bio-Engineering Equipment; Швидкість обертання: 50~1000 об/хв +/- 0.5%; Оснащений датчиками контролю температури, розчиненого кисню, рН, рівня. Потужність: 1,5-45 кВт; Габаритні розміри, мм: 1600 x 3100. [41]
ВД-10	Об'ємно ваговий дозатор для ферментеру	2 (ВД- 15 та ВД- 19)	Дозатор ваговий автоматичний шнековий ДВП-3 Виробник: Асвік Центр; Продуктивність: 25 кг/хв. Потужність: 1000 Вт; Габаритні розміри, мм: 650 x 780 x 1300. [42]
Д-11	Дозатор води для ферментеру	1	Дозатор води DOSAMAT 1P Продуктивність: 3,6 м ³ / год; Робочий тиск: 10 бар; Потужність: 0,1 кВт; Габаритні розміри, мм: 16 x 12 x 22. [43]
Р-12	Реактор для підготовки LAPRS	1	Реактор об'ємом 6 м ³ (під замовлення у виробника) Виробник: Labfirst Scientific Instruments (shanghai) Co., Ltd.; Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; Потужність перемішування: 1,8 кВт; Швидкість обертання: 500 об/хв; Габаритні розміри: 1800 x 2300. [45]
Н-13	Насос від реактору для підготовки LAPRS	2 (Н-8 та Н- 13)	Мембранний пневматичний насос Yamada NDP-20BST-PP Виробник: YAMADA; Матеріал: Нерж. AISI 316; Матеріал мембран: PTFE; Продуктивність: 6,2 м ³ /год; [39]
ВД-14	Ваговий дозатор для реактору для підготовки LAPRS	2 (ВД- 10 та ВД- 14)	Дозатор ваговий автоматичний шнековий ДВП-3 Виробник: Асвік Центр; Продуктивність: 25 кг/хв. Потужність: 1000 Вт; Габаритні розміри, мм: 650 x 780 x 1300. [42]

Закінчення табл. 5.1

Д-15	Дозатор води для реактору для підготовки LAPRS	2 (Д-11 та Д-15)	Дозатор води DOSAMAT 1P Продуктивність: 3,6 м ³ / год; Робочий тиск: 10 бар; Потужність: 0,1 кВт; Габаритні розміри, мм: 16 x 12 x 22. [43]
З-16	Збірник для 10-% HCl об'ємом 15 л	1	Збірник об'ємом 15 л (під замовлення) Виробник: Wise Master; Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316; Оснащений перемішуючим пристроєм; Опціонально: підігрів або охолодження до певної температури. [44]
ВД-17	Об'ємно-ваговий дозатор для збірника для 10-% HCl	2 (ВД-7 та ВД-22)	Ваговий дозатор ВДСВ-3 Виробник: ABC Tech; Діапазон зважування: до 15 кг; Потужність: 0.6 кВт; Продуктивність: 6 шт./хв; Габаритні розміри, мм: 780 x 780 x 1780. [46]
З-18	Збірник для 20-% NaOH об'ємом 10 л	1	Збірник об'ємом 10 л (під замовлення) Виробник: Wise Master; Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316; Оснащений перемішуючим пристроєм; Опціонально: підігрів або охолодження до певної температури. [44]
ВД-19	Об'ємно-ваговий дозатор для збірника для 20-% NaOH	2 (ВД-3 та ВД-19)	Дозатор ваговий сипучих продуктів F-5000 Матеріал корпусу нержавіюча сталь Діапазон зважування, г 20-5000 Продуктивність, зважувань / хв 3-10 Точність зважування, г ± 2 Потужність, кВт 0,3 Напруга живлення, В / Гц 220/50 Габаритні розміри, мм 680 x 400 x 1300 [34]
Н-20	Насос від збірника ля збірника для 10-% HCl	3 (Н-4, Н-20, Н-21)	Насос перистальтичний МР-6118.12 Виробник: Debet; Продуктивність – до 226 л/год; Робочий тиск: до 1,4 бар; Потужність двигуна: 0,09 кВт; [35]
Н-21	Насос від збірника ля збірника для 20-% NaOH	3 (Н-4, Н-20, Н-21)	Насос перистальтичний МР-6118.12 Виробник: Debet; Продуктивність – до 226 л/год; Робочий тиск: до 1,4 бар; Потужність двигуна: 0,09 кВт; [35]

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка стерильного нітрогену

ДР 1.1 Встановлення редуктора на балон із нітрогеном

На балон з азотом встановлюється редуктор із високою точністю для забезпечення стабільного тиску (0,5 МПа). Для забезпечення зниження тиску азоту до безпечного рівня для подальшої обробки та подачі в систему.

ДР 1.2 Стерилізуюча фільтрація

Газ пропускають через стерилізуючі фільтри з розміром пор 0,2 мкм, які затримують мікроорганізми.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря проводять за допомогою вертикальної труби, обладнаної повітрозабірником, розташованим на висоті $H = 10$ м.

ДР 2.2. Очищення від грубих домішок

Попереднє очищення повітря відбувається за допомогою тканинного фільтра грубого очищення, який забезпечує ефективність $E = 90\%$ та затримує частинки діаметром понад 50 мкм.

ДР 2.3. Компресіювання повітря

Для забезпечення аерації, подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, подолання інших опорів, а також для задоволення виробничих потреб, повітря стискають у компресорі. При цьому воно нагрівається до 120–200 °С, а тиск досягає 0,35 МПа.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря (від ДР 2.3) охолоджують у теплообміннику-осушувачі до температури 25–30 °С, щоб видалити надлишкову вологу. Зайва волога усувається за допомогою ресивера, який також згладжує пульсації повітряного потоку, що можуть негативно впливати на роботу наступних фільтрів очищення. Вологість повітря після обробки повинна становити 60–70%.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

У теплообміннику повітря прогрівається до температури 70-90 °С.

ДР 2.6 Очищення повітря в фільтрі

					НУХТ БТЕК 05.01.06 КР ПЗ		
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Колоднікова Д. І.			Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Стабніков В.П.				37	66
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Повітря надходить на головний фільтр, який затримує частинки розміром понад 1 мкм із ефективністю очищення 99%.

ДР 2.7. Фільтрація повітря в індивідуальному фільтрі

Фільтрація повітря в індивідуальному фільтрі проводиться з ефективністю $E=99,999\%$, при цьому затримуються частки розміром більше 0,2 мкм.

ДР 3 Приготування і стерилізація титруючих агентів

ДР 3.1 Приготування 10% розчину HCl для підготовки LAPRS

У збірник 3-16 об'ємом 15 л через об'ємно-ваговий дозатор ВД-17 подають 7145 мл води питної, вмикають перемішуючий пристрій і вносять 2647 мл 37 %-го розчину HCl.

ДР 3.2 Приготування 10% розчину NaOH для підготовки LAPRS

У збірник об'ємом 15 л через об'ємно-ваговий дозатор подають 979,2 г кристалічного NaOH, вносять 8812,8 мл питної води, вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення наважки NaOH

ДР 3.3 Приготування 20% розчину HCl для підкислення культуральної рідини

У збірник об'ємом 10 л через об'ємно-ваговий дозатор подають 2257 мл води питної, вмикають перемішуючий пристрій і вносять 2653 мл 37 %-го розчину HCl.

ДР 3.4 Приготування і стерилізація 20% розчину NaOH для підлужнення культуральної рідини

У збірник 3-18 об'ємом 10 л через об'ємно-ваговий дозатор ВД-19 подають 982 г кристалічного NaOH, вносять 3928 мл питної води, вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення наважки NaOH. Отриманий розчин луку стерилізують при температурі 131°C, тиску 0,15 МПа, упродовж 50 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1 Підготовка LAPRS.

ДР 4.1.1 Розщеплення білків. У збірник Р-12 об'ємом 6,3 м³ наливають 4888,2 л концентрованого LAPRS через об'ємно-ваговий дозатор ВД-14 додають 10% розчин NaOH (підготовлений у ДР 3.2) до отримання рН 8 та 48,882 кг трипсину (для каталітичної реакції протеолізу), перемішують та залишають на 3 год.

ДР 4.1.2 Стерилізація LAPRS. Після відведеного часу додають через об'ємно-ваговий дозатор 10%-ий розчин HCl (підготовлений у ДР 3.3),

перемішують, доводячи рН до 6,5, та стерилізують у реакторі Р-12 при температурі 121 °С (тиск 0,1 МПа) упродовж 15 хв.

ДР 4.2. Підготовка поживного середовища для вирощуванні інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 0,45 л поживного середовища. Джерелом вуглецю в середовищі є глюкоза, джерелом азоту – дріжджовий екстракт. Вміст компонентів для приготування 0,45 л середовища наведено в табл. 4.1.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,45 л середовища

Таблиця 6.1

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0,45 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	20	9	А	250
дріжджовий екстракт	20	9		
NaC ₃ H ₅ O ₃ (натрію лактат)	13	5,85		
твін-80	0,1	0,045		
C ₃ H ₇ NO ₂ S (цистеїн)	0,5	0,225		
Фосфатний буфер 1М	100	45		
Вода		250		
MnSO ₄ (сульфат марганцю)	0,02	0,009	Б	250
MgSO ₄ (сульфат магнію)	0,2	0,09		
CoCl ₂ (хлорид кобальту)	0,015	0,007		
Вода		250		

ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 9 г глюкози, 9 г дріжджового екстракту, 5,85 г натрію лактату, 0,045 г твін-80, 45 мл фосфатного буфера 1м та 0,225 г цистеїну. Наважку поміщають у колбу об'ємом 0,5 л, доливають 250 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С (тиск 0,1 МПа) упродовж 30 хв.

ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б.

На торсійних вагах зважують 0,009 г $MnSO_4$ (сульфат марганцю), 0,09 г $MgSO_4$ (сульфат магнію) та 0,007 г $CoCl_2$ (хлорид кобальту). Наважку поміщають у колбу об'ємом 400 мл, додають 250 мл води питної. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 4.3 Підготовка поживного середовища для вирощуванні інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 4,5 л поживного середовища. Джерелом вуглецю в середовищі є стахіоза, джерелом азоту – LAPRS. Вміст компонентів для приготування 4,5 л середовища наведено в табл. 4.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4,5 л середовища

Таблиця 6.2

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 4,5 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
$C_3H_8ClNO_2S$ (цистеїну гідрохлорид)	1,2	5,4	А	50
Вода		50		
$CoCl_3$ (хлорид кобальту)	0,25	1,125	Б	50
$FeSO_4$ (сульфат заліза (II))	0,03	0,135		
Вода		50		
LAPRS		4900	В	4900

ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 5,4 г цистеїну гідрохлориду. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, доливають 50 мл води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С (тиск 0,1 МПа) упродовж 30 хв.

ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б.

На торсійних вагах зважують 0,135 г FeSO₄ (сульфат заліза (II)) та 1,125 г CoCl₂ (хлорид кобальту). Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, доливають 50 мл води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 4.4 Підготовка поживного середовища для вирощуванні інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,1 м³

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 45 л поживного середовища. Джерелом вуглецю в середовищі є стахіоза, джерелом азоту – LAPRS. Вміст компонентів для приготування 45 л середовища наведено в табл. 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 45 л середовища

Таблиця 6.3

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 45 л середовища, г	Комп.	Об'єм композиції, л
C ₃ H ₈ ClNO ₂ S (цистеїну гідрохлорид)	1,2	54	А	150 мл
Вода		150		
Конденсат		15 мл		
CoCl ₂ (хлорид кобальту)	0,25	11,25	Б	50 мл
FeSO ₄ (сульфат заліза (II))	0,03	1,35		
Вода		50		
Конденсат		5 мл		5 мл
LAPRS		44,8 л	В	44,8

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А. На технічних вагах зважують 54 г цистеїну. Наважку поміщають у колбу об'ємом 300 мл, доливають 150 мл води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 0,1 МПа упродовж 30 хв.

ДР 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б. На технічних вагах зважують 1,35 г FeSO₄ (сульфат заліза (II)) та 11,25 г CoCl₃ (хлорид кобальту). Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, доливають 50 мл води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 4.5 Підготовка поживного середовища для вирощуванні інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м³

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 450 л поживного середовища. Джерелом вуглецю в середовищі є стахіоза, джерелом азоту – LAPRS. Вміст компонентів для приготування 450 л середовища наведено в табл. 4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 450 л середовища

Таблиця 6.4

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 450 л середовища, г	Комп.	Об'єм композиції, л
C ₃ H ₈ ClNO ₂ S (цистеїну гідрохлорид)	1,2	540	А	1500 мл
Вода		1500		
Конденсат		150 мл		
CoCl ₃ (хлорид кобальту)	0,25	112.5	Б	500 мл
FeSO ₄ (сульфат заліза (II))	0,03	13.5		
Вода		500		
Конденсат		50 мл		
LAPRS		448 л	В	448

ДР 4.5.1. Приготування і стерилізація композиції А. На технічних вагах зважують 540 г цистеїну. Наважку поміщають у колбу об'ємом 3 л, доливають

1500 мл води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, 0,1 МПа упродовж 30 хв.

ДР 4.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б. На технічних вагах зважують 13.5 г FeSO₄ (сульфат заліза (II)) та 112.5 г CoCl₃ (хлорид кобальту). Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 500 мл води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 4.6 Приготування поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 6,3 м³ (6300 л).

Виробниче культивування проводять у ферментері об'ємом 6,3 м³, для чого готують 4410 л середовища складу, наведеного у табл. 4.5.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4410 л середовища

Таблиця 6.5

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 4410 л середовища, г	Комп.	Об'єм композиції, л
C ₃ H ₈ ClNO ₂ S (цистеїну гідрохлорид)	1,2	5292	А	15
Вода		15000		
Конденсат		1500		
CoCl ₃ (хлорид кобальту)	0,25	1102,5	Б	3
FeSO ₄ (сульфат заліза (II))	0,03	132,3		
Вода		3000		
Конденсат		300		
5,6-диметилбензімідазол (DMBI)	0,03	132,3	Г	1,5
Вода		1500		
Конденсат		150		
LAPRS		4390,5 л	В	4390,5

ДР 4.6.1. Приготування і стерилізація композиції А. 5292 г цистеїну гідрохлориду через об'ємно-ваговий дозатор ВД-10 завантажують у ферментер Ф-14. Відкривають вентиль подачі води питної і через об'ємно-ваговий дозатор Д-11 подають у збірник 15 л води. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,1 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара.

ДР 4.6.2. Приготування композиції Г. На технічних вагах зважують 132,3 г 5,6-диметилбензимідазолу. Наважку поміщають у колбу об'ємом 3 л, доливають 1500 мл води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 120 °С, 0,3 МПа упродовж 30 хв.

ДР 4.6.3 Приготування і стерилізація композиції Б. На технічних вагах зважують 132,3 г FeSO₄ (сульфат заліза (II)) та 1102,5 г CoCl₃ (хлорид кобальту). Наважку поміщають у колбу об'ємом 5 л, доливають 3000 мл води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 5.1 Відновлення ліофілізованої культури

До ампули з ліофілізованою колекційною культурою *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673, що зберігалась при -80°C, додають 1 мл рідкого RCM-середовища, проколюючи голкою, та залишають на 10 хв для реабсорбції, переміщують. Після відведеного часу 100 мкл готової суспензії вносять у пробірку з RCM-середовищем та інкубують в анаеробних умовах при 30°C протягом 72 год в анаеробному боксі. Процес відбувається в строго асептичних умовах.

ТП 5.2 Одержання робочої культури

З відновленої культури відбирають 100 мкл, за допомогою стерильного шприца, та вносять у нову пробірку з рідким RCM-середовищем та інкубують в анаеробних умовах при 30°C протягом 72 год в анаеробному боксі, для забезпечення стабільного росту. Процес відбувається в строго асептичних умовах.

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках.

З отриманої активної пробіркової культури відбирають 1 мл, за допомогою стерильного шприца, та вносять у нові пробірки з новим рідким RCM-середовищем. Тривалість вирощування – 72 год. Засіяні пробірки

ставлять у анаеробний бокс з температурою 30 °С. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.

У колбу об'ємом 0,75 л із 250 мл розчину композиції А в асептичних умовах вносять 250 мл розчину композиції Б. Перемішують і розливають по 100 мл в п'ять стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл. З пробірок з робочою культурою *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673, вирощеною на рідкому РСМ-середовищі, відбирають по 25 мл, за допомогою стерильного шприца, та додають у колби. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Колби закривають анаеробними пробками. Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках проводять за наступних умов: температура – 30 °С, частота обертання – 50 об/хв, час вирощування – 72 год. Після вирощування культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 4 л.

ТП 5.5. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 10 л.

В інокулятор І-1 додають 275,1 мл простерилізованої та охолодженої композиції А, асептично передають 2,5 мл охолодженого до кімнатної температури стерильного розчину композиції Б та доливають 4726 мл стерильної композиції В. Рівень рН поживного середовища контролюють за показами рН-метра і, за необхідності, доводять до значення рН 6,5 подачею стерильного 20%-го розчину гідроксиду натрію (підготовленого у ДР 3.4) трубопроводом всередину інокулятора. Посівний матеріал із засівної колби, дотримуючись правил асептики, переносять в інокулятор. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 72 год, під час вирощування у інокуляторі стерильним нітрогеном підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа.

ТП 5.6. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 0,1 м³.

В інокулятор І-2 за допомогою об'ємно-вагового дозатора ВД-3 додають 2,68 л простерилізованої та охолодженої композиції А, асептично передають 47,295 л охолодженого до кімнатної температури стерильного розчину композиції В та 0,025 л охолодженої до кімнатної температури стерильної композиції Б. Рівень рН поживного середовища контролюють за показами рН-метра і, за необхідності, доводять до значення рН 6,5 подачею стерильного 20%-го розчину гідроксиду натрію (підготовленого у ДР 3.4) трубопроводом всередину інокулятора. Засів проводиться перетискуванням стерильним

нітрогеном посівного матеріалу з інокулятора через трубу перетискання до посівного апарату. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 72 год, під час вирощування у інокуляторі стерильним нітрогеном підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа.

ТП 5.7. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 1 м³.

В інокулятор І-6 через об'ємно-ваговий дозатор ВД-7 додають 26,8 л простерилізованої та охолодженої композиції А, асептично передають 472,95 л охолодженого до кімнатної температури стерильного розчину композиції В та 0,25 л охолодженої до кімнатної температури стерильної композиції Б. Рівень рН поживного середовища контролюють за показами рН-метра і, за необхідності, доводять до значення рН 6,5 подачею стерильного 20%-го розчину гідроксиду натрію (підготовленого у ДР 3.4) трубопроводом всередину інокулятора. Засів проводиться перетискуванням стерильним нітрогеном посівного матеріалу з інокулятора через трубу перетискання до посівного апарату. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 72 год, під час вирощування у інокуляторі стерильним нітрогеном підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа.

ТП 6. Виробниче культивування.

До охолодженої до кімнатної температури від композиції А у посівному апараті Ф-9 об'ємом 6,3 м³, асептично перекачують композицію Б, та за допомогою перистальтичного насоса перекачують композицію В тієї ж температури та доводять рівень рН до рН 6,5 стерильним розчином гідроксиду натрію (підготовленого у ДР 3.4) через трубопровід. Засів проводиться перетискуванням стерильним нітрогеном посівного матеріалу з інокулятора через трубу перетискання до посівного апарату. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 72 год, корекцію рівня рН впродовж культивування проводять за допомогою титруючих агентів (підготовлених у ДР 3.4 та ДР 3.3), під час вирощування у інокуляторі стерильним нітрогеном підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа. Після 72 год культивування у посівний апарат подають стерильне повітря (0,5 м³/год), для забезпечення мікроаерофільних умов, асептично перекачують стерильну композицію Г та культивують ще 96 год за тими ж умовами до досягнення концентрації біомаси 7,5 г/л, яку визначають ваговим методом. Визначають концентрацію біомаси.

Отриману культуральну рідину передають далі на отримання цільового продукту.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1 Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1

Назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
<i>Перевірка правильності підготовки дезінфікуючих та миючих засобів</i>	ТЕА-СИЛЬ АБСК, концентрація	Перевірка концентрації; хімічний метод	Після приготування розчину	Концентрація розчину становить 5%
<i>Перевірка правильності підготовки дезінфікуючих та миючих засобів</i>	Дезактін, концентрація	Перевірка концентрації; хімічний метод	Після приготування розчину	Концентрація розчину становить 0,2%
<i>Перевірка правильності підготовки дезінфікуючих та миючих засобів</i>	Кальцинована сода, концентрація	Перевірка концентрації, температури, термометр технічний, хімічний метод	Після приготування розчину	Концентрація розчину становить 2%. Температура 20°C
<i>Перевірка на герметичність обладнання</i>	Вентилі, місця з'єднання, герметичність роботи обладнання	Перевірка тиску, манометр, годинник	Перед початком роботи та проведенням стерилізації	Тиск повинен дорівнювати 0,15–0,2 МПа
<i>Перевірка стерилізації обладнання</i>	Обладнання, температура стерилізації, час Стерилізації	Перевірка тиску, температури, манометр технічний, термометр технічний, годинник	Перед початком роботи та під час проведенням стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 125 – 130°C, КУО = 0
<i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск (температура), час витримки, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,1 МПа, t = 112°C τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

НУХТ БТЕК 05.01.06 КР ПЗ				
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата
Розробив	Колоднікова Д. І.			
Перевірив	Стабніков В.П.			
Реценз.				
Н. контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА				
		Лт.	Арк.	Аркушів
			48	66
Кафедра БТМ				

Продовження табл. 7.1

<p><i>Приготування і стерилізація композиції Г</i></p>	<p>Композиція Б Тиск (температура), час витримки, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$P = 0,8 \text{ МПа}$, $t = 120^\circ\text{C}$ $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція В Тиск (температура), час витримки, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль.</p>	<p>Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131^\circ\text{C}$ $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p><i>Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</i></p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культур</p>	<p>Годинник термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури в колбах</p>	<p>$t = 30^\circ\text{C}$, $\tau = 72 \text{ год}$, $\omega = 200 \text{ об/хв}$, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p><i>Вирощування культури в інокуляторі</i></p>	<p>Поживне середовище в інокуляторі, посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі газу, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури морфологічна відповідність організмів.</p>	<p>Датчик рН годинник термометр технічний, тахометр, витратомір, манометр, мікроскоп.</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в інокуляторі</p>	<p>$\text{pH} = 6,5$ $t = 30^\circ\text{C}$, $\tau = 72 \text{ год}$, $\omega = 200 \text{ об/хв}$, $P_{\text{надл.}} = 0,02 \text{ МПа}$.. відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Виробниче культивування</p>	<p>Поживне середовище в ферментері, культуральна рідина, Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, кратність подачі газу, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота, концентрація клітин <i>Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii</i> ATCC 13</p>	<p>Датчик рН, годинник термометр технічний, тахометр, витратомір, манометр, мікроскоп, ФЕК</p>	<p>рН визначають і регулюють після змішування всіх компонентів поживного середовища в ферментері, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирошування Мікроскопіювання – під час вирошування культури у ферментері Відбір проб культуральної рідини – кожні 8 год</p>	<p>рН=6,5 t = 30 °С, τ = 72 год, ω = 200 об/хв, Р_{надл.} = 0,02 МПа.. V = 0,5 м³/год відсутність сторонньої мікробіоти, кінцева концентрація клітин <i>Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii</i> ATCC 13 – 7,5 г/л</p>
------------------------------------	---	--	--	--

7.2 Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Контроль стерильності поживних середовищ здійснюють шляхом висіву проб простерилізованого середовища на чашки Петрі з відповідними агаризованими поживними середовищами: сусло-агар (СА) або глюкозо-картопляний агар (ГКА) – для виявлення грибів і дріжджів. М'ясо-пептонний агар (МПА) – для виявлення бактерій. Проводять мікроскопіювання.

7.3 Мікробіологічний контроль чистої культури

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопіюванням.

Для проведення мікробіологічного контролю використовують експрес метод – мікроскопіювання. Мікроскопіювання проводять за допомогою світлового мікроскопу, для чого роблять препарат «роздавлена» крапля. Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем так, щоб під ним не було пухирців повітря, і розглядають з об'єктивом 40x, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою.

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673 (рис. 5.1).

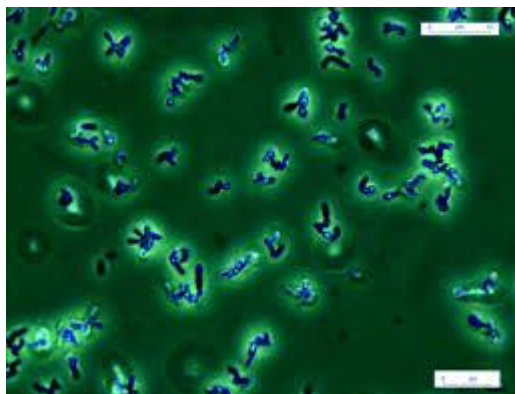


Рис. 7.1 *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673 у світловому мікроскопі

Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii ATCC 13673 можуть мати форму коротких або довгих ниток. Вони часто розташовуються поодиночці, парами або у вигляді ланцюжків. При мікроскопічному дослідженні вони добре фарбуються за методом Грама. Вони мають округлу форму, опуклу поверхню, гладенький або злегка зернистий край. Колір колоній – жовтувато-кремовий. [47]

Культуральний посів для виявлення мікроорганізмів

Культуральну рідину висівають за допомогою бактеріологічної петлі на чашки Петрі з агаризованими поживними середовищами. Для виявлення бактерій використовують м'ясо-пептонний агар (МПА), а для виявлення дріжджів та грибів – сусло-агар (СА) або глюкозо-картопляний агар (ГКА). Проводять мікроскопіювання.

7.4 Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю у середовищі виступає стахіоза, її концентрацію доречно буде визначити за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Зразок культурального середовища центрифугують при 10 000 об/хв протягом 10 хв для видалення твердих частинок. Одержаний супернатант фільтрують через мембранний фільтр (розмір пор 0,22 мкм) для забезпечення чистоти проби.

Готують серію стандартних розчинів стахіози з відомими концентраціями (10, 20, 50, 100 мг/л). Стандарти використовують для побудови

калібрувальної кривої, за якою пізніше визначають концентрацію стахіози у досліджуваних зразках.

Аналіз проводять на аніонообмінній колонці. Рухомою фазою суміш ацетонітрилу та води у співвідношенні 75:25 (за об'ємом), швидкість потоку - 1 мл/хв. Температура 30–40°C. Індикатором виступає УФ-детектор при довжині хвилі 190–210 нм. Ін'єкційний об'єм - 20 мкл.

Зразок вводять у хроматограф через автосамплер. Під дією рухомої фази компоненти суміші (зокрема, стахіоза) розділяються у колонці на основі їхньої полярності та взаємодії з нерухомою фазою. Сигнал детектора фіксується у вигляді хроматограми, де кожен пік відповідає певній речовині. Час утримування для стахіози порівнюють із часом утримування стандарту. Площу піку, що відповідає стахіозі, вимірюють і визначають концентрацію за калібрувальною кривою. [48]

7.5 Визначення концентрації джерела азоту

Джерелом азоту у поживному середовищі виступає LAPRS. Для визначення його концентрації застосовують високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) з використанням детекторів на основі УФ-випромінювання після попередньої дериватизації.

Зразок культурального середовища центрифугують при 10 000 об/хв протягом 10–15 хв для видалення клітин і нерозчинних домішок. Супернатант фільтрують через мембранний фільтр (0,22 мкм) для усунення залишкових часток.

Для підвищення чутливості аналізу LAPRS піддають дериватизації (з використанням ортофталевого альдегіду (ОФА), що дозволяє перетворити його у сполуку, здатну до УФ-детектування.

Аналіз проводиться на зворотньофазній колонці C18 (250 мм × 4,6 мм, частки 5 мкм). Рухомою фазою виступає 0,1%-ий розчин трифтороцтової кислоти (ТФК) у воді та ацетонітрил у градієнтному режимі. Швидкість потоку - 1 мл/хв, температура колонки - 30°C. УФ-детектор з довжиною хвилі 210–220 нм. Ін'єкційний об'єм - 10–20 мкл.

Стандарти цистеїну гідрохлориду готують у діапазоні концентрацій 10–100 мг/л для побудови калібрувальної кривої. Зразок культурального середовища вводять у хроматографічну систему. Після розділення компонентів суміші у колонці фіксують хроматограму. LAPRS ідентифікують за часом утримування, який порівнюють зі стандартним зразком. Для кількісного

визначення площі піку цистеїну гідрохлориду зі зразка порівнюють з площею піків стандартів за допомогою калібрувальної кривої. [49]

7.6 Визначення концентрації біомаси

Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii ATCC 13673 схильний до утворення агломератів, тому концентрацію біомаси будемо визначати методом вимірювання сухої біомаси.

Зразок культурального середовища центрифугують при 10 000 об/хв протягом 5 хв, щоб розбити агломерати. Фільтрують зразок через мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм, попередньо фільтр зважують. Переносять фільтр у сушильну шафу та висушують при температурі 105°C до сталого масового значення. Це дозволяє видалити всю вологу з органічного матеріалу. Після висушування, біомасу зважують на точних вагах. Отриману масу використовують для розрахунку концентрації біомаси. [50]

7.7 Визначення концентрації цільового продукту

Визначення концентрації цільового продукту, а саме ціанкобаламіну, будемо проводити за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з діодно-матричним детектором.

Відбирають 20 мл культурального середовища та центрифугують при 3500 об/хв протягом 15 хв за температури 4 °C для видалення твердих частинок. Одержаний супернатант промивають 0,1 М фосфатним буфером та ресуспендують у 20 мл екстракційного буфера (0,1 М фосфатний буфер, 0,1% KCN). Після цього зразок піддають термічній екстракції при температурі 121 °C на 15 хв в автоклаві. Далі екстракт знову центрифугують (3500 об/хв протягом 15 хв за температури 4 °C), відбирають супернатант та фільтрують через ацетатцелюлозні мембрани з розміром пор 0,22 мкм. До проведення аналізу заморожують при -18 °C в пляшках, що не пропускають світло (для уникнення деградації).

Готують серію стандартних розчинів ціанкобаламіну з відомими концентраціями (0,25, 1, 2, 4, 5 мг/л). Стандарти використовують для побудови калібрувальної кривої, за якою пізніше визначають концентрацію ціанкобаламіну у досліджуваних зразках.

Аналіз проводять на обернено-фазовій колонці. Рухомою фазою суміш метанолу та води у початковому співвідношенні 10:90 (за об'ємом), швидкість потоку - 1 мл/хв. Температура 30–40°C. Індикатором виступає діодно-матричний детектор при довжині хвилі 361 нм.

Зразок культурального середовища вводять у хроматографічну систему. Після розділення компонентів суміші у колонці фіксують хроматограму. Ціанкобаламін ідентифікують за часом утримування, який порівнюють зі стандартним зразком. Для кількісного визначення площу піку ціанкобаламіну зі зразка порівнюють з площею піків стандартів за допомогою калібрувальної кривої. [4]

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Проаналізувавши технологічну схему, робимо висновок щодо відходів виробництва. До газоподібних відходів відносимо відпрацьоване повітря та відпрацьований стерильний азот, так як *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673 є факультативним анаеробом. Нарощення біомаси відбувається за анаеробних умов, а власне біосинтез вітаміну B12 за мікроаерофільних.

До рідких відходів відносимо мийні та дезинфікуючі засоби, а саме 5%-ий розчин ТЕА-СІЛЬ АБСК, 0,2%-ий розчин Дезактіну, 2%-ий розчин кальцинованої соди. Також до рідких відходів виробництва відносимо супернатант, що утворюється після центрифугування культуральної рідини. Він може містити залишки поживних середовищ та біомаси, ми відносимо його до низького класу небезпеки.

До твердих відходів виробництва належить пластикова тара, в якій зберігаються мийні та дезинфікуючі засоби та компоненти поживних середовищ. Згідно з нормативними вимогами України, підприємства укладають угоди на аутсорсинг знешкодження твердих відходів. Такі підприємства повинні мати відповідну ліцензію для здійснення цієї діяльності.

					НУХТ БТЕК 05.01.06 КР ПЗ		
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Колоднікова Д. І.			Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Стабніков В.П.				55	66
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ							

Місця емісії, об'єми та шкідливість відходів, що утворюються на проєктованому виробництві

Таблиця 8.1

Тип відходів	Назва відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Стадія виробництва	Клас небезпеки
Газоподібні	Відпрацьоване повітря з ферментера	діоксид Карбону, клітини бактерій	Виробничий біосинтез	IV
	Відпрацьований азот з ферментера		Вирощування посівного матеріалу	
	Відпрацьований азот з посівного апарату			
Рідкі	5%-ий розчин ТЕА-СІЛЬ АБСК	Натрій хлорид	Дезинфекція поверхонь	III
	0,2%-ий розчин Дезактіну	Дезактин, натрій хлорид		
	2%-ий розчин кальцинованої соди	натрію гідроксид	Миття обладнання	II
	Супернатант після центрифугування культуральної рідини	залишки складових поживного середовища, залишки біомаси	подальші стадії виробництва	IV
Тверді	Пластикові тара для мийних засобів	ПЕ-поліетилен	санітарна підготовка виробництва	IV
	Пакувальні матеріали для компонентів поживного середовища	ПП-поліетилен		

8.2. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Фільтрація є одним із найважливіших процесів очищення стічних вод. При очищенні стічних вод основною метою фільтрації є отримання високоякісних стоків, щоб їх можна було повторно використовувати для різних цілей. Будь-який тип фільтра з прикріпленою біомасою до фільтруючого середовища можна визначити як біофільтр. Це може бути краплинний фільтр у станції очищення стічних вод, або горизонтальний кам'яний фільтр у забрудненому потоці, або гранульоване активоване вугілля чи піщаний фільтр у станції очищення води. Біофільтр успішно використовується для очищення повітря, води та стічних вод. Незалежно від різних назв, які зазвичай дають залежно від режиму роботи, основний принцип біофільтра однаковий: біодеградація забруднюючих речовин мікроорганізмами, прикріпленими до фільтруючого середовища.

Економічна та ефективна робота біофільтра значною мірою залежить від характеристик фільтруючого середовища. Для очищення первинних стічних вод правильним вибором фільтруючого середовища може бути доменний шлак, граніт або синтетичне середовище залежно від об'єму стічних вод.

Біофільтрація включає проходження стічних вод через фільтруючий матеріал, на якому ростуть мікроорганізми, що обробляють органічні сполуки, які містяться в стічних водах. Цей процес можна порівняти з природними біологічними процесами, що відбуваються в природних екосистемах, але в контрольованих умовах.

Основні етапи роботи біофільтра. Поступлення стічних вод — стічні води подаються на верхній рівень біофільтра, де вони рівномірно розподіляються по всій поверхні фільтруючого матеріалу. Проходження через фільтруючий матеріал — вода рухається через пори фільтруючого матеріалу (це може бути пісок, гравій, керамічні або пластикові елементи). В процесі цього проходження органічні забруднювачі засвоюються мікроорганізмами, які знаходяться на поверхні фільтруючих матеріалів. Метаболізм мікроорганізмів — мікроорганізми, зазвичай бактерії та гриби, розкладають органічні сполуки (вуглець, азот, фосфор), перетворюючи їх на менш шкідливі сполуки, такі як вода, вуглекислий газ та інші продукти метаболізму. Виведення очищених вод — після проходження через біофільтр очищена вода

виводиться в очищеному вигляді для подальшого використання або скиду в природні водойми. [51]

Для очищення стічних вод ми обираємо високопродуктивний пасивний біофільтр, що складається з фільтруючого матеріалу, на поверхні якого росте біологічна плівка. Ця плівка складається з різних мікроорганізмів, які здатні поглинати і розкласти органічні забруднювачі.

Оскільки цей біофільтр працює пасивно, для його роботи не потрібне додаткове енергетичне забезпечення, таке як насос або система аерації. Вода подається в біофільтр за допомогою природного потоку або завдяки гравітації, що дозволяє досягти енергоефективності та мінімальних витрат на експлуатації. Також однією з особливостей цього типу біофільтра є наявність біологічної плівки, яка утворюється на поверхні фільтруючого матеріалу. Вона складається з різних видів мікроорганізмів, які розкладають органічні сполуки і токсичні речовини, що знаходяться в стічних водах. Біофільтри з біологічними плівками є дуже ефективними для очищення води від органічних забруднень, таких як аміак, сірководень, феноли та інші токсини.

Один з найбільш популярних типів біофільтрів, який використовується для очищення стічних вод — це "Biokube" (рис.8.1). Цей біофільтр є прикладом високопродуктивного пасивного біофільтра, який здатний ефективно очищати воду за допомогою біологічного процесу. Матеріал фільтруючого елемента: гравій або пластикові елементи, що покриваються біологічною плівкою. [52]

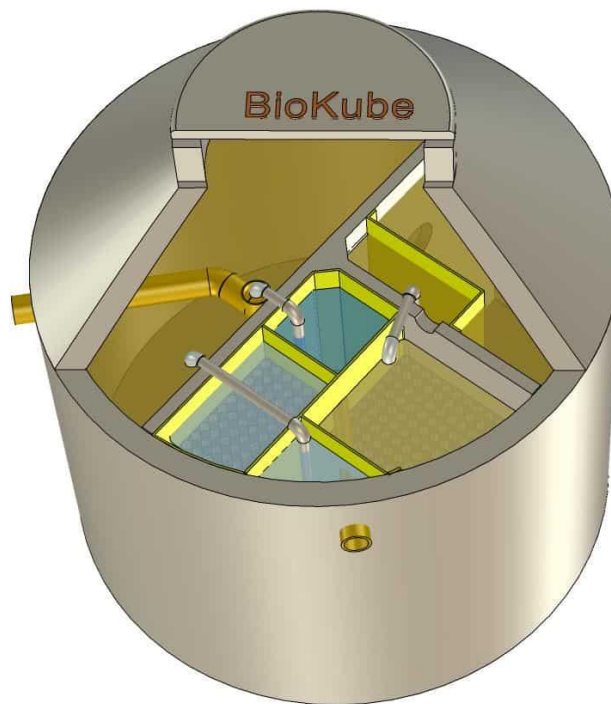


Рис. 8.1 BioKube

8.3 Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Для утилізації твердих відходів ми будемо використовувати метод утилізації з використанням полімервмісних відходів як вторинної сировини. В такому разі майже повністю використовуються всі властивості полімерів.

Спочатку тверді відходи проходять сортування за вихідними полімерами їх поділяють на види, а за характеристикою полімерних відходів – на групи. Першою стадією переробки твердих відходів з використанням вторинної сировини є подрібнювання, для якого використовують валкові дробарки та подрібнювачі. Наступною стадією переробки є змішування. Безперервне змішування здійснюють на вальцях безперервної дії. Подрібнені тверді відходи шнековим транспортером подаються на гарячу мийку, а після цього на фрикційну мийку. Після промивання та видалення основної вологи вже подрібнена сировина сушиться та подається в екструдер, який формує стренги, що після охолодження подрібнюються та в вигляді гранул подаються у бункер-нагромаджувач. Залежно від складу та стану вихідної сировини ця схема може бути змінена.

Біотехнологічне виробництво зазвичай не має власного обладнання для утилізації, оброблення або видалення відходів, тоді доцільним є укладання

договорів із підприємством, що має ліцензію на здійснення операцій з небезпечними відходами. Мікробну біомасу знищують шляхом спалювання. [53]

8.4. Система знешкодження газоповітряних викидів

Очищення газоповітряних викидів будемо проводити фотокаталітичним методом. Суть цього методу полягає у окисненні домішок на поверхні фотокаталізатора під впливом ультрафіолетового випромінювання (рис 8.2). Фотокаталітичні процеси, що протікають, дозволяють вирішити проблему розкладення токсичних органічних та неорганічних сполук в газових викидах.

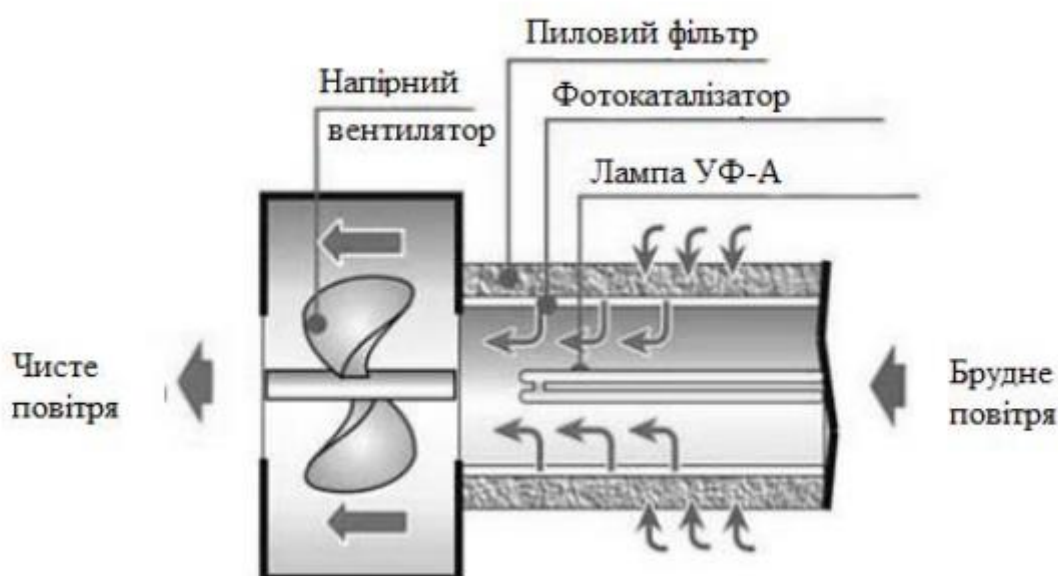


Рис. 8.2 Очищення повітря фотокаталітичним методом

На поверхні TiO_2 можуть бути окислені до CO_2 і H_2O практично будь-які органічні сполуки. Будь-який фотокаталітичний очищувач повітря містить пористий носій із нанесеним TiO_2 , який опромінюється світлом та продувається повітрям. Органічні молекули із потоку адсорбуються на поверхні фотокаталізатора, що нанесений на фотокаталітичний фільтр, і окислюють до вуглекислого газу і води під дією УФ-світла. Очищувач поміщують у замкнутий простір, туди ж додають ацетон. Спостереження ведуть за втрати ацетону і накопичення CO_2 . Фактично фотокаталіз дає унікальну можливість окислювати органічні сполуки у м'яких умовах. Наразі

фотокаталітичні фільтри випускають такі відомі фірми, як "Toshiba", "Sharp", "ТОТО". [54]

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біологічна хімія / Ю. І. Губський // «Укрмедкнига» - 2000.
2. Вітаміни / Г. В. Донченко, Ю. М. Пархоменко // Енциклопедія Сучасної України - Інститут енциклопедичних досліджень НАН України, 2005.
3. Vitamin B12 deficiency / Shipton, M. J., & Thachil, J. // A 21st century perspective. *Clinical Medicine*, 2015. doi:10.7861/clinmedicine.15-2-145
4. Biosynthesis of vitamin B 12 by *Propionibacterium freudenreichii Subs p. shermanii* ATCC13673 using liquid acid protein residue of soybean as culture medium /D. A. Assis, C. Matte, B. Aschidamini, E. Rodrigues, M. A. Záchia Ayub/ *Biotechnology Progress*, 2020. doi:10.1002/btpr.3011
5. *World Health Organization* The International Pharmacopoeia // Sixth Edition, 2016
6. *Norwegian Institute of Public Health* WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology Електронний ресурс. Режим доступу [https://atcddd.fhi.no/atc_ddd_index/?code=B03B&showdescription=no]
7. Шляхи вдосконалення стадії біосинтезу в технології вітаміну B12 на основі бактерій роду *Propionibacterium*/ Кривчук К.Т./ КПІ ім. Ігоря Сікорського/ УДК 579.663 – 2022
8. Improved propionic acid and 5,6-dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B12 fermentation by *Propionibacterium freudenreichii*./ P. Wang, Z. Zhang, Y. Jiao, S. Liu, Y. Wang/ *Journal of Biotechnology*, 193, 123–129. 2015. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.11.019
9. Microbial production of vitamin B₁₂: a review and future perspectives/ H. Fang, J. Kang, D. Zhang/ *Microbial Cell Factories*, Article number: 15 (2017)
10. Microbial and Genetic Resources for Cobalamin (Vitamin B₁₂) Biosynthesis: From Ecosystems to Industrial Biotechnology/ L. Balabanova, L. Averianova, M. Marchenok, O. Son, L. Tekutyeva/ *International Journal of Molecular Science*. 2021 May; 22(9): 4522. doi: 10.3390/ijms22094522
11. V. R. Rodvalho, D. L. N. Rodrigues, G. Jan, Y. Le Loir, V. A. de Carvalho Azevedo, E. Guédon *Propionibacterium freudenreichii*: General Characteristics and Probiotic Traits // *Prebiotics and Probiotics - From Food to Health*, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.97560
12. Deborde, C. *Propionibacterium* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2330–2339, 2002. doi:10.1016/b0-12-227235-8/00718-5

13. Thierry, A., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Dalmaso, M., Cousin, F. J., Jan, G. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. International Journal of Food Microbiology, 149(1), 19–27. 2011 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04

14. U.S. Department Of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service Електронний ресурс. Режим доступу: [<https://acir.aphis.usda.gov/s/cird-taxon/a0u3d000000LmDRAA0/propionibacteriumshermanii>]

15. Тигаренко А.А. Проблеми лікування волосся. The XVI International Scientific and Practical Conference «Innovative trends of science and practice, tasks and ways to solve them», April 26 – 29, 2022, Athens, Greece. 799 p. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.researchgate.net/profile/Olha-Maiboroda/publication/360430730_The_HVI_International_Scientific_and_Practical_Conference_Innovative_trends_of_science_and_practice_tasks_and_ways_to_solve_them_April_26_-_29_2022/links/6275bea0107cae2919901ee8/The-HVI-International-Scientific-and-Practical-Conference-Innovative-trends-of-science-and-practice-tasks-and-ways-to-solve-them-April-26-29-2022.pdf#page=556

16. Tasawar Iqbal, Sidra Altaf, Ali Ahmad, Husnain Riaz and M.Waseem Zulifqar. Multivitamins and Minerals are used for the Treatment of Hair Loss. Minerals are used for the Treatment of Hair Loss. 2(9): 9-10. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://biologicaltimes.com/wp-content/uploads/journal/published_paper/volume-2/issue-9/ВТ_2023_800730.pdf

17. Давтян Л.Л., Наумова М.І., Коритнюк Р.С., Дроздова А.О., Оліфірова Т.Ф., & Наумова Л.О.. Використання превентивних засобів задля попередження випадіння волосся у воєнний час. World Scientific Reports, -2023, (4). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ojs.scipub.de/index.php/WSR/article/view/2268>

18. Katsogridaki, G., Tzovaras, G., Sioka, E., Perivoliotis, K., Zachari, E., Magouliotis, D., Zacharoulis, D. (2018). Hair Loss After Laparoscopic Sleeve Gastrectomy. Obesity Surgery. [Електронний ресурс]. Режим доступу: doi:10.1007/s11695-018-3433-3

19. Deepashree Daulatabad, Archana Singal, Chander Grover, and Neelam Chhillar. Prospective Analytical Controlled Study Evaluating Serum Biotin, Vitamin B12, and Folic Acid in Patients with Premature Canities. Int J Trichology. 2017 Jan-Mar; 9(1): 19–24. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5514791/>.

20. Ji Qi and Luis A. Garza. An Overview of Alopecias. Cold Spring Harbor Laboratory Press. -2014. P. 1-14. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/4/3/a013615.short>

21. Башура О.Г. Етапи становлення спеціальності Технології парфумерно-косметичних засобів» в Україні. «Косметологія та ароматологія: етапи становлення і майбутнє», -2018. С. 3-5. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/16663/1/3-5.pdf>

22. Казакова І.С., Лебединець В.О. Актуальність впровадження систем управління якістю на підприємствах з виробництва косметичних засобів. «Матеріали міжнародної науково-практичної дистанційної конференції», - 2020. С. 82-86. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/22644/1/ATL-20-03-20-Book-2%281%29.pdf>

23. В. А. Солодовник. Розробка складу, технології і дослідження м'якої лікарської форми з піроктон оламіном та нафталаном знесмоленним для терапії і профілактики себорейного дерматиту волосистої частини голови. Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії. Запорізький державний медичний університет. – 2021. С. 56. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://zsmu.edu.ua/upload/updisert/dfpharm/211029_solodovnik_va_disertasia.pdf

24. Antonio José Guillot, Pablo Merino-Gutiérrez, Andrea Bocchino, Conor O'Mahony, Rosa Maria Giner, Maria Carmen Recio, Teresa Maria Garrigues, Ana Melero, Exploration of Microneedle-assisted skin delivery of cyanocobalamin formulated in ultraflexible lipid vesicles, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Volume 177, 2022, Pages 184-198, [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.06.015>.

25. US6110472A. Vitamin B12 containing scalp and skin treatment compositions. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/US6110472A/en>

26. Жамалі Карім, Н. О. Ткаченко, В. В. Гладишев, С. Є. Рижкова. Дослідження вітчизняного ринку засобів на основі міноксидилу та його похідних, що використовуються при алопеції. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. -Том 12, № 3(31), вересень – грудень 2019 р. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/12368/1/15_425_Zhamali%20Karim_Tkachenko_et_all.pdf

27. Жданова Д. Г., Грицук О. І., Цісак А. О. Маркетингове дослідження ринку лікарських засобів для лікування себорейного дерматиту в Україні. Хіміжнародна науково-практична дистанційна конференція «Менеджмент та маркетинг у складі сучасної економіки, науки, освіти, практики». (м. Харків, 21 березня 2024 р.). [Електронний ресурс]. Режим доступу:

https://www.researchgate.net/profile/Abror-Rakhimov-2/publication/379777246_MATERIALI_XI_MIZNARODNOI_NAUKOVO-PRAKTICNOI_DISTANCIJNOI_KONFERENCII_m_Harkiv_21_berezna_2024_r/links/66195ce839e7641c0bbaf800/MATERIALI-XI-MIZNARODNOI-NAUKOVO-PRAKTICNOI-DISTANCIJNOI-KONFERENCII-m-Harkiv-21-berezna-2024-r.pdf#page=425

28. Дорошенко О.П. Розробка технології пасти для лікування себореї в військово-польових умовах. Університет ім. Богомольця. 2023 рік. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://ir.librarynmu.com/bitstream/123456789/12210/3/Дорошенко%20Олександр%20Петрівна.pdf>

29. Deborde, C. *Propionibacterium* spp. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2330–2339, 2002. doi:10.1016/b0-12-227235-8/00718-5

30. K. Piwowarek, E. Lipińska, E. Hać-Szymańczuk, M. Kieliszek, I. Ścibisz *Propionibacterium* spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry/ Appl Microbiol Biotechnol. 2017 Nov 22;102(2):515–538. doi: 10.1007/s00253-017-8616-7

31. Ю.В. Карлаш, Є. О. Омельчук, Основи проектування біотехнологічних виробництв. Конспект лекцій/ Київ НУХТ 2019, стор. 44 – 50

32. Biostat Cplus. Ферментер-біореактор об'ємом 10 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sartorius.com.ua/ru/fermentory-i-bioreaktory/sterilizuemye-na-meste-fermentery-bioreaktory-cip/biostat-cplus/>

33. Shanghai Ritai. Автоматичний пілотний біореактор об'ємом 100 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ritai-bioreactor.com/ru/продукт/автоматизированный-пилотный-биореак/>

34. Дозатор ваговий сипучих продуктів F-5000. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://packhouse.com.ua/ua/p1114001611-dozator-vesovoj-sypuchih.html>

35. Насос перистальтический МР-6118.12. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-6/

36. Насос-дозатор "Exactus", 20 л/год, 5 бар. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://more-doma.com.ua/ua/nasos-dozator-exactus-20-l-ch-5-bar-ruchnoe-upravlenie/?srsltid=AfmBOopdnQE7gdNSykFp-qWrNWNjZEyxw72oUPJthcd64yx53qHl6RM>

37. Stainless Steel Microbial Fermenter INOFE-JS. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.innovabiomed.com/stainless-steel-microbial-fermenter.html>

38. Ваговий дозатор ВДСВ-3. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://abctech.com.ua/ua/p839395510-vesovoj-dozator-pellety.html>

39. Мембранний пневматичний насос Yamada NDP-20BST-PP. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pumpcentre.com.ua/ua/membrannyj-pnevmaticheskij-nasos-yamada-ndp-20bst-pp/>

40. Дозатор-змішувач води Polin DOSER FULL MIX. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://epicentrk.ua/ua/shop/dozator-zmishuvach-vody-polin-doser-full-mix.html>

41. Cover Lift Stainless Steel Fermenter Bioreactor 6,3 м³. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://china-fermenter.com/product/cover_lift_stainless_steel_fermenter_bioreactor

42. Дозатор ваговий автоматичний шнековий ДВП-3. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://asvik.kiev.ua/ua/catalog/group/product/28>

43. Дозатор води DOSAMAT 1P. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://horecaua.com.ua/ru/dozator-vody-dosamat-1p-cool-water/32287/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwpvK4BhDUARIsADHt9sRHAIrh7uZqGS-iSgxJKJa_JtqfTTCQTIWJ0b_30vRjcw1V2EjrK94aAgn-EALw_wcB

44. Збірник для змішування компонентів. Wise Master. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://agrovektor.com.ua/physical_product/1004855-sbornik-dlya-smeshivaniya-komponentov-05-m3-nerzhavayushaya-stal.html

45. Реактор об'ємом 6 м³. Labfirst Scientific Instruments (shanghai) Co., Ltd. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Industrial-Scale-Fed-Batch-Bioreactor-200001_1600993010009.html?s=p&spm=a2706.7843667.0.0.2dab5737uWGQL6

46. Ваговий дозатор пелети 1-15 кг ВДСВ-3 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://abctech.com.ua/ua/p839395510-vesovoj-dozator-pellety.html>

47. A. Parte, W. B. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, M. E. Trujillo, W. Ludwig, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009). The Actinobacteria. Volume 5.

48. Smith, P. W., & Harris, R. K. "Quantitative analysis of oligosaccharides using HPLC." Journal of Carbohydrate Research, 2012, 47(3), 253-258.

49. Kiss, A. "HPLC determination of amino acids using precolumn derivatization with o-phthalaldehyde." *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(19), 2618–2624.

50. B. Sonnleitner, G. Locher, A. Fiechter Biomass determination, *Journal of Biotechnology* Volume 25, Issues 1–2, August 1992, Pages 5-22
[https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90107-K](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90107-K)

51. Chaudhary, D. S., Vigneswaran, S., Ngo, H.-H., Shim, W. G., & Moon, H. (2003). Biofilter in water and wastewater treatment. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 20(6), 1054–1065. doi:10.1007/bf02706936

52. BioKube Wastewater Technologies [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.biokube.com/biokube-wastewater-technology/>

53. І. О. Мікульонок *Обладнання і процеси переробки термопластичних матеріалів з використанням вторинної сировини / «ПОЛІТЕХНІКА» Київ 2009*

54. О. В. Галак, М. Д. Сахненко, Г. В. Каракуркчі, О. В. Матикін, О. В. Косарев, І. О. Белоусов *Методи очищення газових викидів від хімічно-небезпечних речовин для підвищення ефективності фільтрувальних систем / УДК 623.459.7, 2018*



RESEARCH ARTICLE

BIOTECHNOLOGY
PROGRESS

Biosynthesis of vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 using liquid acid protein residue of soybean as culture medium

Dener Acosta de Assis | Carla Matte | Bruno Aschidamini | Eliseu Rodrigues |
Marco Antônio Záchia Ayub Biotechnology & Biochemical Engineering
Laboratory (BiotecLab), Food Science and
Technology Institute, Federal University of Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil**Correspondence**Marco Antônio Záchia Ayub, Biotechnology &
Biochemical Engineering Laboratory
(BiotecLab), Food Science and Technology
Institute, Federal University of Rio Grande do
Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box
15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS,
Brazil.
Email: mazayub@ufrgs.br**Funding information**Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico, Grant/Award
Number: 442516/2014-2; Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do
Rio Grande do Sul, Grant/Award Number:
18/2551-0000495-2**Peer Review**The peer review history for this article is
available at <https://publons.com/publon/10.1002/btpr.3011>.**Abstract**

Vitamin B12 deficiency still persists, mainly caused by low intake of animal food products affecting vegetarians, vegans, and populations of underdeveloped countries. In this study, we investigate the biosynthesis of vitamin B12 by potential probiotic bacterium using an agroindustry residue, the liquid acid protein residue of soybean (LAPRS), as a low-cost, animal derivate-free alternative culture medium. Cultures of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 growing in LAPRS for vitamin B12 biosynthesis were studied using the Plackett–Burman experimental approach, followed by a central composite design 2^2 to optimize the concentration of significant variables. We also performed a proteolytic treatment of LAPRS and evaluated the optimized-hydrolyzed medium influence on the microbial growth and metabolism in shaker flask and bioreactor experiments. In this all-plant source medium, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* produced high concentrations of cells and high amounts of vitamin B12 (0.6 mg/g cells) after process optimization. These results suggest the possibility of producing vitamin B12 by a potential probiotic bacterium in a very cheap, animal derivate-free medium to address the needs of specific population groups, at the same time reducing the production costs of this essential vitamin.

KEYWORDSagroindustry residues, bioprocess, liquid acid protein residue of soybean, *Propionibacterium freudenreichii*, vitamin B12

1 | INTRODUCTION

The vitamin B12 (cyanocobalamin), has the most complex chemical structure among vitamins. It is a cofactor of the enzymes (R)-methyl malonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) and methionine synthase (EC 2.1.1.13), in the human organism. These enzymes have an important role in the metabolism of fatty acids and amino acids. The action of methionine synthase is indirectly associated with DNA synthesis.¹ Because of this, vitamin B12 deficiency leads to the development of megaloblastic anemia and neurological problems, such as changes in

mood and behavior, psychosis, and dementia.² Humans are unable to synthesize cobalamin, obtaining this vitamin exclusively through diet. Cobalamin deficiency occurs due to three main reasons¹: Problems related to malabsorption of this micronutrient²; low intake of food of animal origin³; gastrointestinal infections caused by microorganisms such as *Helicobacter pylori*.³

On the other hand, vegetarians, vegans, and populations of underdeveloped countries with inappropriate diets are also groups of people susceptible to dietary vitamin B12 deficiency, even when no clinical issues are present.² Several studies have been developed in

recent years aiming at offering alternative sources of vitamin B12 to meet the nutritional demands of these populations.^{4–6} Food fortification is one of the alternatives to increase the nutritional value of food products and to reduce the problems caused by the lack of micro-nutrients, including vitamin B12.⁷ Another approach that has been researched is the direct addition of microorganisms, specially lactic acid bacteria, to foods, or through the fermentation of food itself (food bioenrichment).⁸

The most commonly used microorganisms to produce vitamin B12 are *Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium freudenreichii*, and *Bacillus megaterium*.⁹ *P. freudenreichii* is particularly interesting for food applications due to its efficient B12 production, associated with the fact that this is a Generally Recognized as Safe (GRAS) bacterium by the USA Food and Drug Administration agency.⁶ Furthermore, recent studies with *P. freudenreichii* have shown that this bacterium presents probiotic characteristics, such as resistance to gastrointestinal conditions, adhesion capacity on epithelial cells, modulation of gut microbiota, and immunomodulation.¹⁰ Thus, this potential probiotic microorganism is a promising option for food bioenrichment with vitamin B12.^{6,11,12}

Another interesting factor regarding the use of this microorganism is the possibility of producing vitamin B12 using alternative culture media composed of agroindustry residues. These substrates are available in huge amounts, have very low added values, but are nutrient-rich for microbial growth (carbohydrates, proteins, and minerals).^{13–16} One residue of particular interest in this case is the liquid acid protein residue of soybean (LAPRS), which is obtained as an effluent during the soybean-isolated protein process (SIP). For instance, one single industrial facility for SIP production generates approximately 50,000 m³ of LAPRS monthly.¹⁷

The LAPRS is composed mainly of carbohydrates and proteins and poses an extremely high biochemical oxygen demand (> 20,000 mg O₂ L⁻¹).¹⁸ Due to this, it cannot be disposed of directly into the environment, requiring an expensive effluent treatment, which is economically undesirable.¹⁷ However, LAPRS has been reported to be an effective growth medium to produce probiotic bacteria and their main product, the lactic acid.¹⁹ So far, there have been no reports about vitamin B12 production using LAPRS.

Taking into consideration these aspects, we set an investigation to test the biosynthesis of vitamin B12 by *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673, a GRAS bacterium, using LAPRS as culture medium. The production of the vitamin was tested and optimized using an experimental design. This approach could lead to one of the sole cases of vitamin B12 production and vehiculation in foods completely animal-free in its composition.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Reagents and chemical standards

The analytical standard of vitamin B12 (cyanocobalamin) >99% of purity was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Mobile

phases used in the high performance liquid chromatography (HPLC) were composed of Milli-Q water (Millipore System, EUA) and methanol HPLC grade purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents used in this study were of analytical grade, obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).

2.2 | Microorganisms and samples

The microorganism used was *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673, which is a commercial strain purchased from André Tosello Foundation (Campinas, SP, Brazil). The liquid acid residue protein of soybean (LAPRS) was kindly donated by the Dupont Company (Esteio, RS, Brazil). It was collected, transported, and concentrated as described in the previous studies.¹⁷

2.3 | Chemical composition of LAPRS

The analyses of total sugars, comprised mainly of stachyose, sucrose, raffinose, glucose, galactose, and fructose, and proteins of LAPRS were carried out following the Adolfo Lutz Institute Protocols.²⁰ Minerals (potassium, phosphorus, manganese, magnesium, sodium, sulfur, iron, calcium, and cobalt) were analyzed by atomic absorption spectrometry through direct evaluation on optical emission spectrometer ICP-OES optima model 8,300 (Perkin Elmer, EUA).²¹ Osmotic pressure was measured using a water pressure osmometer equipment, model Vapro 5,520 (Logan, EUA).²²

2.4 | Inocula and growth conditions

The stock cells and preinocula for cultivations of *P. freudenreichii* were prepared using B12-free medium, which is B12-free. The medium was composed of Glucose, 20 g/L; yeast extract, 20 g/L; sodium lactate, 13 g/L; tween, 0.1 g/L; manganese sulfate, 0.02 g/L; magnesium sulfate, 0.2 g/L; cysteine chloride, 0.5 g/L; cobalt chloride, 15 mg/L; 5,6-dimethylbenzimidazole (DMBI), 15 mg/L; phosphate buffer 1 M, 100 ml/L, the pH adjusted to 6.5 before sterilization (121°C, 15 min).

Cell growth was performed in Erlenmeyer flasks (50 ml) filled with 27 ml LAPRS and purged with sterile nitrogen to promote anaerobic conditions. The flasks were inoculated with 10% volume of a pre-culture (optical density [OD]₆₀₀ = 1) and the microorganism was grown at 30°C, anaerobically, for 72 hr. After that, DMBI was added and the following 96 hr of growth was conducted under microaerophilic condition at 30°C and 180 rpm.²³

2.5 | Influence of LAPRS supplementation on vitamin B12 biosynthesis

A Plackett-Burman experimental design was used to evaluate the influence of LAPRS supplementation on vitamin B12 biosynthesis by

P. freudenreichii subsp. *shermanii*. The experimental design was composed by eight real variables and three dummy variables tested in two levels with three replicates in the central point to measure the experimental error (Table 1). All 12 independent experiments and the extraction process were conducted as described by Hugenschmidt et al.²³ and Mohammed et al.²⁴ respectively.

2.6 | Optimization of vitamin B12 biosynthesis in LAPRS

After finding the significant variables on vitamin B12 biosynthesis, an optimization experimental design was performed applying central composite design 2². The design was composed by two independent variables tested in two levels, two axial points, and three replicates at central point to measure the experimental error (Table 2). The eight independent experiments were supplemented with iron sulfate (30 mg/L) and DMBI (30 mg/L). The culture and extraction process were conducted as described by Hugenschmidt et al.²³ and Mohammed et al.²⁴ respectively.

2.7 | Growth kinetics of *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673 on optimized LAPRS

After data analysis of response surface generated by central composite design 2², growth kinetics was performed under the best conditions for B12 biosynthesis by *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. In this experiment, LAPRS was supplemented with (in mg/L): Cobalt chloride, 250; cysteine chloride, 1,200; iron sulfate, 30 before inoculating and DMBI, 30 after 72 hr of growth. The culture process and extraction were conducted as described by Hugenschmidt et al.²³ and Mohammed et al.²⁴ respectively.

2.8 | Influence of LAPRS enzymatic treatment on *P. shermanii* ATCC 13673 growth kinetic

The treatment of LAPRS medium with a proteolytic enzyme (Alcalase) was applied to avoid protein precipitation that could make this

nitrogen source unavailable to *P. shermanii*. The pH of LAPRS was adjusted to pH 8.5 with NaOH and the catalytic reaction was conducted for 3 hr, 55°C, using 10 ml/L of Alcalase 2.4 L (Novozymes, Latin America, Brazil), following procedures described by Rech et al.²⁵ After the enzymatic treatment, the pH of hydrolyzed LAPRS medium was adjusted to 6.5 and sterilized at 121°C, 15 min. The LAPRS medium was supplemented with the same components described in Section 2.7 and the microorganism growth conditions were kept the same as described by Hugenschmidt et al.²³

2.9 | Growth kinetics of *P. shermanii* ATCC 13673 in stirred tank bioreactor

This experiment was carried out in 2 L stirred tank bioreactors (Biostat B, B. Braun Biotech International, Germany) operated with 1.35 L of LAPRS medium treated with Alcalase. The LAPRS medium was sterilized at 121°C, 15 min in the bioreactor tank and, before inoculating, it was purged with sterile nitrogen to promote anaerobic conditions and supplemented with components described in Section 2.7. Bioreactor cultures were inoculated with a volume of 10% of cell suspension (concentration 1.0 OD, ABS 600 nm). Culture conditions were 30°C, 200 rpm, and pH controlled at 6.5 by adding NaOH 5 M. Cell growth kinetics was divided in two stages, initially 72 hr under anaerobiosis, followed by 96 hr under microaerophilic conditions, by keeping aeration rate at 0.5 vvm.

TABLE 2 Variables and levels of central composite design 2² to test supplementation of LAPRS as substrate to synthesize vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*

Level	Real variables	
	Cobalt chloride (mg/L)	Cysteine chloride (mg/L)
-1.41	50	250
-1	79.08	526.24
0	150	1,200
1	220.92	1873.76
1.41	250	2,150

Abbreviation: LAPRS, liquid acid protein residue of soybean.

TABLE 1 Variables and levels of the Plackett–Burman experimental design to test supplementation of LAPRS as substrate to synthesize vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*

Level	Real variables							
	Yeast extract (g/L)	Tryptone (g/L)	Potassium phosphate (g/L)	Cysteine chloride (mg/L)	Iron phosphate (mg/L)	Glutamic acid (mg/L)	Cobalt chloride (mg/L)	DMBI (mg/L)
-1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	5	5	2.5	250	15	15	15	15
1	10	10	5	500	30	30	30	30

Abbreviations: DMBI, 5,6-dimethylbenzimidazole; LAPRS, liquid acid protein residue of soybean.

2.10 | Vitamin B12 analysis

A volume of 20 ml of fermented medium was centrifuged (4°C, 3,500 g, 15 min), the cellular pellet was washed using phosphate buffer (0.1 M, pH 7) and resuspended in 20 ml of extraction buffer (phosphate 0.1 M; KCN, 0.1% weight fraction; pH 4.5). Extracts were placed in amber bottles and frozen (-18°C) until the extraction process. The extraction was performed using wet heat (121°C, 15 min) in autoclave (Phoenix, Brazil). After this process, the extract was centrifuged and the supernatant was collected, filtered through acetate cellulose membranes (0.22 µm) and frozen (-18°C) until HPLC-DAD analysis.

The B12 quantification was performed by HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with pumps (LC-20 AD), auto-sampler (SIL-20A), C18 column Shimadzu (4.6 mm × 250 mm, 5 µm particle size), oven (CTO-20A), and diode array detector (SPD-M20A). Chromatographic runs were performed using gradient elution of water: Methanol and chromatograms were processed at 361 nm.²⁴

A validation process was performed to ensure the reliability of results through analysis of performance parameters like linearity ($R^2 > .99$), limit of detection (0.07 mg/L), limit of quantification (0.21 mg/L). These parameters were obtained from five independent analytical curves of cyanocobalamin standard (0.25–5 mg/L).

2.11 | Biomass and organic acids analyses

Biomass was gravimetrically measured and defined as dry weight cells, whereas the concentration of organic acids was analyzed by HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with pumps (LC-20 AD), auto-sampler (SIL-20A), refractive index detector (RID-10A), and Bio-Rad HPX-87H column (300 × 7.8 mm and 5 µm particle size). Chromatographic runs were performed with H₂SO₄ 5 mM solution as mobile phase, rate flow of 0.8 ml/min, oven temperature set at 65°C and 20 µl of injection volume.¹⁹

2.12 | Statistical analysis

Statistical analysis (analysis of variance) of experimental design was performed using software Statistica 10.0 (StatSoft, EUA). For other statistical analyses, Microsoft Excel 2010 was used.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Chemical composition of LAPRS

The concentrate LAPRS showed high content of sugars (51 g/L) (Table 3). A qualitative profile of sugars was defined in the HPLC-RID system. We found that stachyose, raffinose, and sucrose are the main carbohydrates in LAPRS followed by smaller amounts of glucose, galactose, and fructose (Figure S1). The presence of these sugars is the characteristic of soybean by-products and has been reported in previous works.¹⁹

TABLE 3 Physicochemical characteristics of LAPRS (concentrated to 25% of its original volume in the sampling point at factory)

Parameter	Result
pH	4.60 ± 0.21
Total sugars (g/L) ^a	51.45 ± 3.29
Lactic acid (g/L)	1.27 ± 0.12
Proteins (g/L)	12.00 ± 0.02
Minerals (mg/L)	
Potassium (K)	5,478.15 ± 0.64
Sodium (Na)	405.68 ± 0.21
Calcium (Ca)	196.69 ± 0.36
Phosphorus (P)	527.23 ± 0.43
Sulfur (S)	208.37 ± 0.61
Magnesium (Mg)	370.05 ± 0.87
Manganese (Mn)	4.33 ± 0.54
Iron (Fe)	2.75 ± 0.44
Cobalt (Co)	ND ^b
Osmotic pressure (mmol/kg)	500 ± 2.05

Abbreviation: LAPRS, liquid acid protein residue of soybean.

^aSugars identified by HPLC were: Stachyose, raffinose, sucrose, glucose, galactose, and fructose (Figure S1). The amount of each sugar, individually, was not determined.

^bNot detected (limit of detection for cobalt ions was 0.0003 mg/L).

Protein content of concentrated LAPRS (12 g/L) is interesting for bioprocess. This protein is composed mainly of low-weight soy proteins that were not recovered in the precipitation process of soybean protein isolation.¹⁷ However, soybean proteins are known to have a low content of cysteine amino acids, which is important to microbial cellular structures production.²⁶ Thereby, the influence of supplementation of LAPRS with this specific amino acid was performed in our study.

Another interesting result is that several minerals necessary to support microbial growth such as phosphorous, iron, and calcium were found in the LAPRS composition. In contrast, we noted the absence of cobalt ion, which is essential for vitamin B12 biosynthesis.²⁷ Therefore, the influence of cobalt supplementation of LAPRS was also evaluated in this work.

The osmotic pressure of concentrated LAPRS was low, thus considered suitable to enable microbial growth.²⁸ The low pH of LAPRS was expected because, during the soybean coagulation process, acid is used to promote protein precipitation,¹⁷ requiring that the pH of LAPRS should be adjusted (6.5) before each growth experiment.

3.2 | Influence of LAPRS supplementation on B12 biosynthesis by *P. freudenreichii*

The experimental design matrix and the results of vitamin B12 biosynthesis by *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 are presented in Table 4. The highest vitamin B12 specific yield was achieved in

experiment 8, where the specific yield reached 0.29 mg/g cell. Cobalt chloride and DMBI were the significant variables and both showed positive effects (Table 5).

The availability of cobalt chloride ions in the culture medium is essential to vitamin B12 biosynthesis because it is a central component of the corrinoid ring.²⁷ Therefore, we run an additional experimentation to optimize the cobalt chloride concentration supplemented in LAPRS.

DMBI is also a structural moiety of active forms of vitamin B12, linked as an inferior ligand to the cobalt ion. *P. freudenreichii* carry the gene *BluB/CobT2*, necessary to DMBI synthesis in the presence of flavin mononucleotide and molecular oxygen.²⁹ However, supplementation of the culture medium with DMBI has been reported to promote vitamin B12 biosynthesis, as we also observed in our study.²⁰

It is important to observe that under the conditions of experiment 12 (no supplementation), vitamin B12 was not detected (Table 4). The concentration of DMBI often added to culture media ranges from 0.9 to 30 mg/L, which are low concentrations because it presents low water solubility and is possibly toxic to microbial cells.^{14,31} We set the concentration of DMBI at its highest tested level, 30 mg/L.

Yeast extract and tryptone were evaluated as extra sources of protein and minerals. They exerted effect on biomass production but did not show positive effects on vitamin B12 specific yield (Table 5). Finally, glutamic acid supplementation did not produce a significant effect on the biosynthesis of vitamin B12. Because this biosynthesis is strain-dependent, it is possible that the strain used in our work did not metabolize glutamic acid as a substrate in the C5-pathway to produce aminolevulinic acid. Therefore, these supplements were not included in medium composition for the next experiments. Concerning iron sulfate and cysteine chloride supplementations, although these

compounds were able to produce positive effects on vitamin B12 biosynthesis, these effects were not statistically significant. However, it is known that soybean proteins are deficient in cysteine,²⁶ thus the cysteine chloride was evaluated again in the central composite design 2², and iron sulfate was included and fixed at its highest level (30 mg/L) tested in the Plackett–Burman, in the next experiments.

3.3 | Central composite design 2²

The surface response generated by the central composite design 2² is presented in Figure 1. Cobalt chloride showed positive effects in all

TABLE 5 Effect of independent variables on vitamin B12 biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*

Variable	Effect	p value
Yeast extract	−0.015	.5575
Tryptone	−0.042	.1354
Potassium phosphate	0.012	.6463
Cysteine chloride	0.038	.1637
Iron sulfate	0.045	.1118
Glutamic acid	−0.012	.6463
Cobalt chloride ^a	0.085	.0125
DMBI ^a	0.072	.0251

Note: SE = 0.024160; R² = .8378.

Abbreviation: DMBI, 5,6-dimethylbenzimidazole.

^aStatistically significant at 95% of confidence.

TABLE 4 Experimental matrix of Plackett–Burman design and the experimental results testing supplementation of LAPRS as substrate to synthesize vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*

Experiment	Coded variables											Biomass (g/L)	Vitamin B12 (mg/g)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	V11	V12	V13		
1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	1	1	−1	1	7.52	0.20
2	1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	1	1	−1	8.72	0.08
3	−1	1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	1	1	6.04	0.07
4	1	−1	1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	1	7.18	0.09
5	1	1	−1	1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	8.12	0.17
6	1	1	1	−1	1	1	−1	1	−1	−1	−1	7.84	0.09
7	−1	1	1	1	−1	1	1	−1	1	−1	−1	5.9	0.10
8	−1	−1	1	1	1	−1	1	1	−1	1	−1	3.44	0.29
9	−1	−1	−1	1	1	1	−1	1	1	−1	1	3.56	0.19
10	1	−1	−1	−1	1	1	1	−1	1	1	−1	7.6	0.13
11	−1	1	−1	−1	−1	1	1	1	−1	1	1	6.26	0.17
12	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	3.36	0.00
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.46	0.19
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.64	0.19
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.76	0.19

Abbreviations: DMBI, 5,6-dimethylbenzimidazole; LAPRS, liquid acid protein residue of soybean; X1, yeast extract; X2, tryptone; X3, potassium phosphate; X4, cysteine chloride; X5, iron sulfate II; X6, glutamic acid; X7, cobalt chloride; X8, DMBI; V11, V12, V13 are inert variables of design.

tested concentrations. Cysteine chloride negatively affected vitamin B12 biosynthesis at concentrations ranging from 500 to 1,800 mg/L. The effect of cobalt chloride (A) and cysteine chloride (B) on vitamin B12 specific yield can be correlated as in Equation 1:

$$\text{Vitamin B12} = 0.387 + 0.018A + 0.002A^2 - 0.008B - 0.084B^2 + 0.015AB \quad (1)$$

The model shows a high coefficient of determination ($R^2 = .9611$) and more than 90% of the results on vitamin B12 specific yield is explained by this equation. Based on this, a vitamin B12 specific yield of 0.43 mg/g cell could be achieved supplementing the LAPRS with 250 mg/L of cobalt chloride and 1,200 mg/L of cysteine chloride. We performed the experiment under the optimized conditions, obtaining 0.47 mg of vitamin B12 per gram of dry cell, in accordance with the values predicted by the model.

3.4 | Growth kinetics in optimized LAPRS

After establishing the best medium composition and culture conditions for vitamin B12 biosynthesis, we run a complete growth kinetics in shaker flasks and results are presented in Figure 2a. In our experiments, we detected vitamin B12 after 72 hr of growth, the endpoint of anaerobic growth, and proceeded to the maximum specific yield of approximately 0.6 mg/g at 144 hr of cultivation.

The bioprocess to obtain vitamin B12 by bacteria of *Propionibacterium* genus is usually divided into two stages. First, the microorganism is grown under anaerobiosis for approximately

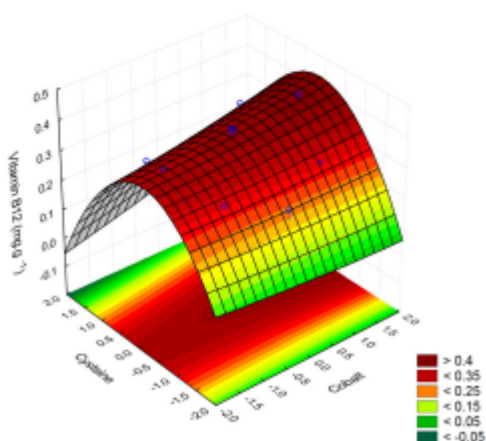


FIGURE 1 Response surface of central composite design 2^2 with cobalt chloride and cysteine chloride as experimental variables of the test of supplementation of LAPRS as substrate to synthesize vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. LAPRS, liquid acid protein residue of soybean

72 hr to produce the vitamin B12 precursors. Then, in the second stage, DMBI is added to medium and the process is conducted under microaerophilic conditions. This step enables DMBI attachment on the cobinamide structure and then the vitamin B12 biosynthesis is completed.²⁹

Our results compared well with previous reports for vitamin B12 production on synthetic and alternative media. Wang et al.²² run batch and fed-batch processes using *P. freudenreichii* CICC 10019, in a synthetic media using glucose (60 g/L) as carbon source, obtaining 0.61 and 0.54 mg/g, respectively at 160 hr. Chamlagain et al.²³ reported productions of vitamin B12 by 27 strains of *P. freudenreichii*, which were cultivated in whey permeate, values of vitamin obtained ranged from 0.02 to 0.25 mg/g. In one of the best results reported, Wang et al.²⁴ devised a glycerol/glucose cofermentation in a fed-batch process to biosynthesize vitamin B12 by *P. freudenreichii* CICC 10019, obtaining 0.72 mg/g after 258 hr of cultivation. These results suggest that several variables on media formulation and cultivation forms highly impact the vitamin biosynthesis.

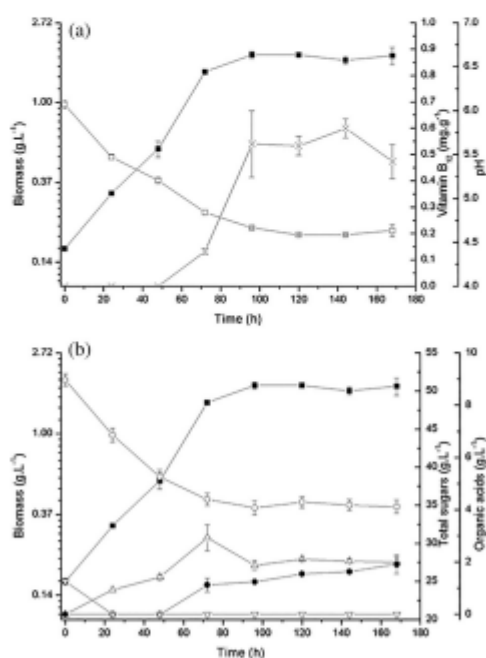


FIGURE 2 Growth kinetics of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 in shaker flasks with supplemented LAPRS medium at 30°C, 72 hr anaerobic and 98 hr microaerophilic conditions (180 rpm). (a) Vitamin B12 (x), pH (□), and biomass (■); (b) total sugars (-), lactic acid (∇), propionic acid (Δ), and acetic acid (●). Results represent the mean of duplicates. LAPRS, liquid acid protein residue of soybean

Propionibacterium sp. are recognized for their ability to consume a variety of carbon sources, specially lactic acid, which is easily assimilated by these microorganisms.^{25,26} Figure 2b shows the kinetic parameters of biomass formation, and sugar and organic acid concentrations during cultivation. *P. freudenreichii* ATCC 13673 consumed all lactic acid present in LAPRS medium culture. It consumed approximately 30% of available carbohydrates. Similar sugar consumption profile has been reported for cultures of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* TB2 in media containing sucrose as carbon source, in which approximately 27% of sugars were consumed.²⁷ Sucrose is the second most abundant carbohydrate in the LAPRS and it can explain the low sugar consumption and reduced biomass production (1.82 g/L) in this experiment.

The production of propionic and acetic acids, ratios around 2:1, is characteristic of *P. freudenreichii* anaerobic metabolism.²⁶ The culture pH decreased steadily along the cultivation process and reached the lowest value (4.6) at 96 hr of culture process. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* is inhibited at pH 4.5 or lower, as observed in our study and corroborated by other reports in the literature.²⁸ Controlling the pH around neutrality is essential to obtain the maximum activity of

enzymes responsible for vitamin B12 biosynthesis,²⁹ a condition we adopted in the bioreactor experiments.

3.5 | Influence of LAPRS enzymatic pre-treatment on *P. shermanii* ATCC 13673 growth kinetics

The growth kinetics of *P. shermanii* ATCC 13673 in medium LAPRS after enzymatic treatment with Alcalase, depicted in Figure 3a,b, showed enhanced production of metabolites. The biomass accumulation increased from 1.8 to 2.6 g/L and higher propionic and acetic acid production was observed (4.6 and 3.3 g/L, respectively). However, the specific yields and productivity of vitamin B12 (0.58 and 0.01 mg L⁻¹ hr⁻¹, respectively) were similar to the condition without hydrolysis. It is known that increasing the amount of nitrogen source in the medium culture of *P. freudenreichii* can increase biomass and organic acids production.²⁸ However, it might not affect directly the biosynthesis of vitamin B12 as we noticed in the supplementation experiments (Table 5). In addition of improving the biomass and metabolites production, LAPRS treatment with Alcalase is essential to enable the bioreactor experiments because it avoids protein precipitation. Therefore, we kept the enzymatic treatment for the next experiments.

3.6 | Bioreactor kinetics of *P. shermanii* ATCC 13673 cultures

Figure 4 depicts the experiments of bioreactor cultivations of *P. shermanii* ATCC 13673, in which pH was controlled. Results show higher biomass formation (>8 g/L) and sugar consumption (>60%) in relation

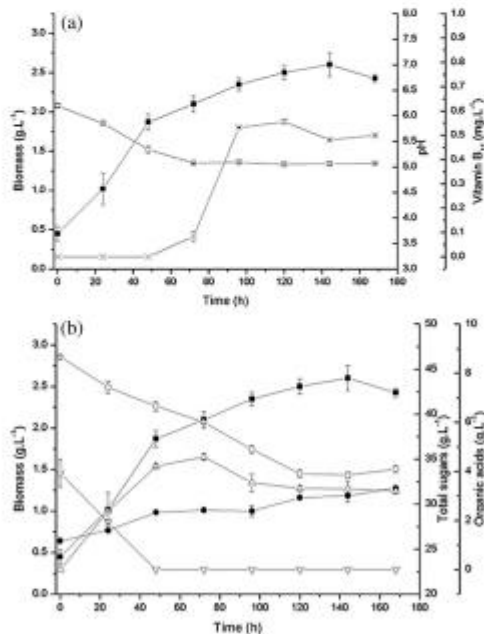


FIGURE 3 Growth kinetics of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 in shaker flasks with enzymatic pretreated LAPRS medium, at 30 °C, 72 hr anaerobic and 98 hr microaerophilic conditions (180 rpm). (a) Vitamin B12 (x), pH (□), and biomass (■); (b) total sugars (○), lactic acid (∇), propionic acid (Δ), and acetic acid (●). Results represent the mean of duplicates. LAPRS, liquid acid protein residue of soybean

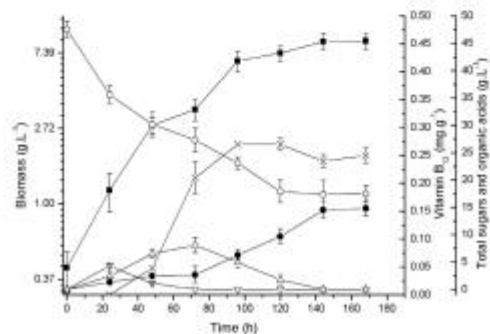


FIGURE 4 Growth kinetics of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 in 2 L bioreactor with enzymatic pretreated LAPRS medium, 30 °C, 200 rpm, 72 hr anaerobic and 98 hr microaerophilic conditions (aeration rate = 0.5 vvm). Vitamin B12 (x), biomass (■); total sugars (○), lactic acid (∇), propionic acid (Δ), and acetic acid (●). Results represent the mean of duplicates. LAPRS, liquid acid protein residue of soybean

to the shaker cultivations (average of 2 g/L and 30%, respectively). The maximum concentrations of propionic acid (8.16 g/L) and acetic acid (14.85 g/L) were between 2 and 5-folds, respectively, compared to shaker cultivations. Vitamin B12 productivity was increased 2-folds (from 0.01 to 0.02 mg L⁻¹ hr⁻¹) in the bioreactor cultivation. Although high aeration rates can inhibit *Propionibacterium* growth, it has been shown that supplying oxygen at low concentrations can increase biomass yields. This bacterium has some components on its electron transport system, such as heme enzymes and cytochromes *b* and *c*, which are present in the respiratory system of aerobic microorganisms. Because of these components, *P. shermanii* can use low concentrations of oxygen present in the medium to obtain energy and produce biomass.^{40,41}

In general, the oxygen supply to *P. shermanii* cultures will have more pronounced effect on biomass than on vitamin B12 formation. For instance, maintaining the volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) of 10/hr, which is a low value, in batch cultures of *P. freudenreichii* CDB10015 growing in synthetic medium containing 80 g/L of glucose and 100 g/L of corn steep liquor as major components, at 35°C for 72 hr, produced similar amounts of biomass (12.5 g/L), propionic acid (7.0 g/L), acetic acid (13.5 g/L), and vitamin B12 specific yields (0.2 mg/g) as obtained in our work.⁴⁰

The relatively high production of acetic acid is another characteristic of *P. freudenreichii* metabolism under aerobic metabolism.²⁶ The propionic acid produced under the anaerobic phase is completely converted to pyruvate in presence of dissolved oxygen. Then, the generated pyruvate is oxidized to acetic acid, increasing its concentration, as we noticed in our work.⁴² In the bioreactor culture, the pH was automatically controlled at 6.5, which has been reported as an important factor for best *Propionibacterium* growth⁴³ and vitamin B12 biosynthesis.³⁷

4 | CONCLUSION

The experiments with *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 have shown that this strain was able to biosynthesize considerable amounts of vitamin B12 on LAPRS medium, even comparable to reports on the literature in cultures using synthetic media. In addition, applying an enzymatic pretreatment in the LAPRS medium to breakdown proteins and running batch bioreactors cultures, we could increase biomass concentration and vitamin B12 biosynthesis up to fourfold and twofold, respectively. This is the first report evaluating this animal component-free, LAPRS as a medium culture to produce vitamin B12 by *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. There is a great potential of applying the biomass obtained in this bioprocess in order to produce a cheap source of vitamin B12 to bioenriched food products as an alternative for a renewable and animal component-free process.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code

001), and grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant 442516/2014-2 for the corresponding author), and from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, grant 18/2551-0000495-2 for the corresponding and the second authors).

ORCID

Marco Antônio Záchia Ayub  <https://orcid.org/0000-0003-4410-6336>

REFERENCES

1. Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CBF, Nexø E, Moestrup SK. Vitamin B12 transport from food to the body's cells—a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9:345-354. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.76>.
2. Green R. Vitamin B12 deficiency from the perspective of a practicing hematologist. *Blood*. 2017;129:2603-2612. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-569186>.
3. Moll R, Davis B. Iron, vitamin B12 and folate. *Medicine*. 2017;45:198-203. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.01.007>.
4. Garrod MG, Buchholz BA, Miller JW, Haack KW, Green R, Allen LH. Vitamin B12 added as a fortificant to flour retains high bioavailability when baked in bread. *Nucl Instrum Methods Phys Res*. 2019;438:136-140. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2018.05.042>.
5. Taranto MP, Vera JL, Hugenholtz J, de Valdez GF, Sesma F. *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J Bacteriol*. 2003;185:5643-5647. <https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5643>.
6. Xie C, Coda R, Chamlagain B, et al. In situ fortification of vitamin B12 in wheat flour and wheat bran by fermentation with *Propionibacterium freudenreichii*. *J Cereal Sci*. 2018;81:133-139. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.05.002>.
7. Allen L, Benoit B, Dary O, Hurrell R. Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009;1:3-20.
8. de Albuquerque MAC, Bedania R, Vieira AD, LeBlanc JG, Saad SM. Supplementation with fruit and okara soybean by-products and amaranth flour increases the folate production by starter and probiotic cultures. *Int J Food Microbiol*. 2016;236:26-32. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2016.07.008>.
9. Vandamme EJ, Revuelta JL. *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*. Weinheim, Germany: Wiley; 2016.
10. Rabah H, do Carmo R, Luiz F, Jan G. Dairy propionibacteria: versatile probiotics. *Microorganisms*. 2017;5:1-17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020024>.
11. Chamlagain B. *Fermentation Fortification of Active Vitamin B12 in Food Matrices Using Propionibacterium freudenreichii: Analysis, Production and Stability*. PhD Thesis, Helsinki, Finland: University of Helsinki; 2016. <http://um.fi/URN:ISBN:978-951-51-2753-2>.
12. Hugenschmidt S, Schwenninger SM, Lacroix C. Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13. *Process Biochem*. 2011;46(5):1063-1070. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.021>.
13. Hajfarajollah H, Mokhtariani B, Mortaheb H, Afaghi A. Vitamin B12 biosynthesis over waste frying sunflower oil as a cost effective and renewable substrate. *J Food Sci Technol*. 2015;52:3273-3282. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1383-x>.
14. Koźmider A, Białas W, Kubiak P, Drozdzyńska A, Czaczyk K. Vitamin B12 production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* Ssp. *shermanii*: optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Bioresour Technol*. 2012;105:128-133. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.074>.