



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Волинець Ользі Владиславівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання вітаміну В<sub>12</sub> культивуванням *Propionibacterium freudenreichii*

керівник роботи Стабніков Віктор Петрович, д.т.н., доцент

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Propionibacterium freudenreichii*, цільовий продукт: вітамін В<sub>12</sub> (ціанокобаламін)

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання. РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми виробництва вітаміну В<sub>12</sub>. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва вітаміну В<sub>12</sub>. РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва вітаміну В<sub>12</sub>.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) Технологічна схема виробництва вітаміну В<sub>12</sub> – 2 аркуші формату А1. Апаратурна схема виробництва вітаміну В<sub>12</sub> – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки концентрування вітаміну В<sub>12</sub> – 1 аркуш формату А3.

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	19.05.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	20.03.2020 – 23.03.2020	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	24.03.2020 – 28.03.2020	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	29.03.2020 – 03.04.2020	
4.	Біосинтез цільового продукту	04.04.2020 – 08.04.2020	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	09.04.2020 – 15.04.2020	
6.	Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	16.04.2020 – 24.04.2020	
7.	Специфікація обладнання	25.04.2020 – 30.04.2020	
8.	Опис технологічної схеми виробництва вітаміну В <sub>12</sub>	01.05.2020 – 8.05.2020	
9.	Контроль виробництва вітаміну В <sub>12</sub>	9.05.2020 – 13.05.2020	
10.	Автоматизація ділянки виробництва вітаміну В <sub>12</sub>	14.05.2020 – 19.05.2020	
11.	Оформлення пояснювальної записки	19.05.2020-20.05.2020	
12.	Виконання графічної частини проекту	20.05.2020 - 31.05.2020	

Здобувач

( підпис )

Волинець О.В.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

( підпис )

Стабніков В.П.

(прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технології одержання вітаміну В<sub>12</sub> з використанням пропіоновокислих бактерій штаму *Propionibacterium freudenreichii* СІСС 10019, які на середовищі з глюкозою продукують близько 60 мг ціанокобаламіну.

В даній роботі була розрахована річна потреба вітаміну на всю територію України (13,4 кг на рік). Оскільки в Україні вітамін В<sub>12</sub> не виробляється і для вітчизняних препаратів АФІ завозять із закордону, було зменшено вихідну потребу, взявши від неї близько 30%. Відповідно річна потужність підприємства - 4,02 кг ціанкобаламіну на рік. На основі потреби населення України у вітаміні В<sub>12</sub> і розрахунку річної потужності підприємства розроблено технологічну та апаратурну схеми отримання цільового продукту. На даних схемах представлено допоміжні роботи (підготовка розчинів хлорного вапна для миття приміщень та розчину «Бланілас-Ц» для миття обладнання, підготовка технологічного обладнання, підготовка персоналу, приготування розчинів гідроксиду натрію для підключення та розчинів соляної кислоти для підкислення середовища, приготування фенол-хлороформної суміші для екстракції, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу в колбах на качалках, у ферментерах об'ємом 6,3 л, 63 л, 630 л та 6,3 м<sup>3</sup>, відділення біомаси сепаруванням, дезінтеграція клітин, екстракція, концентрування екстракту, висушування, подрібнення та просіювання готового продукту і подальше його пакування).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, десяти розділів, списку використаних джерел, двох технологічних схем (формат А1), двох апаратурних схем (формат А1) та схеми ділянки автоматизації (формат А3). Загальний обсяг роботи – 119 сторінок, 6 рисунків, 18 таблиць.

Ключові слова: вітамін В<sub>12</sub>, *Propionibacterium freudenreichii*, ціанокобаламін, 5,6-ДМБ, біосинтез, сепарування, дезінтеграція.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ .....	3
ВСТУП .....	6
РОЗДІЛ 1. ОПИС ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	9
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 .....	19
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ .....	21
3.1. Потреба у цільовому продукті .....	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва .....	23
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера для одержання вітаміну В <sub>12</sub> .....	23
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу <i>P. freudenreichii</i> СІСС 10019.....	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	27
4.1. Шляхи катаболізму глюкози у <i>P. freudenreichii</i> СІСС 10019.	27
4.2. Біотрансформація глюкози ціанокобаламін.....	29
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ .....	32
5.1. Обґрунтування способу культивування .....	32
5.2. Обґрунтування вибору ферментера .....	32
5.3. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень та вибору миючих засобів .....	33
5.4.Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій	37

5.6. Обґрунтування способу підготовки поживного середовища	38
5.7. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	41
<b>РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ .....</b>	<b>50</b>
6.1. Розрахунок кількості виробничих циклів .....	51
6.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ .....	52
6.3 Матеріальний баланс на один цикл виробництва.....	59
6.4. Розрахунок технологічного обладнання.....	63
<b>РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....</b>	<b>67</b>
<b>РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....</b>	<b>71</b>
<b>РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ В12 <i>PROPIONIBACTERIM FREUDENREICHI</i> СІСС 10019 .....</b>	<b>89</b>
9.1. Карта постадійного контролю біосинтезу ціанокобаламіну .	89
9.2 Мікробіологічний контроль.....	98
9.3 Показники росту і синтезу .....	100
9.4. Методики контролю готового продукту .....	103
<b>РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА .....</b>	<b>106</b>
10.1 Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки.....	106
10.2 Завдання на розробку схеми автоматизації.....	108
10.3 Опис схеми автоматизації зі специфікацією засобів автоматизації .....	109
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>111</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>111</b>

## ВСТУП

Для підтримання нормальної життєдіяльності організму крім білків, жирів, вуглеводів, мінеральних речовин і води необхідні вітаміни - природні біологічно активні сполуки, які відіграють специфічну роль в клітинному обміні у надзвичайно малих концентраціях і за рідкісним винятком не синтезуються в організмі. Вітаміни надходять в організм з продуктами харчування, переважно рослинного походження. В тканинах організму людини вони засвоюються, утворюючи більш складні речовини. Їх значення полягає в тому, що вони є складовою частиною молекул багатьох ферментів та деяких фізіологічно активних речовин, які беруть участь в обміні речовин. Нині відомо понад 20 вітамінів, які мають безпосереднє значення для здоров'я людини.

Існування і значення вітамінів для життя встановив наприкінці минулого століття російський лікар М. І. Лунін (1881). Пізніше польський хімік К. Функ (1912) назвав біологічно активну речовину, яку виділили з висівок, "вітаміном", оскільки вона містила в своїй молекулі аміногрупу (лат. *vita* – життя + "аміни"). Ця назва збереглась до цього часу, хоча азот міститься не в усіх вітамінах [1-2].

Вітамін В<sub>12</sub> став відомим у науковому світі на початку 1920-х років, коли два американські лікарі - Мінот і Мерфі, продемонстрували, що вони змогли вилікувати перніціозну анемію - захворювання, яке характеризується мегалобластним кровотворенням і змінами нервової системи внаслідок дефіциту вітаміну В<sub>12</sub>, який виникає при важкому атрофічному гастриті. Їх відкриття ініціювало розслідування їхнього так званого "зовнішнього фактора", що призвело до створення цілого нового науково-дослідного поля, що завершилося багатьма Нобелівськими преміями, присуджених Міноту і Мерфі (разом з Уїплом) у 1934 році за їх відкриття з приводу терапії печінки при анемії та Ходжкіну в 1964 році для визначення анемії методами рентгенографії структур важливих біохімічних речовин.

Після 10 років роботи з більш ніж 100 дослідниками, повний хімічний синтез вітаміну В<sub>12</sub> був досягнутий Вудвордом і Ешенмосером в 1973 році. Цей надзвичайно складний синтез, з приблизно 70 етапами синтезу, робить будь-яке промислове виробництво вітаміну В<sub>12</sub> хімічними методами занадто технічно складним і дорогим. Тому сьогодні вітамін В<sub>12</sub> виробляється виключно біосинтетичними процесами ферментації, з використанням обраних та генетично оптимізованих мікроорганізмів [3].

### **Актуальність.**

Забезпечення потреб людини і сільськогосподарських тварин достатньою кількістю вітамінів є важливою проблемою, яку в сучасних умовах неможливо вирішити лише за рахунок використання традиційних природних вітамінних ресурсів. Тварини і людина в основному потребують одержання готових вітамінів, а серед мікроорганізмів широко розповсюджена здатність до їх синтезу. Широкі перспективи щодо використання мікроорганізмів для одержання вітамінів з'явилися завдяки виявленню у них здатності до так званого надсинтезу вітамінів, тобто до утворення і накопичення в культурах деяких видів набагато більшої їх кількості, ніж потрібно для виконання каталітичних функцій [4].

На сьогодні промислове виробництво ціанокобаламіну в Україні відсутнє, оскільки для виробництва лікарських препаратів зазвичай використовують вже готову субстанцію вітаміну, яку імпортують з країн Європи та Китаю. Саме тому можна відзначити високу собівартість вітаміну внаслідок перевезення, ліцензування та отримання відповідної документації на розповсюдження. З цієї причини доцільнішим є впровадження виробництва ціанокобаламіну в Україні, адже спектр використання цього вітаміну в медицині є досить широким.

**Новизна.** В даній кваліфікаційна роботі вперше наведено технологію біосинтезу вітаміну В<sub>12</sub> за допомогою використання штаму *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019, які мають найбільшу продукуючу здатність серед пропіоновокислих бактерій. Дістало подальший розвиток культивування

бактерій на поживному середовищі з глюкозою з додаванням екзогенного попередника вітаміну В<sub>12</sub> – 5,6-диметилбензімідазолу. Створено нову концепцію, яка дозволяє здійснити очищення та виділення вітаміну В<sub>12</sub> з культуральної рідини. Визначено ефективність використання фенол-хлороформної суміші в якості екстрагента [56,40].

## РОЗДІЛ 1. ОПИС ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

**Фармакологічна група:** вітаміни та вітаміноподібні засоби.

**Формула:**  $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ .

**Молярна маса:** 1 355,365 г/моль.

**Температура плавлення:**  $> 300$  °С.

**Температура кипіння:**  $> 300$  °С [2].

**Властивості:** кристалічний порошок темно-червоного кольору, без запаху, гігроскопічний. Розчинний у воді та у 95%-вому спирті, практично не розчинний в ефірі, хлороформі, ацетоні [5].

Вітамін  $B_{12}$  відносно стабільний при дії високих температур та світла, руйнується при тривалій дії світлових променів, а також у кислому та лужному середовищах [6].

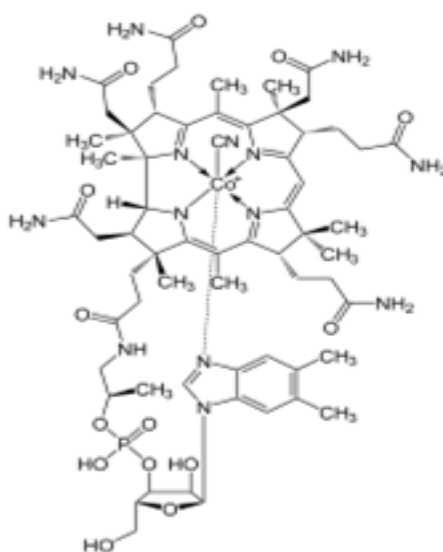


Рис.1.1. Структурна формула вітаміну  $B_{12}$

**Структура.** Вітамін  $B_{12}$  належить до кобальтовмісних біологічно активних речовин (кобаломінів) і відрізняється від будови всіх інших вітамінів своєю складністю і наявністю у його молекулі іону кобальту.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.13 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Волинець О.В				Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.					9	3
Консульт.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.						

Молекула вітаміну  $B_{12}$  складається з двох частин: кобальтовмісної (порфіриноподібної) і нуклеотидної (рис.1.1). Порфіриноподібна структура є хромоформною, для неї характерна наявність атома кобальту і ціаногрупи, які утворюють координаційний комплекс. Нуклеотидне ядро складається з пуринової основи, рибози і залишку фосфорної кислоти. Нуклеотидне ядро з'єднується з кобальтом через азотисту основу і з коринним кільцем – через амінопропаноловий місток, який зазвичай виділяють як самостійний структурний елемент молекули. Пуринова основа з'єднана з рибозою незвичним N- $\alpha$ -глікозидним зв'язком на відміну від N- $\beta$ -глікозидного зв'язку, який, як правило, зустрічається в нуклеозидах природних пуринів і піримідинів. Основа нуклеотиду, 5,6-диметилбензimidазол, не виявлена в інших природних сполуках, крім вітаміну  $B_{12}$  [7].

**Біологічна дія.** Метилкобаламін та 5-дезоксиаденозилкобаламін є формами вітаміну  $B_{12}$ , які активні в метаболізмі людини. Основна функція активних форм коферментів – перенесення метильних одновуглецевих груп (трансметилування). Беруть участь в обміні білків та нуклеїнових кислот (синтез метіоніну, ацетату, дезоксирибонуклеотидів) [8].

**Фармакодинаміка.** Вітамін  $B_{12}$  чинить метаболічну, гемопоетичну дію. В організмі перетворюється у коферментну форму - аденозилкобаламін, або кобамамід, який є активною формою вітаміну  $B_{12}$ . Кобамамід входить до складу численних ферментів, зокрема до складу редуктази, що відновлює фолієву кислоту у тетрагідрофолієву. Має високу біологічну активність. Кобамамід бере участь у переносі метильних та інших одновуглецевих фрагментів, тому він необхідний для утворення дезоксирибози та ДНК, креатину, метіоніну - донора метильних груп, у синтезі ліпотропного фактора - холіну, для перетворення метилмалонової кислоти в янтарну, що входить до складу мієліну, для утилізації пропіонової кислоти. Кобамамід необхідний для нормального кровотворення, оскільки сприяє дозріванню еритроцитів. Бере участь у синтезі та накопиченні в еритроцитах сполук, які містять сульфгідрильні групи, що збільшує їхню толерантність до гемолізу. Активує

систему згортання крові, у високих дозах підвищує тромбопластичну активність і активність протромбіну. Знижує рівень холестерину в крові. Позитивно впливає на функцію печінки та нервової системи. Підвищує здатність тканин до регенерації.

**Фармакокінетика.** При парентеральному застосуванні вітамін B<sub>12</sub> швидко надходить у системний кровотік. У крові зв'язується із транскобаламінами I і II, які транспортують його у тканини. Депонується переважно в печінці. Зв'язок з білками плазми - 90%. Час досягнення максимальної концентрації після підшкірного або внутрішньом'язового введення становить близько 1 години. З печінки виводиться з жовчю в кишечник і знову всмоктується в кров. Період напіввиведення з печінки – 500 днів. Виводиться при нормальній функції нирок - 7-10% нирками, близько 50% - з каловими масами; при зниженій функції нирок - 0-7% нирками, 70-100% - з каловими масами. Проникає крізь плацентарний бар'єр [9].

**Дефіцит.** При дефіциті вітаміну B<sub>12</sub> розвивається недокрів'я (анемія), виникає функціональний розлад центральної нервової системи (подрозливість, порушення сну, депресія) та навіть можливі незворотні порушення (параліч) [6].

**Застосування.** У промисловості застосовуються препарати ціанкобаламіну двох видів: вітаміни для медичних цілей і кормові препарати, які використовують в тваринництві та птахівництві для вітамінізації кормів. У медицині і ветеринарії вітамін B<sub>12</sub> застосовують при гіпо- та авітамінозах вітаміну. Існує величезна безліч форм вітаміну у вигляді таблеток, капсул, пероральних рідин, спреїв, порошоків, як БАДів, в складі мультівітамінних комплексів, у формі розчинів для інфузій, навіть в складі зубних паст і продуктах харчування з метою збагачення їжі вітаміном [10].

## РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Для хімічного синтезу ціанокобаламіну необхідні 37 послідовних етапів. У зв'язку зі складністю такого синтезу мікробіологічний метод залишається єдиним промисловим способом одержання вітаміну В<sub>12</sub>. Види мікроорганізмів та мікробіологічні процеси рекомендовані для виробництва вітаміну В<sub>12</sub> наведені у таблиці 2.1.1:

Таблиця 2.1.1

**Продуценти вітаміну В<sub>12</sub> [11-17].**

Біологічний агент	Основний компонент поживного середовища	Умови культивування	Концентрація вітаміну В <sub>12</sub> або (мг / л)
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Мальтозний сироп	5,6-диметилбензімідазол	198,8
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Сахароза	5,6-диметилбензімідазол	140
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Глюкоза	5,6-диметилбензімідазол	59,5
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Глюкоза	5,6-диметилбензімідазол	52
<i>Nocardia rugosa</i>	Глюкоза	Аеробіоз	18
<i>Rhizobium cobalaminogenum</i>	Сахароза	Аеробіоз	16,5
<i>Micromonospora sp.</i>	Глюкоза	5,6-диметилбензімідазол	11,5
<i>Streptomyces olivaceus</i>	Глюкоза	5,6-диметилбензімідазол	6
<i>Nocardia gardneri</i>	Гексадекан	Аеробіоз	4,5
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	Метанол	Анаеробіоз	3,6
<i>Arthrobacter hyalinus</i>	Ізопропанол	5,6-диметилбензімідазол	1,1

<b>НУХТ БТЕК 04.01.13 КР ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Волинець О.В			
Перевір.	Стабніков В.П.			
Консульт.				
Н. Контр.				
Затверд.	Пирог Т.П.			
Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента			Літ.	Арк.
				12
			Акрушів	8
<b>Кафедра БТМ</b>				

Для того, щоб визначити найефективнішого продуцента вітаміну В<sub>12</sub> необхідно порівняти мікроорганізми, які найчастіше використовуються для мікробіологічного синтезу ціанокобаламіну. Порівнюють за такими показниками утворення вітаміну В<sub>12</sub> як: концентрація цільового продукту, час протягом якого утворюється вітамін, а також вихід вітаміну від теоретично можливого. Порівняльну характеристику наведено у табл. 2.1.2.

Порівняльна характеристика продуцентів вітаміну В<sub>12</sub>

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год.	Концентрація вітаміну, мг/л	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Мальтозний сироп – 260; Кукурудзяний екстракт – 40; Бетаїн – 20; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 1; MgSO <sub>4</sub> – 1,5; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,75; ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,08; CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O – 0,14; 5,6-ДМБ – 0,075.	180	198,8	pH = 7,2 - 7,4; триступенева ферментація: I. t = 28 ° C, аерація, швидкість перемішування -180 об/хв. II. t = 28 ° C, аерація, швидкість перемішування - 130об/хв. III. t = 32 ° C, анаеробні умови, швидкість перемішування -130 об/хв.	Wei Xia, Wei Chen, Wei-fu Peng, Kun-tai Li. Industrial vitamin B12 production by <i>Pseudomonas denitrificans</i> using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates // Bioprocess Biosyst Eng. – 2015. – DOI 10.1007/s00449-014-1348-5.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 320	Сахароза – 50; Кукурудзяний екстракт – 60; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 2; CoCl <sub>2</sub> – 0,006; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2,6; Бетаїн – 6; 5,6- ДМБ – 1.	168	140	T = 30 ° C, pH = 6,8 - 7, швидкість перемішування -200 об/хв., аеробні умови.	Huina Dong, Sha Li, Huan Fang, Miaomiao Xia, Ping Zheng, A newly isolated and identified vitamin B12 producing strain: <i>Sinorhizobium meliloti</i> 320 // Bioprocess Biosyst Eng. – 2016. – DOI 10.1007/s00449-016-16283.

## Продовження таблиці 2.2

<i>Propionibacterim shermanii</i> PZ-3	Пептон – 10; Глюкоза-30 Дріжджовий екстракт –5; КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> – 0,5; СоSO <sub>4</sub> ·7Н <sub>2</sub> 0 – 0,015;	160	52	Т = 30 ° С, рН = 6,5, швидкість перемішування -100 об/хв., анаеробні умови.	Hidetaka Hatanaka, Enhao Wang, Masayuki Taniguchi, Shinji Iijima, and Takeshi Kobayashi. Production of vitamin B12 by a fermentor with a hollow-fiber module // Appl Microbiol Biotechnol. – 1988.
<i>Propionibacterim freudenreichii</i> CICC 10019	Глюкоза – 60; Кукурудзяний екстракт – 40; КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> – 4,6; СоCl <sub>2</sub> – 0,012; 5,6- ДМБ –0,9	160	59,5	Т = 30 ° С, рН = 6,8-7, анаеробні умови; 5,6-ДМБ додавали після 72 год ферментації	Wang, P., Zhang, Z., Jiao, Y., Liu, S., & Wang, Y. Improved propionic acid and 5,6-dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B12 fermentation by <i>Propionibacterium freudenreichii</i> . Journal of Biotechnology.– 2015 doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.019
<i>Propionibacterim freudenreichii</i> T82	Пептон – 10; Дріжджовий екстракт – 5; Гідрохлорид L-цистеїну–0,4; КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> – 1,5; К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> – 2,5.	120	43,04	Т = 30 ° С, рН = 7, швидкість перемішування -120 об/хв. 60 год –анаероб. умови і 60 год - аерація)	Kamil Piwowarek, Edyta Lipinska, Elzbieta Hacz-Szymanczuk, Anna Bzducha-Wrobel. Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by <i>Propionibacterium freudenreichii</i> strain T82 // Antonie van Leeuwenhoek. – 2017. doi. 10.1007/s10482-017-0991-7.

З таблиці 2.2 видно, що найбільшу кількість вітаміну B<sub>12</sub> продукує *P. denitrificans* на мальтозному сиропі. Проте для вибору найефективнішого продуцента цього недостатньо. Порівнявши характеристики мікроорганізмів та поживних середовищ, необхідно порівняти вартість поживних середовищ, використовуваних усіма продуцентами. Ціна компонентів середовища та їх вартість на 1 л поживного середовища для культивування наведені у таблиці 2.3. Умовна вартість 1 мг цільового продукту (вітаміну B<sub>12</sub>) при культивуванні наведена у таблиці 2.4.

Таблиця 2.3

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування *P. denitrificans*, *S. meliloti* *P. shermanii* та *P. freudenreichii***

Біологічний агент	Концентрація компонента поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>P. denitrificans</i>	Мальтозний сироп – 260;	24	6,24	19
	Кукурудзяний екстракт –40;	15	0,6	19
	Бетаїн – 20;	35	0,7	19
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 1;	24	0,024	18
	MgSO <sub>4</sub> – 1,5;	7	0,0105	19
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,75;	48	0,036	18
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,08;	46	0,004	18
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O – 0,14;	750	0,105	19
	5,6-диметилбензімідазол – 0,075.	5073	0,380	21
	Вартість 1 л середовища 8,1 грн			
<i>S. meliloti</i> 320	Сахароза – 50;	12,5	0,625	18
	Кукурудзяний екстракт – 60;	15	0,9	19
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 2;	24	0,048	18

## Продовження таблиці 2.3

	CoCl <sub>2</sub> – 0,006;	570	0,003	18
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2,6;	48	0,125	18
	Бетаїн – 6;	35	0,21	19
	5,6-диметилбензімідазол – 1.	5073	5,073	21
	Вартість 1 л середовища 7 грн			
<i>P. shermanii</i> PZ-3	Глюкоза – 30;	19,5	0,585	18
	Дріжджовий екстракт – 5;	825,2	4,126	20
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,5;	48	0,024	18
	Пептон – 10;	150	1,5	18
	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,015.	380	0,006	19
	Вартість 1 л середовища 6,24 грн			
<i>P. freudenreichii</i> CICC 10019	Глюкоза – 60;	19,5	1,17	18
	Кукурудзяний екстракт – 40;	15	0,6	19
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 4,6;	48	0,221	18
	CoCl <sub>2</sub> – 0,012.	570	0,007	18
	5,6- ДМБ –0,9	5073	4,56	21
	Вартість 1 л середовища 6,5 грн			
<i>P. freudenreichii</i> T82	Пептон – 10;	150	1,5	18
	Дріжджовий екстракт – 5;	825,2	4,126	15
	Гідрохлорид L-цистеїну–0,4;	685	0,274	18
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,5;	48	0,072	18
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2,5.	104	0,26	18
	Вартість 1 л середовища 6,23 грн			

**Примітка.** \* - Ціни наведено станом на березень 2019 р.

**Умовна вартість 1 мг цільового продукту (вітаміну В<sub>12</sub>) при  
культивуванні *P. denitrificans*, *S. Meliloti*, *P. shermanii* та *P. freudenreichii***

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація вітаміну, мг/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг	Тривалість культивування, год	К-сть утвореного вітаміну за годину, мг/год
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	8,1	198,8	0,04	180	1,1
<i>S. meliloti</i> 320	7	140	0,05	168	0,83
<i>P. shermanii</i> PZ-3	6,24	52	0,12	160	0,32
<i>P. freudenreichii</i> CICC 10019	6,56	59,5	0,11	160	0,37
<i>P. freudenreichii</i> T82	6,23	43,04	0,14	120	0,36

Розглянувши кілька продуцентів вітаміну В<sub>12</sub>, можна зробити висновок що:

- штам *P. denitrificans*, який культивували на мальтозному сиропі, має високу концентрацію вітаміну, проте триваліший час культивування та тристадійну ферментацію;
- середовище з сахарозою для культивування штаму *S. meliloti* 320 має найбільшу вартість;
- для культивування бактерій *P. shermanii* PZ-3 в анаеробних умовах не вказано кількість і час внесення попередника вітаміну В<sub>12</sub> 5,6-ДМБ;

- штам *P. freudenreichii* T82 продукує малу кількість вітаміну В<sub>12</sub>, а також у середовище не вносили кобальтовмісну сполуку, необхідну для синтезу вітаміну;
- серед усіх запропонованих пропіоновокислих бактерій штам *P. freudenreichii* CICC 10019 продукує найбільшу концентрацію вітаміну В<sub>12</sub>.

Отже для одержання вітаміну В<sub>12</sub> доцільніше використовувати штам *P. freudenreichii* CICC 10019, тому що:

- для культивування використовують поживне середовище з глюкозою, яке є досить дешевим, простим та ефективним;
- за досить короткий час культивування бактерії продукують велику кількість вітаміну В<sub>12</sub>;
- мають статус безпечних для практичного застосування, тому що не утворюють ніяких ні екзо-, ні ендотоксинів.

## **2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента**

За таксономічним положенням даний штам пропіоновокислих бактерій належить до наступних таксонів:

Тип: *Actinobacteria*

Клас: *Actinobacteria*

Підклас: *Actinobacteriae*

Порядок: *Actinomycetales*

Родина: *Propionibacteriaceae*

Рід: *Propionibacterium*

Вид: *freudenreichii*

*P. freudenreichii* - нерухомі плеоморфні, булавоподібні палички розміром 0,5-0,8×1-3 мкм з одним заокругленим, іншим - конусоподібним або загостреним кінцем. Зазвичай клітини в молодих культурах - викривлені, злегка вигнуті палички, в старіших - коковидної форми. Розташування

клітин: одиночне, парне, у вигляді коротких ланцюжків, V- або Y-образне, у вигляді «Китайських ієрогліфів» [22].

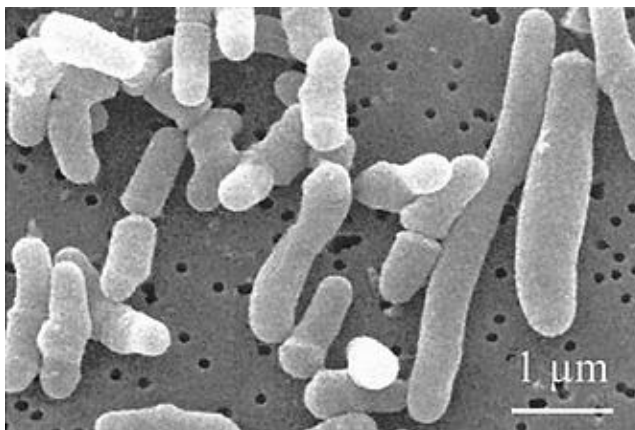


Рис 2.2.1 *P. freudenreichii* під електронним мікроскопом

При відсутності контамінації на поживному середовищі з глюкозою колонії *P. freudenreichii* будуть мати такий вигляд: округла, або у вигляді гречаного зерна, форма, колонії вологі, блискучі, маслянисті, кремового кольору (рис 2.2.2) [23].

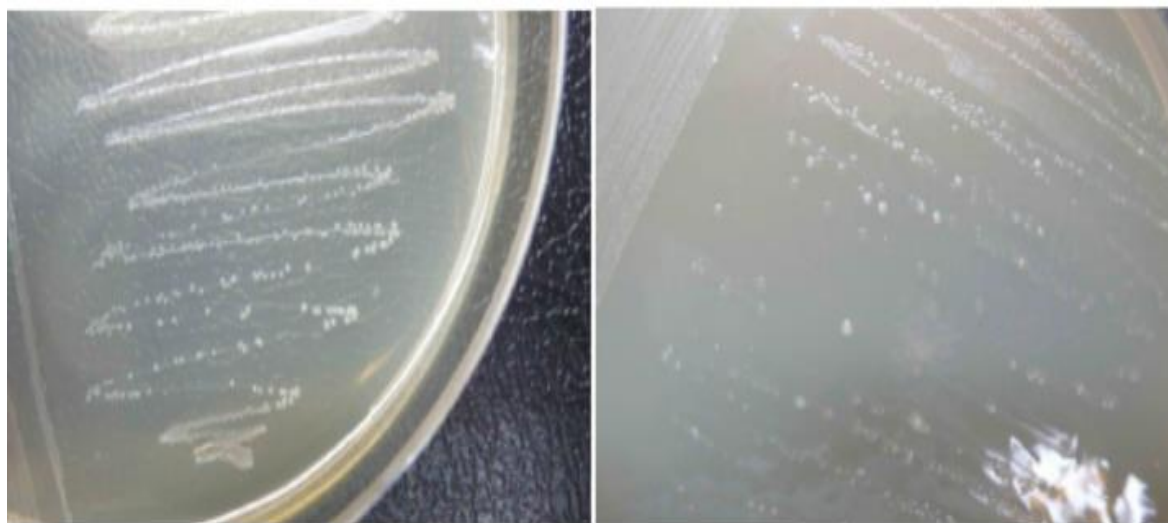


Рис 2.2.2. *P. freudenreichii* на кукурудзяно-глюкозному середовищі

Грампозитивні. Спори не утворюють. Факультативні анаероби. Зброжують фруктозу, лактозу, галактозу, глюкозу, манозу. Головний продукт метаболізму - пропіонова кислота. У клітинній стінці основним компонентом є мезо-ДАН. Оптимум рН 7,0-7,2. Оптимальна температура 32-37°C. Є гомоферментативними і здатні до зростання в середовищах з вуглецевмісними сполуками [22,24].

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

На сьогоднішній день однією з найважливіших речовин у сфері вітамінів у світі науки і медицини є вітамін В<sub>12</sub>. Забезпечення потреб людини достатньою кількістю даним вітаміном, який є одним з життєвоважливих, є важливою проблемою, яку в сучасних умовах неможливо вирішити лише за рахунок використання традиційних природних вітамінних ресурсів та хімічного синтезу. Людина в основному потребує одержання готових вітамінів, а серед мікроорганізмів широко розповсюджена здатність до їх синтезу. Широкі перспективи щодо використання мікроорганізмів для одержання вітамінів з'явилися завдяки виявленню у них здатності до так званого надсинтезу вітамінів, тобто до утворення і накопичення в культурах деяких видів набагато більшої їх кількості, ніж потрібно для виконання каталітичних функцій [4].

Вітамін В<sub>12</sub> застосовується для профілактики та лікування надзвичайно широкого спектру хвороб, а також входить до складу майже всіх комбінованих вітамінних препаратів призначених для ліквідації авітамінозів. В основному дані препарати є дієтичними добавками або БАДами [25].

Найбільші кількості вітаміну розповсюджуються на лікування хвороб крові, а саме: анемії різного типу, деякі дерматозні хвороби, поліневрити, склерози та інші хвороби ЦНС, ПНС та пов'язані з ними розлади психіки. Велика його роль у застосуванні як додаткового підтримуючого фактора при лікуванні гепатитів різних груп та інших хвороб печінки [25, 26].

Для розрахунку потреби буде обрано найбільш значущі хвороби для лікування яких застосовуються препарати на основі вітаміну В<sub>12</sub>. Дані захворювання вказані у табл. 3.1.1.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.13 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Волинець О.В</i>			<b>Розділ 3. Техніко- економічне обґрунтування</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Первір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					<b>21</b>	<b>6</b>
<i>Консульт.</i>						<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

Таблиця 3.1.1

**Хвороби при яких призначається вітамін В<sub>12</sub>**

Хвороби	Дозування, мг	Тривалість курсу, лікування
Гепатит В	0,2-0,1 мг 1 раз на 2 дні	40 днів
Дерматози	1 мг кожного дня	14 днів
Хвороби крові та органів кровотворення	0,1 мг	60 днів
Хвороби нервової системи	0,2-0,5 мг кожного дня	14-20 днів
Розлади психіки	0,1-0,3 мг кожного дня	40-50 днів

Оскільки дозування вітаміну В<sub>12</sub> для даних хвороб відрізняється, то для кожної з них, враховуючи курс лікування, необхідно вирахувати свою кількість доз за курс. Розподілені хвороби і їх дозування співвідносяться з кількістю зареєстрованих випадків даних хвороб у людей на території України у 2018-2019 році. Для повної картини застосування препаратів на основі В<sub>12</sub> наводимо таблицю 3.1.2:

Таблиця 3.1.2

**Статистика захворюваності населення при яких застосовується  
ціанокобаламін [27,28]**

Група захворювань	Кількість хворих за 2018-2019 рр	Дозування, мг	Частота прийому, дні	Тривалість курсу, дні	Загальна кількість доз	Загальна кількість вітаміну, г
Гепатит В	12445	0,2	1 раз на 2 дні	40	20	49,78
Дерматози	348090	1	1 раз на 1 день	14	14	4873,3
Хвороби крові та органів кровотворення	140132	0,1	1 раз на 1 день	60	60	840,8
Хвороби нервової системи	399035	0,5	1 раз на 1 день	20	20	3990,35
Розлади психіки	351792	0,3	1 раз на 1 день	40	40	4221,5
<b>Усього</b>	<b>1251494</b>	-	-	-	-	<b>13400</b>

**\*Примітка.** Для вказання дозування препарату, тривалості курсу лікування та кількості необхідного препарату на людину впродовж курсу лікування зазначені усереднені значення з табл. 3.1.1.

За статистикою 2018 - 2019 рр. було зареєстровано наступну кількість випадків захворювань пов'язаних з застосуванням вітаміну В<sub>12</sub>: 12445 хворі на Гепатит В, 348090 – на авітамінозні дерматози, 140132 мають хворобу органів кровотворення, 399035 – хворобу нервової системи, 351792 – мають розлади психіки. Дані захворювання тісно пов'язані з недостатчею ціанокобаламіну, тому обов'язково потрібно споживати В<sub>12</sub> в добавках, таблетках чи ін'єкціях. Загальна кількість ціанокобаламіну, яка буде затрачатися на лікування даних захворювань буде становити:

$K_{\text{заг}} = 49,78 + 4873,3 + 840,8 + 3390,35 + 4221,5 = 13375,73 \text{ г} = 13,4 \text{ кг}$  (у перерахунку на всі вище наведені зареєстровані випадки захворювань з врахуванням відповідного дозування). Отже, кількість вітаміну, яку необхідно одержувати на всю територію України становить 13,4 кг на рік.

### **3.2. Розрахунок потужності виробництва**

На ринку України більшість препаратів, які мають у своєму складі діючу речовину ціанокобаламін, в основному закордонні, але є і українські аналоги. В Україні вітамін В<sub>12</sub> не виробляється, то ж навіть для вітчизняних препаратів АФІ завозять із закордону. Частина ринку будуть займати закордонні виробники, з якими заключають контракти вітчизняні фармацевтичні компанії для виробництва «in bulk» із завозом сировини з закордону, тому вихідну потребу необхідно зменшити, взявши від неї близько 30%:

$$G_{\text{гп}} = 13,4 \times 0,30 = 4,02 \text{ кг ціанокобаламіну на рік.}$$

### **3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера для одержання вітаміну В<sub>12</sub>**

Для забезпечення потреби у вітаміні В<sub>12</sub> (у складі відповідних препаратів) в Україні необхідно виробляти 4,02 кг щорічно. Продуктивність продуцента становить:  $P_{\text{кр}} = 59,5 \text{ мг/л}$  ціанокобаламіну. Приймаємо 60 мг на

літр, у грамах це становить 0,06 г/л. Приймаємо вологість сухого продукту 8 %, відповідно абсолютно сухої її буде  $CP_{\text{біом}} = 92\%$ . Втрати при виробництві приймаємо 30 %. Культивування проходить вродовж 160 годин.

Розраховуємо, яку кількість сухого ціанкобаламіну можна отримати за добу, враховуючи кількість трудоднів ( $T_{\text{дн}} = 200$ ).

$$G_{\text{нтд}} = G_{\text{нт}} / T_{\text{дн}} = 4,02 / 200 = 0,0201 \text{ кг / добу}$$

Відповідно, кількість продукту за один цикл становить:

$$V_{\text{цикл}} = (G_{\text{нтд}} \times T_{\text{цф}}) / 24 = (0,0201 \times 170) / 24 = 0,1423 \text{ кг /цикл}$$

Об'єм культуральної рідини за цикл з урахуванням втрат (близько 30%) буде становити:

$$V_{\text{кр}} = (K_1 \times V_{\text{цикл}} \times CP_{\text{біом}}) / (1 - E_{\text{св}}) \times P_{\text{кр}} = (1,2 \times 0,1423 \times 0,92) / (1 - 0,30) \times 0,00006 = 3738 \text{ л/цикл} = 3,74 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

Розраховуємо кількість циклів ферментації:

$$N_{\text{цикл}} = G_{\text{нд}} / V_{\text{цикл}} = 4,02 / 0,1423 = 28,2 \approx 28 \text{ циклів}$$

Вихід препарату у кг з  $1 \text{ м}^3$  культуральної рідини:

$$P_{\text{кр}} = A_{\text{цикл}} / V_{\text{кр}} = 0,1423 / 3,74 = 0,04 \text{ кг}$$

$T_{\text{цф}}$  – цикл роботи ферментера (170 год), що включає час біосинтезу (160 год) та час підготовки ферментера (10 год),  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій. Підготовка ферментатора включає: миття та огляд - 2 год, перевірка на герметичність - 2 год, стерилізація – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів - 0,5 год, відвантаження культуральної рідини - 1 год.

3740 л культуральної рідини можна отримати у реакторі геометричний об'єм якого має становити (приймаємо коефіцієнт заповнення 0,65):

$$V_{\text{р}} = V_{\text{кр}} / K_{\text{зап}} = 3,74 / 0,6 = 6,23 \text{ м}^3$$

Найближчий об'єм ферментера = 6300 л (обираємо ферментер компанії «Біотехно» на 6300 л. Перераховуємо  $K_{\text{зап}}$  .:

$$K_3 = V_{\text{кр}} / V_{\text{р}} = 3,74 / 6,3 = 0,59, \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

#### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу *P. freudenreichii* CICC 10019**

За один виробничий цикл отримують 3740 л культуральної рідини. Розраховуємо кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом, враховуючи втрати культуральної рідини в результаті краплевиносу через колектор (10%):

$$V_{роб1} = V_{кр} / (1 - E_{\phi}) = 3740 / (1 - 0,1) = 4155 \text{ л}$$

Звідси можливий геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\phi} = V_{роб1} / K_{зап} = 4155 / 0,6 = 6925 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий стандартний об'єм ферментера – 6300 л

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = 4155 / 6300 = 0,66$$

Кількість поживного середовища в ферментері з поправкою на інокулят ( $X_{\phi}=10\%$ ) становить:

$$V_{пс1} = V_{роб1} / (1 + X_{\phi}) = 4155 / (1 + 0,1) = 3777 \text{ л}$$

Відповідно кількість посівного матеріалу буде становити:

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 4155 - 3777 = 378 \text{ л}$$

Для одержання інокуляту обираємо ферментер на 630 л. Щоб отримати 378 л у ферментері враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (приймаємо за 10%). Тоді кількість посівного матеріалу та поживного середовища у ферментері становить:

$$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 378 / (1 - 0,1) = 420 \text{ л}$$

Звідси кількість поживного середовища з поправкою на інокулят ( $X_{\phi}=10\%$ ) становить:

$$V_{пс2} = V_{роб2} / (1 + X_{ПА}) = 420 / (1 + 0,1) = 381,8 \text{ л}$$

Відповідно кількість посівного матеріалу:

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 420 - 381,8 = 38,2 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу можна отримати у біореакторі на 63 л з коефіцієнтом заповнення 0,6. Щоб отримати 38,2 л у біореакторі, необхідно врахувати втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Звідси кількість посівного матеріалу та поживного середовища у біореакторі становить:

$$V_{\text{роб}2} = V_{\text{пм}1} / (1 - E_{\text{па}}) = 38,2 / (1 - 0,1) = 42,4 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища з поправкою на інокулят ( $X_{\text{ф}}=10\%$ ):

$$V_{\text{пс}2} = V_{\text{роб}2} / (1 + X_{\text{ПА}}) = 42,4 / (1 + 0,1) = 38,5 \text{ л}$$

Відповідно кількість посівного матеріалу буде становити:

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб}2} - V_{\text{пс}2} = 42,4 - 38,5 = 3,9 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу можна отримати у біореакторі на 6,3 л з коефіцієнтом заповнення 0,53. Для одержання 3,9 л у біореакторі необхідно вирахувати втрати у результаті крапливиносу через колектор відпрацьованого повітря (приймаємо за 10%). Звідси кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становить:

$$V_{\text{роб}2} = V_{\text{пм}1} / (1 - E_{\text{па}}) = 3,9 / (1 - 0,1) = 4,33 \text{ л}$$

Розраховуємо кількість поживного середовища з поправкою на інокулят ( $X_{\text{ф}}=10\%$ ) становить:

$$V_{\text{пс}2} = V_{\text{роб}2} / (1 + X_{\text{ПА}}) = 4,33 / (1 + 0,1) = 3,93 \text{ л}$$

Звідси кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб}2} - V_{\text{пс}2} = 4,33 - 3,93 = 0,4 = 400 \text{ мл}$$

Дану кількість посівного матеріалу можна одержати у колбах на качалках об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2. Розраховуємо кількість колб для отримання посівного матеріалу:

$$N = V_{\text{пм}2} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 400 / (750 \times 0,2) = 2,66 - \text{приймаємо 3 штуки.}$$

Отже, процес одержання ціанокобаламіну культивуванням бактерій *P. freudenreichii* CICC 10019 буде складатися з 4 підготовчих стадій і кінцевої виробничої, яка буде проводитися у ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>:

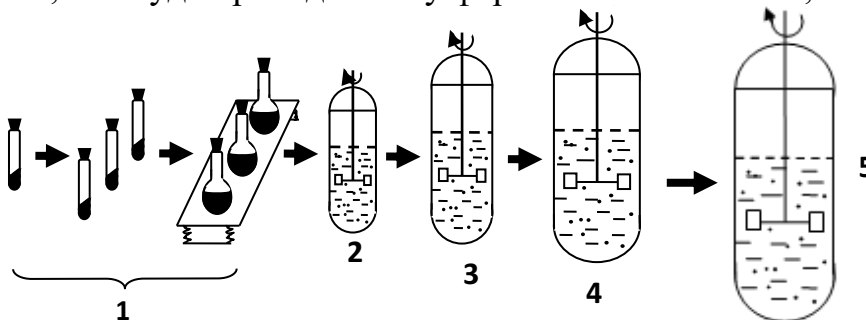


Рис 3.4.1. Схема приготування посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1. Шляхи катаболізму глюкози у *P. freudenreichii* СІСС 10019

Ростовим субстратом у поживному середовищі для біосинтезу вітаміну В<sub>12</sub> є глюкоза. Згідно KEGG, катаболізм глюкози відбувається за шляхом Ембдена-Мейергофа-Парнаса (гліколіз), про що свідчить наявність ключового ферменту 6-фосфофруктокінази 1 (КФ.2.7.1.11). Наводимо схему перетворення даного вуглеводу (рис. 4.1.1).

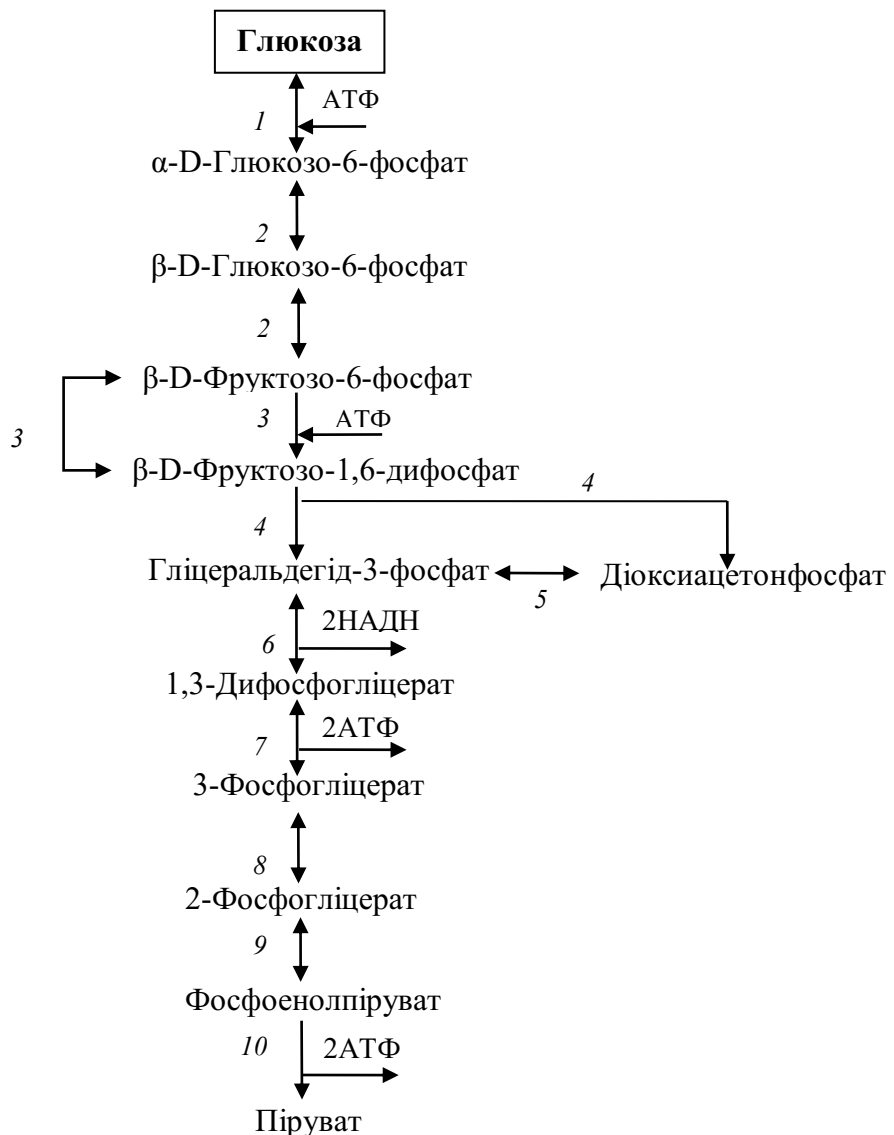


Рис. 4.1.1. Катаболізм глюкози у *P. freudenreichii*

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.13 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Волинець О.В.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.					27	5
Консульт.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.						
					<b>Розділ 4. Біосинтез цільового продукту</b>		

**Ферменти:** 1 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9.); 3 – фосфофруктокіназа 1 (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктоза-бісфосфатальдолаза, клас II (КФ.4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 8 – 2,3-бісфосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

Гліколіз у *P. freudenreichii* має певні особливості, пов'язані з ферментами, що функціонують у даному метаболічному шляху. Так, перетворення  $\alpha$ -D-глюкозо-1-фосфат на  $\alpha$ -D-глюкозо-6-фосфат відбувається під дією ферменту фосфоглюкомутази (КФ.5.4.2.2).

Фермент глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9) каталізує взаємне перетворення  $\alpha$ -D-глюкозо-6-фосфату,  $\beta$ -D-фруктозо-6-фосфату і  $\beta$ -D-глюкозо-6-фосфату. Далі 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ.2.7.1.11) активує перетворення  $\beta$ -D-фруктозо-6-фосфату на  $\beta$ -D-фруктозо-1,6-дифосфат, частина якого також за допомогою 6-фосфофруктокінази 1 (КФ.2.7.1.90) зворотно перетворюється на  $\beta$ -D-фруктозо-6-фосфат.

Фермент фруктозабісфосфатальдолаза, клас II (КФ.4.1.2.13), здійснює перетворення фруктозо-1,6-дифосфату на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат. Діоксиацетонфосфат зворотно перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат за допомогою ферменту триозофосфатізомерази (КФ.5.3.1.1). Перетворення 3-фосфогліцерату на 1,3-дифосфогліцерат відбувається за допомогою гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ.1.2.1.12). Далі, за допомогою фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) та 2,3-бісфосфогліцерат-залежної фосфогліцератмутази (КФ.5.4.2.11), утворюються такі сполуки як 3-фосфогліцерат та 2-фосфогліцерат. Останній, за участі енолази (КФ.4.2.1.11), перетворюється на фосфоенолпіруват.

Заключною стадією гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату на піруват, що каталізується ферментом піруваткіназою (КФ 2.7.1.40).

## 4.2. Біотрансформація глюкози ціанокобаламін

Вихідними сполуками для синтезу вітаміну В<sub>12</sub> є гліцин і глутамат-1-напівальдегід. Цикл трикарбонових кислот слугує постачальником необхідних інтермедіатів оксалоацетату і 2-окоглутарату, які є попередниками амінокислот аспартату і глутамату, необхідні для подальшого синтезу вітаміну В<sub>12</sub>. Гліцин утворюється із проміжної сполуки гліколітичного шляху - 3-Фосфогліцерату. Основа нуклеотиду, 5,6-диметилбензімідазол, синтезується з попередника рибофлавіну за допомогою нікотинатнуклеотид-диметилбензімідазолфосфорибозилтрансферази (КФ. 2.4.2.21).

Першим етапом є утворення амінолевулінової кислоти: вона синтезується з гліцину і глутамат-1-напівальдегіду за участю фермента глутамат-1-напівальдегідамінотрансферази (КФ. 5.4.3.8). Фермент порфобіліногенсинтаза (КФ. 4.2.1.24) каталізує перетворення амінолевулінової кислоти на порфобіліноген, який трансформується за участі ферменту гідроксиметилбілансинтази (КФ. 2.5.1.61) у гідроксиметилбілан. Далі йде утворення уропорфібіногену ферментом уропорфіриноген III метилсинтазою (КФ. 4.2.1.75) та прекорінів ферментом уропорфірин-III С-метилтрансферазою (КФ. 2.1.1.107). На стадії утворення прекорінів відбувається включення кобальту в молекулу, тому наступним етапом є утворення ряду Со-прекорінів за участі групи ферментів Со-прекорінметилтрансфераз, після чого синтезується кобіринова кислота під дією Со-прекорін -8-метилмутази (КФ. 5.4.99.60). Кобіринова кислота за участі ферменту кобіринат а, с-діамідсинтази (КФ. 6.3.5.11) трансформується у кобіринову кислоту а, с-діамід, яка в свою чергу перетворюється за допомогою коб(І)аламін аденозилтрансферази (КФ. 2.5.1.17) у аденозилкобіринатдіамід, а далі за участі синтази аденозилкобіринової кислоти (КФ. 6.3.5.10) у аденозилкобіринатгексаамід.

Фермент аденозилкобінамідфосфатсинтаза (КФ. 6.3.1.10) здійснює утворення аденозилкобінаміду та активує включення у молекулу 1-

Амінопропанолу. Також на цьому етапі відбувається приєднання кобінамідру за допомогою ферменту аденозилкобінамідкінази (КФ. 2.7.1.156). Далі за участі аденозилкобінамідкінази (КФ. 2.7.1.156) утворюється аденозилкобінамідфосфат. Також дана сполука утворюється із попередньо синтезованого ферментом аденозилкобінамідфосфатсинтазою (КФ.6.3.1.10) 1-Амінопропан-2-іл-фосфату (метаболізм треоніну).

Заключним етапом є перетворення аденозилкобінамідфосфату на аденозин-ГДФ-кобінамід під дією ферменту аденозилкобінамідфосфат-гуанілілтрансферази (КФ. 2.7.7.62), включення нуклеотиду і утворення коензиму вітаміну В<sub>12</sub> за допомогою ферменту – кобаламінсинтази (КФ.2.7.8.26).

**Ферменти:** 1 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9.); 3 – фосфофруктокіназа 1 (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктоза-бісфосфатальдолаза, клас II (КФ.4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 8 – 2,3-бісфосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40); 11 – специфічна піруватдегідрогеназа E1 (КФ.1.2.4.1); 12 – специфічна піруватдегідрогеназа E2 (дигідроліпоамідацилтрансфераза) (КФ.2.3.1.12); 13 – цитратсинтаза (КФ.2.3.3); 14 – аконітатгідратаза (КФ.4.2.1.3); 15 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ.1.1.1.42); 16 – 2-оксоглутаратдекарбоксілаза E1 (КФ.1.2.4.2); 17 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа E2 (КФ.2.3.1.61); 18 – ацетат-КоА-трансфераза (КФ.2.8.3.18); 19 – сукцинатдегідрогеназа / фумаратредуктаза (КФ. 1.3.5.1, КФ. 1.3.5.4); 20 – фумаратгідратаза, клас II (КФ. 4.2.1.2); 21 – малатдегідрогеназа (КФ. 1.1.1.37); 22 – L-аспартатоксидаза (КФ. 1.4.3.16); 23 – аспартаткіназа (КФ. 2.7.2.4); 24 – аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ. 1.2.1.11); 25 – гомосериндегідрогеназа (КФ. 1.1.1.3 ); 26 – гомосеринфосфотрансфераза (КФ. 2.7.1.39); 27 – треонінсинтаза (КФ.4.2.3.1); 28 – аденозилкобінамідфосфатсинтаза (КФ.6.3.1.10); 29 –

глутаматсинтаза (КФ.1.4.1.13); 30 – глутаміл-тРНК-синтетаза (КФ.6.1.1.17); 31 – глутаміл-тРНК редуктаза (КФ.1.2.1.70); 32 – глутамат-1-напівальдегід-аміотрансфераза (КФ. 5.4.3.8); 33 – D-3-фосфогліцератдегідрогеназа (КФ. 1.1.1.95); 34 – фосфосеринаміотрансфераза (КФ. 2.6.1.52); 35 – фосфосеринфосфотрансфераза (КФ. 3.1.3.3); 36 – гліцингідроксиметилтрансфераза (КФ. 2.1.2.1); 37– порфобіліногенсинтаза (КФ. 4.2.1.24); 38 – гідроксиметилбілансинтаза (КФ. 2.5.1.61); 39 – уропорфіриноген III метилсинтаза (КФ. 4.2.1.75); 40 – уропорфірин-III C-метилтрансфераза (КФ. 2.1.1.107); 41 – сирогідрохлорин кобальтохелатаза (КФ. 4.99.1.3); 42 – Co-фактор-2 C20-метилтрансфераза (КФ. 2.1.1.151); 43 – прекорін-3-метилтрансфераза (КФ. 2.1.1.131); 44 – Co-прекорін-4-метилтрансфераза (КФ. 2.1.1.271); 45 – Co-прекорін -5A-гідролаза (КФ. 3.7.1.12); 46 – Co-прекорін -5B (C1) –метилтрансфераза (КФ. 2.1.1.195); 47 – Co-прекорін -6A-редуктаза (КФ. 1.3.1.106); 48 – Co-прекорін -8-метилмутаза (КФ. 5.4.99.60); 49 – кобіринат а, с-діамідсинтаза (КФ. 6.3.5.11); 50 – коб(І)аламін аденозилтрансфераза (КФ. 2.5.1.17); 51 – синтаза аденозилкобірної кислоти (КФ. 6.3.5.10); 52 – аденозилкобінамід-фосфатсинтаза (КФ. 6.3.1.10); 53 – коб(І)аламін аденозилтрансфераза (КФ. 2.5.1.17); 54 – аденозилкобінамідкіназа (КФ. 2.7.1.156); 55 – аденозилкобінамід-фосфат-гуанілілтрансфераза (КФ. 2.7.7.62); 56 – нікотинат-нуклеотид-диметилбензімідазолфосфорибозилтрансфераза (КФ. 2.4.2.21); 57 – кобаламінсинтаза (КФ.2.7.8.26).

## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1. Обґрунтування способу культивування

Оскільки оптимальною температурою для культивування продуцента вітаміну В<sub>12</sub> *P. freudenreichii* СІСС 10019 є 35 °С, а оптимальне значення рН нейтральне, то можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними організмами. Мікроорганізми-контамінанти не тільки можуть пригнічувати розвиток і функції біологічного агенту, але й руйнувати поживне середовище. Більше того, деякі з них здатні продукувати токсичні речовини, які можуть потрапити в цільовий продукт. Це зумовлює необхідність забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, а саме використання стерильних інструментів, середовищ, обладнання, технологічного одягу, подачу стерильного повітря і ін.

Для бактерій *P. freudenreichii* СІСС 10019 використовують глибинний спосіб культивування, де мікроорганізми-продуценти вирощують не на поверхні поживного середовища, а у всій товщі. Глибинне культивування проводили в періодичному режимі, за якого весь об'єм поживного середовища засівають чистою культурою і вирощування ведуть відповідний час до накопичення потрібної кількості цільового продукту. Глибинний спосіб культивування дозволяє значно зменшити виробничі площі, має високий рівень автоматизації, спрощує механізацію та автоматизацію, а також дає змогу зручного видалення непошкодженого цільового продукту із культуральної рідини [29,30].

### 5.2. Обґрунтування вибору ферментера

Тип ферментера для кожного біотехнологічного процесу вибирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища і економічності. Головою вимогою апаратів для глибинної ферментації –

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.13 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Волинець О.В				<b>Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірив.	Стабніков В.П.						32	28
Консульт.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

забезпечення високої інтенсивності масо- і енергообміну клітин із середовищем.

Для забезпечення високого значення тепломасообміну в середині ферментера повинен бути встановлений перемішувачий пристрій. Також при виборі мішалки слід враховувати і фізіологічні особливості біологічного агенту. Оскільки *P. freudenreichii* CICC 10019 є бактеріальною культурою, тому вона невибаглива до перемішувачих пристроїв і можна розглядати будь-які типи, але слід враховувати в'язкість середовища, що перемішується [30].

Для культивування *P. freudenreichii* CICC 10019 використовують біореактор об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> без аеруючих пристроїв, оскільки біосинтез вітаміну проходив в анаеробних умовах. Відсутність необхідності аерації середовища дещо спрощує конструкцію ферментера і полегшує управління процесом. Апарат має всі необхідні штуцери для проведення технологічного процесу, а також для підготовки апарату до роботи. В якості перемішувачого пристрою слугують лопатеві мішалки, які є простими за конструкцією та забезпечують якісне перемішування культуральної рідини по всьому об'єму ферментера.

Перевагами даного пристрою є те, що він дозволяє проводити процес вирощування посівного матеріалу в асептичних умовах, перешкоджає потраплянню повітря, при цьому все ж надаючи необхідного перемішування середовищу для рівномірного культивування. Ці умови є головними при культивуванні анаеробних мікроорганізмів.

### **5.3. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень та вибору миючих засобів**

Біосинтез ціанокобаламіну з використанням бактерій штаму *P. freudenreichii* CICC 10019 здійснюється упродовж 200 днів. Решта днів буде затрачено на обслуговування обладнання та біосинтез інших цільових продуктів біосинтезу (наприклад інших вітамінів).

Для розрахунків кількостей миючих засобів необхідно розрахувати площу приміщення, де буде знаходитися ділянка виробництва. За основу для

масштабування розмірів апаратів для стерилізації та ферментерів приймаємо, що розмір максимального діаметра апаратів відповідних об'ємів дорівнює розміру максимального діаметра стандартних реакторів типу СРЕН.

У план промислової ділянки для виробництва ціанкобаламіну враховано місця для виробничих реакторів та місце для допоміжної апаратури розмір якого 4 м від найбільшого біореактора.

Загальні розміри приміщення становлять: 6,9×9,2 м. Відстань між апаратами прийнято 1,2 м в середньому, відстань до стін – 1 м. Ділянка представляє собою приміщення, де розташовані біореактори та допоміжна апаратура. Висота приміщень приймається 5 м оскільки необхідно врахувати можливий ремонт та розбір апаратури [31].

Загальна площа підлоги буде становити:

$$S_1 = 6,9 \times 9,2 = 63,5 \text{ м}^2$$

Площа підлоги та стін сумарно буде дорівнювати:

$$S_2 = ((6,9 \times 5) + (9,2 \times 5)) \times 2 + 63,5 = 224,5 \text{ м}^2$$

Для розрахунку кількості миючого розчину для мийки реакторів та ферментерів приймаємо кількість розчину за половину геометричного об'єму кожного. Кількість реакторів для приготування композицій приймаємо наступну:

Для приготування композицій А та Б приймаємо реактори на 5000 та 1000 л для виробничого ферментера, на 500 та 100 л для інокулятора на 630 л, і 50 та 10 л для біореактора на 63 л.

Кількість розчину для миття всіх реакторів та ферментів буде становити:

$$V_{\text{миття}} = (6300 + 630 + 63 + 6,3 + 5000 + 1000 + 500 + 100 + 50 + 10) / 2 = 6830 \text{ л}$$

Приймаємо: генеральне прибирання здійснюється кожний місяць (7 разів на рік миються стіна підлога, вікна і двері), підлога миється кожного дня. Обладнання, інвентар та комунікації миються після кожного циклу (1 раз на 7 днів, враховуючи тривалість циклу, який йде 170 год)

**Розрахунок загальної площі миття оброблювального об'єкту за весь період виробництва ціанокобаламіну**

Об'єкт миття	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> , л	Кількість процесів миття за весь період виробництва, дні	Загальна площа (об'єм) миття за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (л)
Обладнання, інвентар, комунікації	6830 л	67	457610 л
Підлога	63,5	200	12700 м <sup>2</sup>
Стіни, двері, вікна та підлога (генеральне прибирання)	224,5	7	1571,5 м <sup>2</sup>

Щоб обрати миючий засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблення потрібної площі виробничого приміщення. Середня витрати миючого засобу становить 100 мл на 1 м<sup>2</sup> для щоденного прибирання та 100 мл на метр квадратний для генерального (згідно з методичними рекомендаціями МОЗУ). Для порівняння миючих засобів наводимо *таблицю 5.3.2.*

**Узагальнена характеристика деяких миючих та деззасобів, для миття апаратури, щоденного та генерального прибирання [32-37]**

Назва	Об'єкт миття	Концентрація робочого розчину, %	К-ть робочого розчину за весь період виробництва для щоденного прибирання, л	Вартість 1 л, чи кг засобу, грн	Загальна вартість миття за період виробництва протягом року, грн
Хлоратоїн	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар, тара	0,2	1427,15	240	685

Продовження таблиці 5.3.2

Каустична сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	457610	30	274566
Хлорне вапно	Стіни, підлога, двері, вікна, комунікації	2,0	1427,15	22	628
Кальцинована сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	457610	28,8	263583,4
Бланідас-Ц Стар	Обладнання, інвентар, комунікації	0,5	457610	79,55	182014,4
LIV Актив 114	Підлога та інші поверхні	2,0	1427,15	221,20	6313,7
Kenolux F 200	Підлога та інші поверхні	1	1427,15	82,39	1175,82

*\*Примітка.* У графі, де вказана загальна кількість робочого розчину, враховано кількість розчину виходячи зі співвідношення 100 мл на 1 метр квадратний.

Проаналізувавши дані наведені у *табл 5.3.2*, можна зробити наступні висновки:

- для миття та дезінфекції обладнання, комунікацій, інвентарю, тари доцільно використовувати засіб «Бланідас-Ц», оскільки при великих кількостях робочих розчинів даний засіб є найменш вартісний;
- для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон, дверей є доцільним використання хлорного вапна, оскільки воно є дуже дешевим і не призводить до появи резистентних форм мікроорганізмів, проте при роботі з цим засобом слід користуватися засобами індивідуального захисту, оскільки він є дуже агресивним.

Миття ферментерів та реакторів буде проводитися з використанням СІР-системи, оскільки вона дає перевагу перед ручною мийкою у використанні меншої кількості робочого розчину і якості мийки.

#### 5.4. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій

**Миття обладнання.** Вся апаратура миється за допомогою СІР-установки, оскільки апарати досить великої місткості. СІР-мийка або СІР-станція (Cleaning in Place - безрозбірне миття) - обладнання модульного типу, що виконується з корозійностійкої нержавіючої сталі, яке виконує завдання підготовки, нагріву і циркуляції миючих розчинів всередині технологічного обладнання і трубопроводів, без необхідності їх розбору, з метою автоматизованого видалення забруднень. Даний тип мийки економить миючі розчини та проводить досить ретельну мийку без зайвого втручання людини. Грамотно підібрана СІР-станція вирішує наступні завдання:

- збільшує оборотність технологічного обладнання;
- знижує витрати на енергоресурси - воду, пар, миючі реагенти;
- сприяє підтримці якості та безпеки продукту;
- знижує втрати продукту;
- зменшує забруднення навколишнього середовища.

Дана установка підтримує якість готового продукту, збільшує термін служби обладнання, зменшує загальний час мийки і є універсальною та досить зручною для будь-якої апаратури [38].

**Ополіскування обладнання.** Після миття ферментер ополіскують холодною водою упродовж 10 хв за допомогою СІР-станції.

**Технічний огляд.** Технічний огляд апаратури проводять після миття та перед запуском процесу аби виявити присутність дефектів у ній, при яких герметичні деталі не можуть витримувати експлуатаційних навантажень. Після перевірки всіх параметрів перевіряють засоби контролю процесу: вимірювальні пристрої та супутні пристрої. Після огляду приступають до подальшої роботи.

**Перевірка на герметичність.** Дана стадія стосується ферментерів. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа – апарат є герметичним. Якщо дане значення перепаду тиску перевищує 0,01 МПа проводять перевірку і знаходять місце розгерметизації.

Остаточну перевірку герметичності апарату з прилеглими ділянками трубопроводів проводять галоїдним течешукачем. Пари галоїдовмісних речовин проникають через наявні нещільності і виявляються при наближенні щупа течешукача до місця витoku. Такі прилади дозволяють виявити витoku до 0,5 г на рік, що цілком достатньо для надійного контролю герметичності обладнання. Тривалість перевірки одного апарату за цим методом 1,5-2 ч. Знайдені пропуски усувають і проводять повторну перевірку [39].

**Стерилізація обладнання та комунікацій.** Після дезінфекції, ополіскування та перевірки обладнання та комунікацій на герметичність у ферментер подають насичену водяну пару, яку подають під тиском 0,28 – 0,3 МПа. Стадія стерилізації є останньою у процесі підготовки обладнання і включає в себе три етапи: нагрівання апарата, витримання необхідної температури стерилізації та охолодження.

### **5.5. Обґрунтування стадії підготовки інертного газу**

Оскільки процес одержання ціанкобаламіну протікає в анаеробних умовах, підготовка повітря не має сенсу, однак необхідно підготувати інертний газ для підтримання якомога більшої відсутності кисню при культивуванні.

В ролі інертного газу, який подається у ферментер для виштовхування залишків повітря з ферментерів, виступає азот. Його, перед подачею у ферментер, з балонів пропускають через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм аби усунути наявність мікроорганізмів-контамінантів, які можуть в ньому міститися [31,40,41].

### **5.6. Обґрунтування способу підготовки поживного середовища**

Максимальний синтез ціанкобаламіну у продуцента *Propionibacterium freudenreichii* СІСС 10019 становить 60 мг/л за 160 годин культивування за анаеробною технологією. Передкультивативне середовище має наступний склад, г/л:

- ✓ Глюкоза – 35;
- ✓ Кукурудзяний екстракт – 21;

- ✓  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 4;
- ✓  $\text{CoCl}_2$  – 0,005;
- ✓  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 5

Склад середовища для виробничого біосинтезу, який триває 160 год, г/л:

- ✓ Глюкоза – 60;
- ✓ Кукурудзяний екстракт – 40;
- ✓  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 4,6;
- ✓  $\text{CoCl}_2$  – 0,012;
- ✓ 5,6-диметилбензімідазол – 0,9

Оскільки стерилізація відбувається за різних умов розділимо компоненти на кілька композицій:

*1. Приготування і стерилізація середовища для культивування у колбах на качалках та біореакторі об'ємом 6,3 л.*

Кількість поживного середовища для отримання посівного матеріалу в колбах на качалках становить 360 мл. Для отримання посівного матеріалу використовують 3 колби об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2.

Поживне середовище у кількості 3,97 л для біореактора об'ємом 6,3 л також готують у колбах.

**Композиція А:** глюкоза, кукурудзяний екстракт (режим стерилізації:  $112^\circ\text{C}$ , 0,05 МПа, 30 хв). Склад композиції обґрунтовується відсутністю можливої хімічної взаємодії і термолабільністю компонентів даної композиції.

**Композиція Б:**  $\text{CoCl}_2$  (режим стерилізації:  $131^\circ\text{C}$ , 0,15 МПа, 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю солі, що може витримувати більш жорсткі умови стерилізації.

**Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (режим стерилізації:  $131^\circ\text{C}$ , 0,15 МПа, 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю солей, що можуть витримувати більш жорсткі умови стерилізації та відсутністю можливої хімічної взаємодії і термолабільністю компонентів даної композиції.

*2. Приготування і стерилізація середовища для культивування у*

*посівних апаратах місткістю 63 л і 630 л*

На другому етапі отримують поживне середовище у кількості 39,36 л для інокулятора об'ємом 63 л та 383 л відповідно для посівного апарата з об'ємом 630 л.

**Композиція А:** глюкоза, кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв). Склад композиції обґрунтовується відсутністю можливої хімічної взаємодії і термолабільністю компонентів даної композиції.

**Композиція Б:**  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю солей, що можуть витримувати більш жорсткі умови стерилізації. Стерилізація проходить при рН 4,5, для уникнення утворення нерозчинних солей.

*3. Приготування і стерилізація середовища для виробничого біосинтезу ціанокобаламіну.*

Для стерилізації поживного середовища у кількості 3,77 м<sup>3</sup> для виробничого ферментера об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> виділяємо 3 композиції:

**Композиція А:** глюкоза, кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв). Склад композиції обґрунтовується відсутністю можливої хімічної взаємодії і термолабільністю компонентів даної композиції.

**Композиція Б:**  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю солей, що можуть витримувати більш жорсткі умови стерилізації. Стерилізація проходить при рН 4,5, для уникнення утворення нерозчинних солей.

**Композиція В:** 5,6-диметилбензімідазол (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв). Склад композиції обґрунтовується термостабільністю даного компоненту [31,40,42,43].

Композиції для біореактора об'ємом 6,3 л готують в колбах і подають через засівний пристрій. Всі інші композиції будуть стерилізуватись в

окремих реакторах. Для виробничого біосинтезу композиція А буде стерилізуватись в реакторі і подаватись до ферментера. Композиція Б змішується у реакторі і подається до ферментера, де стерилізується. Композиція В для виробничого біосинтезу стерилізується окремо і подається на 72 год культивування. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів кобальту рН розчину з солями доводять до значення 4,5 6 %-вим розчином соляної кислоти. Після закінчення стерилізації розчин подають у ферментер і підлужують до рН = 7,0 6%-вим розчином гідроксиду натрію.

### **5.7. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту**

Головним завданням завершального етапу біотехнологічного виробництва є виділення та очищення цільового продукту. Одержання ціанокобаламіну складається з наступних етапів:

1. Відділення біомаси від культуральної рідини
2. Дезінтеграція бактеріальних клітин
3. Екстракція ціанокобаламіну
4. Концентрування розчину
5. Висушування ціанокобаламіну

#### *5.7.1 Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання*

Цільовим продуктом біосинтезу можуть бути безпосередньо самі мікроорганізми або їх метаболіти, які можуть бути розчинені в культуральній рідині або знаходитись всередині клітин мікроорганізмів. Ціанокобаламін являє собою ендометаболіт (утворюється всередині клітини).

Першим етапом в процесі очищення цільового продукту є відокремлення зваженої фази - маси мікроорганізмів від культуральної рідини, яка зазвичай є складною сумішшю та містить велику кількість компонентів (мікроорганізми, продукти їх життєдіяльності, залишки поживного середовища, та ін. речовини) [44]. Для подальших дій нам необхідна лише біомаса, яку можна відділити такими методами:

- **Флотація.** Суть методу: вспінення культуральної рідини, отриманої на стадії біосинтезу, після чого велика частина мікроорганізмів концентрується саме в пінній фракції. Даний метод використовують в тому випадку, якщо клітини продуцента в силу низької змочуваності збираються на поверхні вмісту апарату. Для відділення біомаси пропіоновокислих бактерій даний метод не доцільно використовувати, оскільки бактерії розподіляються по всій товщі культуральної рідини, а не на її поверхні, і тому погано розподіляться флотаційним методом. Також істотним недоліком є високі втрати біомаси - понад 20 % [44,45].

- **Фільтрація.** Суть методу: затримка біомаси на пористій фільтруючій перегородці. Проблемою використання фільтрів є в є швидка закупорка пор клітинами, білками та іншими колоїдними частинками. Через це знижується швидкість потоку рідини в процесі фільтрування. Тому цей спосіб не є ефективним для бактеріальної культури [45].

- **Центрифугування.** Суть методу: осадження частинок, які знаходяться у завислому стані в рідині, за допомогою відцентрової сили. Центрифугування вимагає більш дорогого обладнання, ніж фільтрування. Основні недоліки: невисокий ступінь зневоднювання осаду та неможливість його промивання. Також, в основному, центрифугування використовується для видалення великих часток, через що спостерігається підвищене винесення дрібних частинок із фугатом через фільтрувальні сітки, що дуже погіршує процес відділення біомаси [4,46].

- **Седиментація.** Суть методу: осадження частинок під дію сили тяжіння або за рахунок агрегації. Швидкість осадження частинок дуже незначна ( $10^{-6}$  і  $10^{-7}$  м/с). Даний метод використовують як спосіб розділення, якщо діаметр осадження частинок більше трьох мікрометрів та продукти досить стабільні, тому в нашому випадку він не підходить [47].

- **Сепарування.** Суть методу: розділення змішаних об'ємів сумішей різної густини, емульсій, суспензій твердих частинок і тд. Головні переваги сепарування: немає потреби в застосуванні фільтрувальних елементів,

мінімальні втрати активної речовини, процес легко піддається автоматизації, легше мити устаткування, висока продуктивність та висока ступінь розділення, що дозволяє успішно конкурувати з іншими способами виділення, як в промислових, так і в лабораторних умовах [47,48].

Розглянувши способи відділення біомаси від культуральної рідини, які наведені вище, розуміємо, що доцільнішим являється використання способу сепарування.

Для процесу сепарування застосовують апарат під назвою сепаратор. Дані апарати різняться за конструкцією, за типом ротора, за призначенням. За способом видалення осаду з барабана сепаратори поділяються на

- сепаратори з ручним вивантаженням осаду;
- сепаратори автоматизованим вивантаженням осаду.

Саморозвантажувальні – це сепаратори з автоматизованим вивантаженням осаду. Вони поділяються на сепаратори з безперервним та з періодичним вивантаженням осаду. У сепараторах з безперервним вивантаженням осаду розвантаження барабана відбувається через сопла у стінках барабана, у сепараторах із періодичним вивантаженням осаду - у результаті періодичного переміщення рухомого днища вниз на певний час під дією гідростатичного тиску продукту. Осад, що накопичується біля стінки барабана, викидається через кільцеву щілину, яка утворюється у результаті опусканні рухомого днища барабана. Після розвантаження осаду днище знову піднімається вгору за допомогою гідравлічної системи та утримується у цьому положенні до наступного розвантаження.

У сепаратора з періодичним вивантаженням осаду є суттєвий недолік – у разі тривалого інтервалу роботи сепаратора між розвантаженнями порожнина для збирання бруду та міжтарілкові щілини забиваються осадом, відповідно якість очищення та розділення продукту значно погіршується. Тому, обираємо саморозвантажувальний сепаратор безперервної дії, оскільки він має простішу конструкцію [49,50].

### 3.7.2 Обґрунтування вибору способу дезінтеграції клітин та відповідного обладнання

Другим етапом виділення ціанокобаламіну є обробка бактеріальних клітин для підвищення їхньої проникності. Для цільового продукту, що знаходиться усередині клітин продуцента вводиться стадія руйнування клітинних оболонок, тобто дезінтеграція біомаси. Всі процедури повинні бути одночасно досить жорсткими, аби зруйнувати клітинну стінку, та досить м'якими, щоб виключити можливість руйнування цільового продукту [51]. Методи руйнування клітин можна поділити на:

**1. Хіміко-ферментативні методи.** Використання таких антибіотиків, як тироцидин, ністатин, новобиоцин та ін., а також деяких поверхнево-активних речовин викликають ефективний лізис клітин. Лізис клітин спостерігається при лімітованому зростанні, а також при зараженні бактеріофагами. Методи гідролізу клітинних стінок бактерій з використанням ферментів є більш м'якими порівняно з хімічними. Як правило, ферментоліз проводять за фізіологічних значень температури та рН середовища. Недоліки: часто не відтворюється, тривалий час інкубації, необхідне видалення лізисних ферментів, неконтрольоване руйнування клітин, що приводить до вивільненню всього внутрішньоклітинного матеріалу (часто і до денатурації цільового продукту)[52,53].

**2. Хімічні методи.** Руйнування клітинної оболонки під впливом кислот, лугів та інгібіторів синтезу оболонки клітини. Недоліки: в більшості випадків спостерігається денатурація білків, можуть забруднювати кінцевий продукт.

#### **3. Фізичні методи.**

*Обробка ультразвуком.* Ультразвукова обробка поперемінно генерує хвилі високого і низького тиску оброблюваної рідини. Під час циклу низького тиску ультразвукові хвилі створюють дрібні вакуумні пухирці, які з силою лопаються під час циклу високого тиску. Даний метод підходить лише для конкретних типів клітин.

*Заморожування-відтавання.* Використовують для того, щоб зробити грамнегативні клітини чутливими до лізоциму. Цей метод можна застосовувати при виділенні мембран або внутрішньоклітинних органел у великих кількостях. Проте метод є досить повільним [52].

*Гомогенізація високого тиску.* Найпоширеніший та найкорисніший метод руйнування клітин. Суспензія відмитих клітин перекачується через невеликий отвір гомогенізуючого клапана під високим тиском. Після цього відбувається різке зняття тиску з суспензії, що призводить до миттєвого розширення, яке створює вихороутворення і зрушення рідини, відповідно відбувається руйнування клітин. Рекомендований тиск для стандартного застосування - 1500 бар для одноступінчастого гомогенізатора, при цьому для отримання відповідного вимогам лізису потрібно декілька ступенів (2-3) [52,54].

Отже, оскільки вітамін є внутрішньоклітинним, то для того, щоб його виділити необхідно зруйнувати цілісність клітинної оболонки. Обираємо фізичний метод – гомогенізацію високого тиску, тому що фізичні методи дезінтеграції є простими, не вимагають застосування часто дороговартісних розчинників та хімічних реагентів. Такий метод являє собою один з найпоширеніших методів руйнування клітинної оболонки, при якому вміст клітини не пошкоджується і у порівнянні з іншими методами гомогенізація більш зручна і ефективна, і при її використанні можна отримати більш високий відсоток зруйнованих клітин [54].

Для даного процесу дезінтеграції використовують гомогенізатори, які поділяють на ультразвукові, клапанні, дискові та відцентрові. Найбільшого поширення набули клапанні гомогенізатори, які складаються з насоса, запобіжного клапану, захисного кожуха, гомогенізуючої голівки та регулятора тиску. Дані апарати мають ряд переваг:

- + висока ступінь гомогенізації;
- + масовий промисловий випуск;
- + низькі витрати на обслуговування ;

- + зручність в обслуговуванні;
- + простота в експлуатації;
- + низька вартість запасних частин.

### *3.7.3 Вибір способу виділення цільового продукту з дезінтеграту*

Оптимальним способом виділення ціанкобаламіну з дезінтеграту є екстракція - процес вилучення одного або декількох компонентів з розчинів або твердих тіл за допомогою екстрагентів. При взаємодії з екстрагентом у ньому добре розчиняються тільки компоненти, що вилучаються, і значно слабкіше або практично зовсім не розчиняються інші компоненти вихідної суміші. Даний процес заснований на підвищенні температури, не потребує великих затрат енергії та широко застосовується у біотехнології. Розрізняють одноступеневу (застосуванням ефективних розчинників, які б дозволили за один раз виділити максимально велику кількість цільового продукту з водного розчину) та багатоступеневу екстракцію (проводиться з метою кращого відділення цільового продукту з розчину до розчинника) [52,55].

Використовуємо багатоступеневу екстракцію, яку повторюють 2-3 рази до повного знебарвлення. Цього буде достатньо для повного вилучення вітаміну. Екстрагентом виступає фенол-хлороформна суміш, яку додають порційно. Дана суміш є ефективним екстрагентом для вилучення ціанкобаламіну, оскільки під час екстракції в неї переходить максимальна кількість вітаміну. Залишок екстрагенту видаляють етиловим ефіром.

Процес екстракції відбувається у спеціальних апаратах – екстракторах. Для проведення екстракції необхідно обрати екстрактор з перемішувачем пристроєм, оскільки чим краще буде проходити процес змішування фаз, тим продуктивніше буде стадія екстрагування. Тому обираємо змішувально-відстійний екстрактор, який являє собою один апарат, в якому процес здійснюється періодично (перемішування - розшарування). Дані апарати займають невелику площу, мають незначну металоємність та менші габаритні розміри. Вони менш чутливі до наявності механічних домішок в рідинах, які можуть забивати насадку та отвори тарілок [55,56].

### *3.7.4 Вибір способу концентрування та відповідного обладнання*

Наступним етапом технологічного циклу є концентрування цільового продукту – збільшення вмісту продукту у об'ємі за рахунок зменшення вмісту води. Для концентрування використовують в основному ті ж процеси, як і при виділенні продукту з нативного розчину в різних поєднаннях.

Застосування методів фільтрації в даному випадку є не доцільним, оскільки через високу вартість процесів та низьку швидкість протікання процес буде не ефективним. Ефективним є метод випарювання, оскільки він дозволяє видалити розчинник з метою кристалізації субстанції та випадіння її в осад. Під час процесу випарювання за температур нижчих за температуру кипіння відбувається видалення розчинника з усього об'єму розчину, а випаровування рідини здійснюється лише з верхнього шару розчину. Випарювання має ряд переваг порівняно із мембранними процесами:

- ✓ регенерація теплоносія і використання у виробництві;
- ✓ простота технології;
- ✓ висока продуктивність випарних установок
- ✓ ефективність;
- ✓ розчини не потребують ретельної підготовки та очищення;
- ✓ низькі енергетичні витрати [57].

Тому через свою простоту, швидкість, ефективність та легкість обираємо даний метод.

Обладнанням для процесу випарювання слугують випарні установки, які повинні забезпечити високу продуктивність, високу якість готової продукції, усталену роботу та характеризуватися низькими енергетичними витратами. Процес випарювання проводять періодично або безперервно. При періодичному випарюванні в апарат завантажують розчин, випарюють до необхідної концентрації, а потім випускають у ємність для зберігання. В цей час апарат наповнюють новим свіжим розчином і процес повторюють. Безперервний процес випарювання характеризується здійсненням всіх операцій без зупину: подача свіжого розчину, відведення концентрованого

розчину, подача пари та відведення відпрацьованого пару. Отже, обираємо однокорпусну випарну установку, яку використовують у випадку, якщо продуктивність установки невелика і вона працює у періодичному режимі. Випаровування під вакуумом має деякі переваги, основними з яких є: зниження температури кипіння розчину, що випаровується, а також можливість використання водяної пари низького тиску для обігрівання гріючої камери випарного апарата [57,49].

### *3.7.5 Вибір способу сушіння та сушарки*

Даний процес нерідко є кінцевим етапом при очищенні вітамінів. Основним методом сушіння продуктів мікробіологічного синтезу є теплове при атмосферному тиску, під вакуумом або під глибоким вакуумом при температурах в інтервалі від -30 до +60°C. Можливе сушіння в електромагнітному полі, але внаслідок високої вартості установок для діелектричного нагрівання для зневоднювання продуктів мікробіологічного синтезу майже не використовують. Методи сушіння:

- конвективне сушіння;
- контактне сушіння;
- терморадіаційне;
- сушіння при нагріванні струмами високих частот;
- акустичний метод сушіння;
- сублімаційне сушіння і ін.

Наведені методи мають свої переваги та недоліки, орієнтовані на специфічні речовини та технологічні процеси, проте при виборі способу сушіння, передусім, потрібно звернути увагу на властивості цільового продукту та можливість використання даного типу сушіння [23,9].

Для висушування ціанкобаламіну використовують розпилювальні установки та вакуум-сушильні шафи. Розпилюючі сушильні апарати застосовують в тих випадках, коли продукт не витримує тривалого впливу високої температури. Сушіння в даних апаратах відбувається протягом декількох секунд, через що термолабільні продукти не встигають

руйнуватися в процесі сушіння. За допомогою даного типу сушарок можна швидко та якісно висушити великі об'єми розчинів та отримати відразу сухий препарат у подрібненому вигляді. Проте використання розпилюючої сушарки є недоцільним, оскільки продуктивність виробництва вітаміну В<sub>12</sub> є невеликою, то достатньо буде використати сушильну шафу.

Таким чином, зважаючи на відносно невеликий вихід ціанокобаламіну, використовуємо вакуум-сушильну шафу, яка є простою у експлуатації, не потребує значних витрат електроенергії та не відбувається великих втрат. Інші сушильні установки не доцільно використовувати через високу температуру сушіння, що негативно впливає на якість кінцевого продукту. При висушуванні отримують порошок або кристали вітаміну, які потім розчиняють у відповідному розчиннику до потрібної концентрації [58,59].

### *3.7.6 Обґрунтування стадії пакування цільового продукту*

При виборі упаковки необхідно обирати таку тару, яка захищала б цільовий продукт від пошкоджень, сприяла безпечному транспортуванню, збереженню та продажу. Враховуючи те, що готовий продукт ми отримуємо у вигляді порошку, то його потрібно пакувати у тару, яка б могла захищати його від вологи та впливу температури. В даному випадку обираємо для пакування пакети типу «подушка» («pillow bag») - об'ємні трьохшовні полімерні пакет з одним поздовжнім швом і двома поперечними. Мають рівні співвідношення довжини і ширини або незначне перевищення довжини над шириною. Є найбільш простою і поширеною формою упаковки для середніх доз продукту - від 20 до 5 000 грам/мл.

Трьохшовний пакет є герметичним і захищає товар від вологи, має високу швидкість та простоту виготовлення, надає зручне збереження продукту, а також є економним варіантом пакування. Тому така упаковка використовується для багатьох товарних груп в харчовій, косметичній, фармацевтичній промисловості [60].

## РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ

Згідно з ТЕО для забезпечення потреби у вітаміні необхідно виробляти 4 кг щорічно. Продуктивність продуцента становить ( $P_{кр}$ ): 59,5 мг/л (приймаємо 60 мг на літр або ж 0,06 г/л). Вологість сухого продукту 8 %, відповідно абсолютно сухої її буде  $CP_{біом} = 92\%$ . Втрати при виробництві становлять близько 30%. Культивування проходить впродовж 160 годин. Максимальна кількість ціанокобаламіну накопичується при культивуванні штаму *Propionibacterim freudenreichii CICC 10019* на середовищі наступного складу (г/л):

- $C_1$  Глюкоза – 60;
- $C_2$  Кукурудзяний екстракт – 40;
- $C_3$   $KH_2PO_4$  – 4,6;
- $C_4$   $CoCl_2$  – 0,012;
- $C_5$  5,6-Диметилбензімідазол – 0,9

Всього  $C_{\Sigma n} = 105,512$  г/л.

Для вирощування посівного матеріалу використовують середовище наступного складу (г/л):

- $C_1$  Глюкоза – 35;
- $C_2$  Кукурудзяний екстракт – 21;
- $C_3$   $KH_2PO_4$  – 4;
- $C_4$   $CoCl_2$  – 0,005;
- $C_5$   $(NH_4)_2SO_4$  – 5;

Всього  $C_{\Sigma n} = 65,005$  г/л.

Приймаємо наступні показники для подальшого розрахунку:

- Час роботи ферментера  $T_{цф} = 170$  год (включає в себе допоміжні стадії тривалістю 10 годин та 160 годин ферментації);

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.13 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Волинець О.В				Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.	Стабніков В.П.				50	16		
Консульт.					<b>Кафедра БТМ</b>			
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							
					<b>Розділ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання</b>			

- $K_1=1,1$  – коефіцієнт запасу часу, що враховує можливість нестерильних операцій;
- Сумарні втрати продукту при виробництві  $E_{св} = 0,30$ ;
- Вологість продукту 8 % (сухість 92%);
- Коефіцієнт заповнення ферментера  $K_{ф} = 0,6$ ;
- Коефіцієнт заповнення колб  $K_{кол} = 0,2$ ;
- Коефіцієнт заповнення збірника  $K_{зб} = 0,7-0,9$ .

### 6.1. Розрахунок кількості виробничих циклів

1) Кількість сухого ціанокобаламіну за добу, з урахуванням кількості трудоднів ( $T_{дн} = 200$ ):

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{дн} = 4,02 / 200 = 0,0201 \text{ кг / добу}$$

2) Кількість продукту за цикл:

$$V_{цикл} = (G_{нтд} \times T_{цф}) / 24 = (0,0201 \times 170) / 24 = 0,1423 \text{ кг /цикл}$$

3) Об'єм культуральної рідини за цикл з урахуванням втрат ( $E_{св} = 30\%$ ):

$$V_{кр} = (K_1 \times V_{цикл} \times CP_{біом}) / (1 - E_{св}) \times P_{кр} = (1,2 \times 0,1423 \times 0,92) / (1 - 0,30) \times 0,00006 = 3738 \text{ л/цикл} = 3,74 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

4) Кількість циклів ферментації:

$$N_{цикл} = G_{нд} / V_{цикл} = 4,02 / 0,1423 = 28,2 \approx 28 \text{ циклів}$$

5) Вихід препарату у кг з  $1 \text{ м}^3$  культуральної рідини:

$$P_{кр} = A_{цикл} / V_{кр} = 0,1423 / 3,74 = 0,04 \text{ кг}$$

$T_{цф}$  – цикл роботи ферментера, а саме 170 год, що включає: час біосинтезу (160 год) та час підготовки ферментера (10 год, сюди входить миття та огляд - 2 год, перевірка на герметичність - 2 год, стерилізація – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів - 0,5 год, вивантаження культуральної рідини - 1 год.),  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій.

Для отримання 3740 л культуральної рідини обираємо ферментер, геометричний об'єм становить (коефіцієнт заповнення 0,6):

$$V_p = V_{кр} / K_{зап} = 3,74 / 0,6 = 6,23 \text{ м}^3$$

Звідси найближчий об'єм ферментера = 6300 л. Перераховуємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = V_{кр}/V_p = 3,74/6,3 = 0,59 \text{ (не перевищує заданого значення).}$$

## 6.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ

### 1) Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>

За один виробничий цикл одержують 3,74 м<sup>3</sup> культуральної рідини. В результаті краплевиносу через колектор E<sub>ф</sub> (10-15 %) спостерігаються втрати культуральної рідини, тому приймаємо кількість втрат за 10%. Отже, перед виробничим біосинтезом кількість посівного матеріалу та поживного середовища становить:

$$V_{роб1} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 3,74/(1-0,1) = 4,15 \text{ м}^3$$

Звідси можливий геометричний об'єм ферментера:

$$V_{ф} = V_{роб1}/K_{зап} = 4,15/0,6 = 6,91 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментер об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>. Далі уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = 4,15/6,3 = 0,66$$

Враховуючи поправку на інокулят (X<sub>ф</sub> = 10%), кількість поживного середовища у ферментері становить:

$$V_{пс1} = V_{роб1}/(1+X_{ф}) = 4,15/(1+0,1) = 3,77 \text{ м}^3$$

Відповідно кількість посівного матеріалу:

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 4,15 - 3,77 = 0,38 \text{ м}^3$$

Отже, на визначений об'єм поживного середовища загальні витрати компонентів складають:

$$G_{ф} = V_{псф} \times C_{\Sigmaф} = 105,512 \times 4,15 = 437,87 \text{ кг, а саме (кг):}$$

$$\text{Глюкоза } G_1 = G_{ф} \times C_1/C_{\Sigmaф} = 437,87 \times 60/105,512 = 249;$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт } G_2 = G_{ф} \times C_2/C_{\Sigmaф} = 437,87 \times 40/105,512 = 166 ;$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } G_3 = G_{ф} \times C_3/C_{\Sigmaф} = 437,87 \times 4,6/105,512 = 19,1;$$

$$\text{CoCl}_2 \text{ } G_4 = G_{ф} \times C_4/C_{\Sigmaф} = 437,87 \times 0,012/105,512 = 0,05;$$

$$\text{5,6-Диметилбензімідазол } G_5 = G_{ф} \times C_6/C_{\Sigmaф} = 437,87 \times 0,9/105,512 = 3,735;$$

Кількість конденсату у ферментері з наданим об'ємом поживного середовища:

$$V_{\text{фк}} = 3,77 \times 0,1 = 0,377 \text{ м}^3.$$

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища становить:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 3,77 - 0,43787 - 0,377 = 2,95 \text{ м}^3 (2950 \text{ л})$$

**Склад композицій для стерилізації 3,77 м<sup>3</sup> поживного середовища для ферментера об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>**

Таблиця 6.2.1

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 3770 л середовища, кг, л	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Глюкоза	60	249	А	2415
Кукурудзяний екстракт	40	166		
Вода	2000			
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	4,6	19,1	Б	954,15
СоСL <sub>2</sub>	0,012	0,05		
Вода	935			
5,6-ДМБ	0,9	3,7	В	23,7
Вода	20			
Загальний конденсат	<b>377</b>			
<b>Сума Σ</b>	105,512	3770	-	<b>3770</b>

2) Біосинтез у ферментері об'ємом 630 л

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у ферментері становитиме:

$$V_{\text{роб}2} = V_{\text{пм}1} / (1 - E_{\text{па}}) = 0,38 / (1 - 0,1) = 0,422 \text{ м}^3$$

Враховуючи поправку на інокулят ( $X_{\text{ф}}=10\%$ ) кількість поживного середовища у ферментері становить:

$$V_{\text{пс}2} = V_{\text{роб}2} / (1 + X_{\text{ПА}}) = 0,422 / (1 + 0,1) = 0,383 \text{ м}^3$$

Відповідно кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 0,422 - 0,383 = 0,039 \text{ м}^3 = 39 \text{ л}$$

Отже, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища складають:

$$G_{\phi} = V_{\text{псф}} \times C_{\Sigma\phi} = 65,005 \times 0,422 = 27,43 \text{ кг, а саме (кг):}$$

$$\text{Глюкоза } G_1 = G_{\phi} \times C_1 / C_{\Sigma\phi} = 27,43 \times 35 / 65,005 = 14,77;$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт } G_2 = G_{\phi} \times C_2 / C_{\Sigma\phi} = 27,43 \times 21 / 65,005 = 8,86;$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } G_3 = G_{\phi} \times C_3 / C_{\Sigma\phi} = 27,43 \times 4 / 65,005 = 1,69;$$

$$\text{CoCl}_2 \text{ } G_4 = G_{\phi} \times C_4 / C_{\Sigma\phi} = 27,43 \times 0,005 / 65,005 = 0,002;$$

$$\text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \text{ } G_5 = G_{\phi} \times C_5 / C_{\Sigma\phi} = 27,43 \times 5 / 65,005 = 2,11;$$

Кількість конденсату, враховуючи об'єм поживного середовища у ферментері:

$$V_{\text{фк}} = 0,383 \times 0,1 = 0,0383 \text{ м}^3$$

Звідси кількість води, яка необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\phi} - V_{\text{фк}} = 0,383 - 0,0383 - 0,02743 = 0,317 \text{ м}^3 (317 \text{ л}).$$

**Склад композицій для стерилізації 383 л поживного середовища ферментера об'ємом 630 л**

*Таблиця 6.2.2*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 383 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Глюкоза	35	14,77	А	142
Кукурудзяний екстракт	21	8,86		
Вода	118,9			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4	1,69	Б	201,9
CoCl <sub>2</sub>	0,005	0,002		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	2,11		
Вода	198,1			
<i>Загальний конденсат</i>	<b>38,3</b>			
<b>Сума Σ</b>	65,005	383	-	<b>383</b>

3) Біосинтез у посівному апараті об'ємом 63 л.

Враховуючи втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%), кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становить:

$$V_{\text{роб } 3} = V_{\text{пм}3} / (1 - E_{\text{па}}) = 39 / (1 - 0,1) = 43,3 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища з поправкою на інокулят ( $X_{\text{ф}}=10\%$ ):

$$V_{\text{пс}3} = V_{\text{роб}3} / (1 + X_{\text{ПА}}) = 43,3 / (1 + 0,1) = 39,36 \text{ л}$$

Відповідно кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм}3} = V_{\text{роб}3} - V_{\text{пс}3} = 43,3 - 39,36 = 3,94 \text{ л}$$

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища складають:

$$G_{\text{ф}} = V_{\text{псф}} \times C_{\Sigma\text{ф}} = 65,005 \times 43,3 = 2815 \text{ г, а саме (г):}$$

$$\text{Глюкоза } G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 2815 \times 35 / 65,005 = 1515,5;$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт } G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 2815 \times 21 / 65,005 = 909,3 ;$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 2815 \times 4 / 65,005 = 173,2;$$

$$\text{CoCl}_2 \text{ } G_4 = G_{\text{ф}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 2815 \times 0,005 / 65,005 = 0,22;$$

$$\text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \text{ } G_5 = G_{\text{ф}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 2815 \times 5 / 65,005 = 216,5;$$

Кількість утвореного конденсату для 39,36 л поживного середовища у посівному апараті становить:

$$V_{\text{фк}} = 39,36 \times 0,1 = 3,936 \text{ л.}$$

Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 39,36 - 3,936 - 2,815 = 32,6 \text{ л}$$

**Склад композицій для стерилізації 39,36 л поживного середовища  
для посівного апарата об'ємом 63 л**

*Таблиця 6.2.3*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 39,36 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Глюкоза	35	1,516	А	15,23
Кукурудзяний екстракт	21	0,909		
Вода	12,8			
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	4	0,1732	Б	20,2
СоСL <sub>2</sub>	0,005	0,00022		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	0,2165		
Вода	19,8			
<i>Загальний конденсат</i>	<b>3,93</b>			
<b>Сума Σ</b>	<b>65,005</b>	<b>39,36</b>	-	<b>39,36</b>

*4) Біосинтез в інокуляторі об'ємом 6,3 л*

Для одержання 3,94 л посівного матеріалу, враховуючи втрати у результаті краплевиносу, кількість поживного середовища та посівного матеріалу становить:

$$V_{роб4} = V_{пм3} / (1 - E_{па}) = 3,94 / (1 - 0,1) = 4,37 \text{ л}$$

Враховуючи поправку на інокулят ( $X_{ф}=10\%$ ), кількість поживного середовища становить:

$$V_{пс4} = V_{роб4} / (1 + X_{ПА}) = 4,37 / (1 + 0,1) = 3,97 \text{ л}$$

Відповідно кількість посівного матеріалу становить:

$$4,37 - 3,97 \text{ л} = 0,4 \text{ л (400 мл)}$$

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища складають:

$$G_{ф} = V_{псф} \times C_{\Sigma ф} = 65,005 \times 4,37 = 284,1 \text{ г, а саме (г):}$$

$$\text{Глюкоза } G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 284,1 \times 35 / 65,005 = 153;$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт } G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 284,1 \times 21 / 65,005 = 91,77 ;$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 284,1 \times 4 / 65,005 = 17,48;$$

$$\text{CoCl}_2 \text{ } G_4 = G_{\text{ф}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 284,1 \times 0,005 / 65,005 = 0,022;$$

$$\text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \text{ } G_5 = G_{\text{ф}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 284,1 \times 5 / 65,005 = 21,85;$$

Оскільки конденсат буде відсутній (компоненти поживного середовища стерилізуються в колбах в автоклаві), то розраховуємо лише кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 3,97 - 0,2841 = 3,686 \text{ л, .}$$

**Склад композицій для стерилізації 3,97 л поживного середовища для посівного апарата об'ємом 6,3 л**

*Таблиця 6.2.4*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 3970 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
1	2	3	4	5
Глюкоза	35	153	А	1937
Кукурудзяний екстракт	21	91,77		
Вода	1692,3			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4	17,48	Б	1520
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	21,85		
Вода	1481			
CoCl <sub>2</sub>	0,005	0,022	В	513
Вода	512,98			
Загальний конденсат	-			
<b>Сума Σ</b>	<b>65,005</b>	<b>3970</b>	<b>-</b>	<b>3970</b>

5) Приготування та стерилізація поживного середовища в колбах на качалках.

Кількість поживного середовища становить 400 мл. Кількість засівного матеріалу для 400 мл становить 40 мл суспензійної культури. Відповідно кількість поживного середовища становить 360 мл. Дану кількість посівного

матеріалу одержують у колбах об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу:

$$N = V_{\text{пм}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 400 / (750 \times 0,2) = 2,44 \text{ обираємо } 3 \text{ штуки.}$$

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища складають:

$$G_{\text{ф}} = V_{\text{псф}} \times C_{\Sigma\text{ф}} = 65,005 \times 0,4 = 26 \text{ г, а саме (г):}$$

$$\text{Глюкоза } G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 26 \times 35 / 65,005 = 14;$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт } G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 26 \times 21 / 65,005 = 8,4 ;$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 26 \times 4 / 65,005 = 1,6;$$

$$\text{CoCl}_2 \text{ } G_4 = G_{\text{ф}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 26 \times 0,005 / 65,005 = 0,02;$$

$$\text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \text{ } G_5 = G_{\text{ф}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 26 \times 5 / 65,005 = 2;$$

Конденсат буде відсутній (компоненти поживного середовища стерилізуються в колбах), тому розраховуємо кількість води необхідної для розбавлення:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 360 - 26 = 334 \text{ мл.}$$

**Склад композицій для стерилізації 360 мл поживного середовища у колбах на качалках**

*Таблиця 6.2.5*

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, кг/м <sup>3</sup>	Вміст компонента в 360 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
1	2	3	4	5
Глюкоза	35	14	А	140
Кукурудзяний екстракт	21	8,4		
Вода	117,6			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4	1,6	Б	201,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	2		
Вода	198,2			
CoCL <sub>2</sub>	0,005	0,002	В	18,2
Вода	18,198			
<b>Сума Σ</b>	<b>65,005</b>	<b>360</b>		

### 6.3 Матеріальний баланс на один цикл виробництва

Таблиця 6.3.6

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг(г), л(мл)	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг(г), л(мл)
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛЦІ (МЛ, Г)			
1.1	Глюкоза	14	Нестерильне ПС	360
1.2	Кукурудзян.екстракт	8,4		
1.3	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1,6		
1.4	СоСL <sub>2</sub>	0,002		
1.5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2		
1.6	Вода	334		
1.7	Всього:	<b>360</b>	Всього:	<b>360</b>
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (МЛ)			
2.1	Нестерильне ПС	360	Стерильне ПС	360
2.2	Всього:	<b>360</b>	Всього:	<b>360</b>
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛЦІ (МЛ)			
3.1	Стерильне ПС	360	Посівний матеріал	400
3.2	Посівний матеріал	40		
3.3	Всього:	<b>400</b>	Всього:	<b>400</b>
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА НА 6,3 Л (Г, МЛ)			
4.1	Глюкоза	153	Нестерильне ПС	3970
4.2	Кукурудзян.екстракт	91,77		
4.3	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	17,48		

## Продовження таблиці 6.3.6

4.4	CoCl <sub>2</sub>	0,022		
4.5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	21,85		
4.6	Вода	3686		
4.7	<b>Всього:</b>	<b>3970</b>	<b>Всього:</b>	<b>3970</b>
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА НА 6,3 л (МЛ)			
5.1	Нестерильне ПС	3970	Стерильне ПС	3970
5.2	Конденсат	0	(втрат немає)	0,0
5.3	<b>Всього:</b>	<b>3970</b>	<b>Всього:</b>	<b>3970</b>
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ НА 6,3 Л (МЛ)			
6.1	Стерильне ПС	3970	Посівний матеріал	3940
6.2	ПМ з колб	400		
6.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	430
6.4	<b>Всього:</b>	<b>4370</b>	<b>Всього:</b>	<b>4370</b>
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ НА 63 Л (КГ, Л)			
7.1	Глюкоза	1,516	Нестерильне ПС	35,42
7.2	Кукурудзян.екстракт	0,909		
7.3	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	0,1732		
7.4	CoCl <sub>2</sub>	0,00022		
7.5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,217		
7.6	Вода	32,6		
7.7	<b>Всього:</b>	<b>35,42</b>	<b>Всього:</b>	<b>35,42</b>
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ НА 63 Л (Л)			
8.1	Нестерильне ПС	35,42	Стерильне ПС	39,36
8.2	Конденсат	3,936	(втрат немає)	0,0

8.3	Всього:	39,36	Всього:	39,36
9.	ОДЕРЖАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 63 л			
9.1	Стерильне ПС	39,36	Посівний матеріал	39
9.2	ПМ інокулятора	3,94		
9.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	4,3
9.4	Всього:	<b>43,3</b>	Всього:	<b>43,3</b>
10.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 0,63 М <sup>3</sup> (КГ, Л)			
10.1	Глюкоза	14,77	Нестерильне ПС	344,6
10.2	Кукурудзян.екстракт	8,86		
10.3	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1,69		
10.4	СоСL <sub>2</sub>	0,002		
10.5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,11		
10.6	Вода	317		
10.7	Всього:	<b>344,6</b>	Всього:	<b>344,6</b>
12.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 0,63 М <sup>3</sup> (КГ, Л)			
12.1.	Нестерильне ПС	344,6	Стерильне ПС	383
12.2	Конденсат	38,3	(втрат немає)	0,0
12.3	Всього:	<b>383</b>	Всього:	<b>383</b>
13.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 0,63 М <sup>3</sup> (Л)			
13.1.	Стерильне ПС	383	Посівний матеріал	380
13.2.	Посівний матеріал	39		

Продовження таблиці 6.3.6

13.3	Втрати	0,1	Втрати (кількість)	42
13.4	Всього:	<b>422</b>	Всього:	<b>422</b>
14.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ ЦІАНОКОБАЛАМІНУ (КГ, Л)			
14.1.	Глюкоза	249	Нестерильне ПС	3393
14.2	Кукурудзян.екстракт	166		
14.3.	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	19,1		
14.4.	СоСL <sub>2</sub>	0,05		
14.5.	5,6- ДМБ	3,735		
14.7	Вода	2957		
14.8	<b>Всього:</b>	<b>3393</b>	<b>Всього:</b>	<b>3393</b>
15.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ ЦІАНОКОБАЛАМІНУ (М <sup>3</sup> )			
15.1.	Нестерильне ПС	3393	Стерильне ПС	3770
15.2.	Конденсат	377	(втрат немає)	0,0
15.3	Всього:	<b>3770</b>	Всього:	<b>3770</b>
16.	БІОСИНТЕЗ ВІТАМІНУ В <sub>12</sub> ВИРОБНИЧОМУ ФЕРМЕНТЕРІ НА НА 6,3 М <sup>3</sup>			
16.1.	Стерильне ПС	3770	Культуральна рідина	3740
16.3.	ПМ з посів. апарата	380		
16.4.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	410
16.5	Всього:	<b>4150</b>	Всього:	<b>4150</b>

## 6.4. Розрахунок технологічного обладнання

### 6.4.1 Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання

1) Уточнюючий розрахунок ферментеру об'ємом 6300 л

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому коефіцієнті заповнення:

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{ф}}/K_3 = 4,15/0,6 = 6,91 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментер об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>. Кількість виробничих ферментерів при заданому K<sub>3</sub>:

$$N_{\text{фр}} = V_{\text{гф}}/V_{\text{нф}} = 6,9/6,3 = 1,09$$

Приймаємо 1 ферментер. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{3\text{ф}} = V_{\text{ф}}/(V_{\text{нф}} \times N_{\text{фр}}) = 4,15/(6,3 \times 1) = 0,66$$

2) Уточнюючий розрахунок ферментеру об'ємом 630 л (кількість ПМ і ПС становить 422 л)

При заданому K<sub>3</sub> = 0,6 приблизний загальний геометричний об'єм ферментера становить:

$$V_{\text{гін}} = V_{\text{ін}}/K_3 = 0,422/0,6 = 0,703 \text{ м}^3.$$

Обираємо ферментер об'ємом 630 л. Кількість ферментерів при заданому коефіцієнті:

$$N_{\text{інр}} = V_{\text{гін}}/V_{\text{нін}} = 0,703/0,6 = 1,1 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{3\text{ін}} = V_{\text{ін}}/(V_{\text{нін}} \times N_{\text{інр}}) = 0,422/(0,63 \times 1) = 0,67 \text{ (не перевищує задані межі } 0,5-0,7)$$

3) Уточнюючий розрахунок посівного апарату об'ємом 63 л (кількість ПМ і ПС становить 43,3 л)

При заданому K<sub>3</sub> = 0,6 приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата становить:

$$V_{\text{гін}} = V_{\text{ін}}/K_3 = 43,3/0,6 = 72,16 \text{ л.}$$

Обираємо посівний апарат на 63 л та розраховуємо кількість апаратів при заданому коефіцієнті заповнення:

$$N_{\text{інр}} = V_{\text{гін}}/V_{\text{нін}} = 72,16/63 = 1,14$$

Приймаємо 1 апарат. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зін} = V_{ін}/(V_{нін}N_{інр}) = 43,3/(63 \times 1) = 0,68 \text{ (коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі 0,5-0,7).}$$

4) *Уточнюючий розрахунок інокулятора об'ємом 6,3 л (кількість ПМ і ПС становить 4,37л)*

Геометричний об'єм інокулятора при заданому  $K_3 = 0,6$ :

$$V_{гін} = V_{ін}/K_3 = 4,37/0,6 = 7,28 \text{ л.}$$

Обираємо інокулятор на 6,3 л. Кількість апаратів при заданому  $K_{зін}$ :

$$N_{інр} = V_{гін}/V_{нін} = 7,28/6,3 = 1,15$$

Приймаємо 1 апарат. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зін} = V_{ін}/(V_{нін} \times N_{інр}) = 4,37/(6,3 \times 1) = 0,69 \text{ (не перевищує задані межі (0,5-0,7).)}$$

5) *Уточнюючий розрахунок кількості колб*

Приблизний об'єм колб при заданому коефіцієнті заповнення 0,2:

$$V_{гколб} = V_{колб}/K_{колб} = 400/0,2 = 2000 \text{ мл}$$

Об'єм 1 колби становить 750 мл, відповідно кількість колб:

$$N_{колб} = V_{гколб}/V_{нколб} = 2000/750 = 2,66 \approx 3 \text{ колби}$$

#### **6.4.2 Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для біосинтезу**

1) *Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для біосинтезу у ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>*

Для **композиції А** приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,7 \dots 0,9$  становить:

$$V_{Апа} = V_A/K_{зб} = 2,41/0,7 = 3,44 \text{ м}^3$$

Обираємо реактор-змішувач місткістю 4 м<sup>3</sup>. Кількість реакторів при заданому коефіцієнті заповнення становить:

$$N_p = V_{Апа}/V_{рст} = 3,44/4 = 0,86$$

Приймаємо 1 апарат. Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст} \times N_p) = 3,44/4 \cdot 1 = 0,86 \text{ (лежить в межах 0,7 – 0,9).}$$

Для **композиції Б** приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при  $K_{зб} = 0,7 \dots 0,9$  становить:

$$V_{\text{Бпа}} = V_{\text{Б}}/K_{зб} = 0,954/0,7 = 1,36 \text{ м}^3$$

Обираємо реактор-змішувач об'ємом  $2 \text{ м}^3$ . Кількість реакторів при заданому коефіцієнті заповнення становить :

$$N_{\text{р}} = V_{\text{Бпа}}/V_{\text{рст}} = 1,36/2 = 0,7$$

Приймаємо 1. Уточнюємо коефіцієнт  $K_{зб}$ :

$$K_{зр} = V_{\text{Бпа}}/(V_{\text{рст}} \times N_{\text{р}}) = 1,36/2 \cdot 1 = 0,7 \text{ (відповідає необхідній межі } 0,7 - 0,9\text{)}.$$

Для **композиції В** при заданому  $K_{зб} = 0,7 \dots 0,9$  приблизний геометричний об'єм реактора становить:

$$V_{\text{Впа}} = V_{\text{В}}/K_{зб} = 23,37/0,7 = 33,38$$

Обираємо реактор об'ємом  $50 \text{ л}$ . Кількість реакторів при заданому коефіцієнті заповнення становить:

$$N_{\text{р}} = V_{\text{Впа}}/V_{\text{рст}} = 33,38/50 = 0,7$$

Приймаємо 1 реактор-змішувач для композиції В. Уточнюємо коефіцієнт заповнення :

$$K_{зр} = V_{\text{Впа}}/(V_{\text{рст}} \times N_{\text{р}}) = 33,38/50 \cdot 1 = 0,7$$

2) *Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для біосинтезу у фермері об'ємом  $630 \text{ л}$*

Для **композиції А** при заданому  $K_{зб} = 0,7 \dots 0,9$  приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача становить:

$$V_{\text{Апа}} = V_{\text{А}}/K_{зб} = 142,53/0,7 = 203,6 \text{ л}.$$

Обираємо реактор на  $250 \text{ л}$  фірми. Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$  становить:

$$N_{\text{р}} = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 203,6/250 = 0,81$$

Для приготування композиції А устанавлюємо 1 реактор-змішувач. Уточнюємо  $K_{з}$  реактора :

$$K_{з} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_{\text{р}}) = 203,6/(250 \times 1) = 0,8 \text{ (лежить в заданих межах } 0,7 - 0,9\text{)}$$

Для **композиції Б** при заданому  $K_{зб} = 0,6 \dots 0,9$  приблизний геометричний об'єм реактора становить:

$$V_{\text{Бпа}} = V_{\text{Б}}/K_{зб} = 201,9/0,7 = 0,24 \text{ м}^3$$

Обираємо реактор на 250 л. Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$  становить:

$$N_p = V_{\text{Бпа}}/V_{\text{рст}} = 240/250 = 0,9$$

Приймаємо 1 реактор для установки. Уточнюємо  $K_z$  реактора:

$$K_{зр} = V_{\text{Бпа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 240/(250 \times 1) = 0,9 \text{ (лежить в заданих межах } 0,6 - 0,9).$$

*3) Уточнюючий розрахунок реакторів-змішувачів для біосинтезу у ферментері на 63 л*

Для **композиції А** при заданому  $K_{зб} = 0,7 \dots 0,9$  приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача:

$$V_{\text{Апа}} = V_{\text{А}}/K_{зб} = 15,23/0,7 = 21,81 \text{ л.}$$

Обираємо реактор об'ємом 30 л. Кількість реакторів при заданому коефіцієнті заповнення становить:

$$N_p = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 21,81/30 = 0,72$$

Для приготування композиції А установлюємо 1 реактор-змішувач. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зр} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 21,81/(30 \times 1) = 0,72 \text{ (лежить в заданих межах } 0,7 - 0,9)$$

Для **композиції Б** при заданому  $K_{зб} = 0,7 \dots 0,9$  приблизний геометричний об'єм реактора становить:

$$V_{\text{Бпа}} = V_{\text{Б}}/K_{зб} = 20,2/0,7 = 28,8 \text{ л}$$

Обираємо реактор об'ємом 30 л. Відповідно кількість реакторів при даному коефіцієнті заповнення становить:

$$N_p = V_{\text{Бпа}}/V_{\text{рст}} = 28,8/30 = 0,96$$

Приймаємо 1. Уточнюємо  $K_z$  реактора:

$$K_{зр} = V_{\text{Бпа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 28,8/(30 \times 1) = 0,96$$

Для приготування композиції Б установлюємо 1 реактор-змішувач.

## РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (наведена у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

### Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
P-1	Реактор для приготування кислоти соляної	1	Об'єм 30 л. Матеріал:нержавіюча сталь. Габарити,мм: L=700,В=1200, Н=1500. Виробник:«Промвіт»,Україна <sup>[1]</sup>
P-2	Реактор для приготування та стерилізації гідроксиду натрію	1	Об'єм 30 л. Матеріал: нержавіюча сталь, габарити,мм: L=700,В=1200, Н=1500 Виробник:«Промвіт»,Україна <sup>[1]</sup>
СІР-3	Автоматизована СІР станція	1	2 резервуари по 1000 л <sup>[3]</sup>
P-12	Реактор для приготування та стерилізації композиції А	1	Об'єм 50 л. Матеріал: нержавіюча сталь, габарити,мм: L=810, В=590, Н=1050. Виробник:«Промвіт»,Україна <sup>[1]</sup>
P-13	Реактор для приготування композиції Б	1	Об'єм 50 л, габарити,мм: L=810, В=590, Н=1050 Виробник:«Промвіт»,Україна <sup>[1]</sup>
P-14	Реактор для приготування та стерилізації композиції А	1	«Об'єм 250 л,габарити,мм: L=1600, В=1450, Н=1920. Виробник:«Промвіт»,Україна <sup>[1]</sup>
P-15	Реактор для приготування композиції Б	1	Об'єм 250 л,габарити,мм: L=1600, В=1450, Н=1920. Виробник:«Промвіт»,Україна <sup>[1]</sup>
P-16	Реактор для приготування композиції Б	1	Об'єм 4 м <sup>3</sup> , якорна мішалка. Габарити: D=1600 мм, Н=5222 мм, m=2250 кг. Виробник: «СЕРН» <sup>[2]</sup>
P-17	Реактор для приготування та стерилізації композиції А	1	Об'єм 4 м <sup>3</sup> , якорна мішалка. Габарити: D=1600 мм, Н=5222 мм, m=2250 кг. Виробник: «СЕРН» <sup>[2]</sup>

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.13 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Волинець О.В				<b>Розділ 7. Специфікація обладнання</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.						67	4
Консульт.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Продовження таблиці 7.1

1	2	3	4
P-36	Реактор для приготування та стерилізації розчину 5,6-ДМБ	1	Об'єм 300 л, магнітний привод. Габарити,мм: L=2510, B=2280, H=2740. Виробник: «Промвіт», Україна <sup>[1]</sup>
ФР-38	Ферментер	1	Об'єм 6,3л фірми «Біотехно», D=250, L=450 мм <sup>[4]</sup>
ФР-39	Ферментер	1	Об'єм 63 л фірми «Біотехно», m=440 кг, D=508, H=2130, L=890 мм <sup>[4]</sup>
ФР-40	Ферментер	1	Об'єм 630 л фірми «Біотехно», m=1062 кг, D=1000, H=2700, L=1300 мм <sup>[4]</sup>
ФР-41	Ферментер виробничий	1	Об'єм 6,3 м <sup>3</sup> фірми «Біотехно»,m=4515 кг, D=1800, H=4800, L=2330 мм <sup>[4]</sup>
P-47	Реактор для культуральної рідини	1	Об'єм 4,5м3. Матеріал – AISI 316 L. Виробник: Промвіт, м.Черкаси, Україна <sup>[1]</sup>
C-49,C-59	Сепаратор	2	Модель Clara 200, модуль VNPX 810SGV-34CGL. Швидкість оберт. барабана: 7488 об./хв. Робоча температура до 100 <sup>0</sup> C. Потужність – 25 м3/ч. Матеріал: нержавіюча сталь 316L. Виробник: «Біотехно», Росія <sup>[5]</sup>
P-51, P-55, P-61	Реактор-змішувач	3	Швидкість мішалки: 100об/хв. Матеріал: сталь AISI 316L, AISI304. Виробник: «Промввт», Україна <sup>[1]</sup>
P-56	Реактор-змішувач для проведення екстракції	1	Швидкість мішалки: 100об/хв. Матеріал: сталь AISI 316L AISI304. Виробник: «Промвіт», Україна <sup>[1]</sup>
Г-53	Гомогенізатор високого тиску для дезінтеграції клітин	1	Продуктивність: до 35 000 л/год. Температура: до 180 <sup>0</sup> C. Тиск: до 1000 бар. Розміри: 3,190x1,890x1,590 мм. Виробник: «ТАПФЛО», Україна <sup>[6]</sup>

Продовження таблиці 7.1

1	2	3	4
ВВУ-63	Вакуум-випарна установка	1	Об'єм: 500 л. Робочий тиск: 0,01-0,015 МПа. Продуктивність: до 100 л/год Виробник: «Агромаш» <sup>[7]</sup>
С-64	Вакуумна сушильна шафа	1	Тип: СВ-150, мінімальна температура: +5°C, максимальна температура нагріву 200°C, потужність 3100 Вт, напруга: 380 В Виробник: «UOSLab», Україна <sup>[8]</sup>
Др-65	Дробарка	1	Продуктивність: до 200 кг/год. Потужність електродвигуна 30 кВт. Виробник: «Фора-Захід», Україна <sup>[9]</sup>
ВС-66	Вібраційне сито	1	Модель: S49-1000. Потужність: 1,1-1,5 кВт. Діаметр просіювання Ø900 мм. Виробник: «LIMING» <sup>[10]</sup>
ДМ-67	Дозувальна машина	1	Модель: BD-45, швидкість пакування: 28-50 уп/хв, потужність: 380 В/50 Гц. Виробник: «MINIPRESS», Росія <sup>[11]</sup>
ПМ-67	Пакувальна машина	1	Автоматичні гравітаційні лінії для упаковки пакетів в коробки. Виробник: Турція. Продуктивність: 120 пак/хв. Вага машини 2.300 kg <sup>[12]</sup>
Д-57	Дозатори об'ємно-вагові	1	Дозатор об'ємно-ваговий «FOYER FM-500» вібрототковий прямої дії. Потужність: 0,15 кВт. Габарити: 400 x 280 x 530. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: «FOYER», Україна <sup>[13]</sup>
Н-48, Н-50, Н-52, Н-54, Н-58, Н-60, Н-62	Насос відцентровий	7	Стандартизований насос серії RD, потужність: 480 м3/год, тиск: 140 м.в.с, матеріал: нержавіюча сталь AISI 316 SS. Виробник: ТОВ «Ватерпас», Україна <sup>[14]</sup>
Ф-8, Ф-14, Ф-17, Ф-20, Ф-23, Ф-26, Ф-29, Ф-34, Ф-37, Ф-39, Ф-41, Ф-44	Фільтри індивідуальної очистки	12	Розмір пор 0,22 мкм. Максимальна температура 134 °С. Матеріал: поліпропілен. Максимальний тиск: 300 кПа Виробник: «MUNKTELL» <sup>[15]</sup>

**\*Примітка:** пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел:

1. <http://promvit.com.ua/>

2. <https://azovchemservice.prom.ua/g9180699-emalirovannyye-reaktora>
3. <https://prom.ua/p19778337-avtomaticheskie-stantsii-cip.html>
4. <https://www.biotechno.ru/catalog/fermentyery/>
5. <https://biotechno.ru/catalog/ceparatsiya/separatsionnaya-sistema-clara-200/>
6. <https://tapflo.ua/products/homogenizatory/rannie-gaulin>
7. [http://www.agro-mash.ru/260308\\_vak\\_vyp\\_yst.html](http://www.agro-mash.ru/260308_vak_vyp_yst.html)
8. [https://chemtest.com.ua/ua/vakuumnye\\_sushilnye\\_shkafy-sv-150-ua](https://chemtest.com.ua/ua/vakuumnye_sushilnye_shkafy-sv-150-ua)
9. <http://www.fora-zakhid.com.ua/ua/obladnannja/molotkova-drobarka/>
10. <https://www.zenitrus.ru/produkcija/sortirovochnoe-oborudovanie/vibracionnoe-sito/>
11. <https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/top-10-equipment-rating/powders-in-packaging/packed-in-a-bag-type-pillow-bd-28/>
12. <https://omela.ua/upakovka-v-kartonnii-korobki/avtomaticheskie-gravitacionnie-linii-dlya-upakovki-paketov-v-korobki>
13. <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fm-500>
14. [https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/standartizirovannyye/seriya\\_rd](https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/standartizirovannyye/seriya_rd)
15. <http://www.simas.ru/products/food/filters/ready/filtridlasterilnoiaearazii/>

## РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема отримання вітаміну В<sub>12</sub> бактеріями *Propionibacterim freudenreichii* СІСС 10019 складається з допоміжних робіт (підготовка виробництва та персоналу, приготування миючих розчинів, підготовка розчину для екстракції, приготування допоміжних розчинів НСІ та NaOH, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічного процесу (підготовка посівного матеріалу, біосинтез цінокобаламіну, відділення біомаси, дезінтеграція клітин, екстракція вітаміну В<sub>12</sub>, його концентрування, висушування, подрібнення та просіювання готового продукту, подальше його пакування). Технологічна та апаратурна схема одержання вітаміну В<sub>12</sub> *Propionibacterim freudenreichii* СІСС 10019 наведені у графічній частині проекту.

### ДР 1. Санітарна підготовка виробництва та персоналу

#### ДР1.1 Підготовка мийних та дезинфікуючих засобів

##### ДР 1.1.1. Приготування 2 % розчину хлорного вапна

Для дезинфекції та миття поверхонь приміщення використовують 2 % розчин хлорного вапна. На виробництво засіб приходить у вигляді порошку хлорного вапна, фасованого у мішки вагою 1 кг. Для щоденного прибирання необхідно 63,5 л, для цього у ємність об'ємом 100 л вносять відміряні на технічних вагах 1,27 кг концентрату хлорного вапна і додають 62,23 л питної води. Перемішують та одержують робочий розчин до застосування. Для генерального прибирання необхідно 253 л розчину, відповідно зважують 5 кг концентрату хлорного вапна і розводять у 248 л питної води. Готовий розчин подають на стадію ДР 1.2.1. та ДР 1.2.2.

##### ДР 1.1.2. Приготування 0,5% розчину «Бланідас-Ц»

Для миття та дезинфекції обладнання використовують 0,5 % робочий розчин «Бланідас-Ц». Даний засіб приходить на виробництво у вигляді

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.13 КР ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Волинець О.В.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.					71	17
Консульт.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.						
<b>Розділ 8. Опис технологічної схеми</b>							

концентрату в пластикових пляшках об'ємом 1 л та 20 л. Для приготування 1 л 0,5 % робочого розчину «Бланідас-Ц» необхідно 5 мл концентрату та 995 мл води питної. Для одного циклу роботи виробництва необхідно приготувати 6830 л даного засобу, відповідно кількість необхідного концентрату становить 34,15 л, а кількість питної води 6795,85 л. Відміряють необхідну кількість «Бланідас-Ц» та через об'ємно-ваговий дозатор (Д-9) вносять у збірник СІР-станції та додають 6795,85 л питної води. Готовий розчин подають на стадію ДР 1.3.1.

#### *ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень*

##### *ДР 1.2.1 Щоденне прибирання виробничих приміщень*

Прибирання виробничих приміщень проводиться виробничим персоналом та прибиральниками виробничих приміщень. Роботу виконують в технологічному одязі для працюючих у чистих приміщеннях, взутті і одноразових рукавичках за допомогою розчину хлорного вапна (від ДР 1.1.1). Після проведення прибирання виробничих приміщень робиться запис в журналі санітарної підготовки виробничих приміщень. Відпрацьований розчин направляється на знешкодження рідких відходів (до ЗВ 14.1).

##### *ДР 1.2.2 Генеральне прибирання виробничих приміщень*

Генеральне прибирання, яке включає в себе миття стін, вікон та дверей, проводять 1 раз на місяць, використовуючи розчин хлорного (від ДР 1.1.1). Також проводять прибирання і наведення порядку в шафах, стелажах, очищення та дезінфекційну обробку повітроводів і вентиляційних камер та виконують усі заходи щотижневої підготовки приміщень. Відпрацьований розчин направляється на знешкодження рідких відходів (до ЗВ 14.1).

#### *ДР 1.3 Підготовка обладнання*

##### *ДР 1.3.1 Миття обладнання*

Миття обладнання відбувається за допомогою СІР-станції (СІР-3). Мийка проводиться мийно-дезінфекційним розчином «Бланідас-Ц» (від ДР 1.1.2). Миття обладнання, яке герметично закрито зсередини, здійснюють подачею під тиском, через спеціальні розприскувачі, миючого розчину, який

готується в реакторах – збірниках СІР станції. Далі миючий розчин пропускають через реактор чи ферментер насосом через миючу насадочну голівку. Після миття здійснюють ополіскування очищеною водою з магістралі. Безпосередньо перед початком проведення технологічного процесу, реактор, установка та матеріальні лінії промивають очищеною водою та стерильним паром. Температура миття становить 80 °С. Відпрацьований миючий розчин направляється на знешкодження рідких відходів (до ЗВ 14.1).

#### *ДР 1.3.2 Ополіскування обладнання*

Ополіскування обладнання здійснюють протягом 10 хв за допомогою СІР-мийки (СІР-3). Вода подається через об'ємно-ваговий дозатор (Д-9). При попередньому ополіскуванні використовується оборотна вода з проміжною стадією ополіскування - для зниження загальної витрати води, кількості стічних вод. Проміжне ополіскування служить для видалення залишків миючого засобу разом із забрудненнями та для повернення якомога більшої кількості миючого засобу назад в резервуар. Воду зі стадії проміжного ополіскування можливо регенерувати і повторно використовувати для попереднього ополіскування в наступному циклі мийки. Друге проміжне ополіскування майже завжди здійснюють холодною водою питної якості, що особливо важливо при відсутності стадії дезінфекції. Остаточне ополіскування - холодною водою питної якості, що особливо важливо, щоб уникнути забруднення і обсіменіння продукту після дезінфекції. Відпрацьована вода направляється на стадію знешкодження рідких відходів (до ЗВ 14.1).

#### *ДР 1.3.3 Технічний огляд обладнання*

Технічний огляд апаратури проводять після миття та перед запуском процесу аби виявити присутність дефектів у ній, при яких герметичні деталі не можуть витримувати експлуатаційних навантажень. Для цього оглядають зовнішні частини: з'єднання трубопроводів, запірну арматуру, перевіряють наявність пошкоджень, потім роблять пробний запуск мішалки при

мінімальному заповненні водою, далі перевіряють інші справні елементи роботи апарату та програми керування ним. Після перевірки всіх параметрів перевіряють засоби контролю процесу.

#### *ДР 1.3.4 Перевірка на герметичність*

У герметично закритий апарат подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску (0,1-0,2-МПа). Потім перекривають прохід повітря і фіксують показання манометра протягом 40-60 хв. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа – апарат являється герметичним. Якщо ж дане значення перепаду тиску перевищує 0,01 МПа – проводять перевірку для знаходження місця розгерметизації. Остаточну перевірку герметичності апарату здійснюють за допомогою галоїдного течешукача. Для цього, перед набором тиску в апарат, вносять невелику кількість леткої галогеновмісної речовини (тетрахлоретан). Потім закривають герметично апарат, нагрівають до 30<sup>0</sup>С і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. При наблизенні щупа течешукача до виявлених нещільностей, пристрій буде подавати сигнал. Після цього знайдені пропуски усувають та проводять перевірку повторно.

#### *ДР 1.3.5 Стерилізація обладнання*

Ферментери та реактори стерилізують подачею гострої пари у середину апарата та у сорочку. Для цього спочатку здійснюють нагрів апарата до температури 80-90 <sup>0</sup>С за допомогою подачі глухої пари в сорочку апарата. Після цього відбувається процес стерилізації: відкривають усю запірну апаратуру, вентиль для відпрацьованого повітря та подають гостру пару в апарат. Температура стерилізації становить 135 <sup>0</sup>С. Далі закривають усю запірну апаратуру та витримують протягом 40 - 30 хвилин. Останнім етапом є охолодження апарата. Для цього подають стерильне повітря в апарат, а холодну воду в сорочку. Процес здійснюють до температури 40-35<sup>0</sup>С

#### *ДР 1.4 Підготовка персоналу*

Щорічно персонал повинен пройти медичний огляд, систематичне навчання щодо санітарно-гігієнічних вимог. Кожен працівник виробничого

цеху повинен бути забезпечений необхідними комплектами санітарного одягу, заміна якого проводиться щоденно або у міру забруднення. Перед початком роботи всі працівники повинні одягти чистий санітарний одяг, підібрати волосся під ковпак або шапочку, зняти з себе прикраси, ретельно вимити руки теплою водою з милом та продезінфікувати їх 75%-им етиловим спиртом.

## **ДР 2. Приготування та стерилізація розчинів титрувальних агентів для регулювання рН в процесі культивування**

### *ДР 2.1 Приготування 6 %-го розчину HCl*

Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів кобальту рН розчину з солями доводять до значення 4,5 6 %-вим розчином соляної кислоти. Для підкислення 1 л розчину необхідно 2 мл соляної кислоти. Для інокулятора об'ємом 63 л кількість композиції Б (розчин солей  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) становить 20,2 л, відповідно необхідний об'єм соляної кислоти:  $20,2 \times 2 = 40,4$  мл. На виробництво соляна кислота надходить у вигляді 32%-го концентрату у каністрах, тому спершу необхідно приготувати 6%-ий розчин:

$$40,4 \text{ мл} \times 6\% = 32\% \times x,$$

$$32x = 242,4,$$

$$\text{звідси } x = 7,57 \text{ мл } 32\text{-го HCl}.$$

Кількість води для розбавлення становить:  $40,4 - 7,57 = 32,83$  мл. За даним прикладом розраховуємо необхідну кількість соляної кислоти для інших апаратів:

- а) для ферментера місткістю 630 л кількість 6 %-го розчину HCl становить:  $201,9 \times 2 = 403,8$  мл, відповідно  $403,8 \text{ мл} \times 6\% = 32\% \times x$ ,  $x = 75,7$  мл 32%-го HCl, звідси кількість води:  $201,9 - 75,7 = 126,2$  мл;
- б) для ферментера об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> кількість 6 %-го розчину HCl становить:  $954,8 \times 2 = 1909,6$  мл, відповідно  $1909,6 \times 6\% = 32\% \times x$ ,  $x = 358$  мл 32%-го HCl, звідси кількість води:  $954,8 - 358 = 596,8$  мл.

Сумарна кількість 6 %-го розчину HCl для регулювання рН в процесі культивування та для його пониження в композиціях становить:  $40,4 + 403,8 + 1909,6 = 2353,8$  мл. Кількість 32%-го HCl:  $2353,8 \text{ мл} \times 6\% = 32\% \times x$ ,  $x = 441,34$  мл. Кількість води для розбавлення становить:  $2353,8 - 441,34 = 1912,5$  мл.

У реактор (P-1) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-4) вносять необхідну кількість соляної кислоти, додають питну воду і вмикають перемішуючий пристрій. На виході отримують 6%-ий розчин соляної кислоти, який потім подають до реакторів, де міститься композиція з солями (до P-13, P-15, P-16, ДР 4.3.2, ДР 4.4.2, ДР 4.5.2)

#### *ДР 2.2 Приготування та стерилізація 6 %-го розчину NaOH*

Гідроксид натрію надходить на виробництво у вигляді порошку (з 100% вмістом NaOH), який розфасований у мішки по 1 кг. Для підлужнення 1 л розчину необхідно 2,5 мл лугу. Сумарна кількість поживного середовища з урахуванням конденсату для одного виробничого циклу становить:  $383 + 39,36 + 3770 = 4192,4$  л, відповідно кількість необхідного 6 %-го розчину NaOH становить:  $4192,4 \times 2,5 = 10481$  мл. Звідси кількість сухого порошку NaOH:  $10481 \times 0,06 = 629$  г, кількість води з урахуванням конденсату (10%):  $10481 - 629 - 1048,1 = 8804$  мл  $\approx 8,8$  л. За даним прикладом розраховуємо необхідну кількість лугу для кожного апарата:

- а) для інокулятора місткістю 63 л кількість 6 %-го розчину NaOH становить:  $39,36 \times 2,5 = 98,4$  мл, звідси маса сухого NaOH:  $98,4 \times 0,06 = 5,9$  г, кількість води:  $98,4 - 5,9 - 9,84 = 82,66$  мл;
- б) для ферментера місткістю 630 л:  $383 \times 2,5 = 957,5$  мл 6 %-го розчину NaOH, маса сухого NaOH:  $957,5 \times 0,06 = 57,45$  г, кількість води:  $957,5 - 57,45 - 95,75 = 803,8$  мл;
- в) для ферментера об'ємом  $6,3 \text{ м}^3$  6%-ий розчин NaOH становить:  $3770 \times 2,5 = 9425$  мл, маса сухого NaOH:  $9425 \times 0,06 = 565,5$  г, кількість води:  $9425 - 565,5 - 942,5 = 7917$  мл.

Зі складу беруть необхідну кількість сухого NaOH, зважують технічних вагах. Далі подають питну воду та зважений NaOH через об'ємно-ваговий дозатор (Д-5) у реактор (Р-2). Вмикають перемішуючий пристрій та стерилізують гострою парою при температурі 131°C і тиску 0,15 МПа протягом 45 хв. Готовий простерилізований 6%-ий розчин гідроксиду натрію подають до ферментерів для підлучення середовища (до Фр-39, Фр-40, Фр-41).

### **ДР 3. Підготовка розчину для екстракції ціанокобаламіну**

#### *ДР 3.1. Підготовка фенол-хлороформної суміші*

Фенол та хлороформ додається у співвідношенні 1:1. Необхідна кількість екстрагенту, яка додається до біомаси, відповідає співвідношенню 2:1. Тобто, якщо в 1 л міститься зазвичай 5-10 г сухої біомаси, то в 4 м<sup>3</sup> міститься 20-40 кг біомаси. Відповідно на 20 кг біомаси необхідно 40 л екстрагенту: 20 л фенолу та 20 л хлороформу.

До реактора (Р-56) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-57) подають 20 л фенолу та 20 л хлороформу. Вмикають перемішуючий пристрій. Готову фенол-хлороформну суміш подають до реактора, де відбувається екстракція (Р-55).

### **ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ**

*ДР 4.1 Приготування і стерилізація 360 мл поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках*

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 360 мл середовища

*Таблиця 8.1*

Компонент поживного середовища	Концентрація компонентів, г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 360 мл, г	Композиція	Кількість води, мл	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	35	14	А	117,6	140
Кукурудз. екстракт	21	8,4			
$\text{KН}_2\text{PО}_4$	4,6	1,6	Б	198,2	201,8
$(\text{NН}_4)_2\text{SО}_4$	5	2			
$\text{CоCЛ}_2$	0,005	0,002	В	18,198	18,2
<b>Всього</b>	<b>65,005</b>	<b>26</b>		<b>334</b>	<b>360</b>

### *ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 14 г глюкози та 8,4 г кукурудзяного екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 117,6 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

### *ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

На аналітичних вагах зважують 1,6 г  $\text{KН}_2\text{PО}_4$  та 2 г  $(\text{NН}_4)_2\text{SО}_4$ . Зважені компоненти поміщають у колбу об'ємом 500 мл, добавляють 198,2 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

### *ДР 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В*

На аналітичних вагах зважують 0,002 г  $\text{CоCЛ}_2$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, добавляють 18,2 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

### *ДР 4.1.4. Змішування композицій*

У колбу об'ємом 750 мл вносять композиції від ДР 4.1.1, ДР 4.1.2, ДР 4.1.3. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і залишають до ТП 5.4.

ДР 4.2 Приготування і стерилізація 3970 мл поживного середовища для одержання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6,3 л

### Розрахунок вмісту компонентів для інокулятора на 6,3 л

Таблиця 8.2

Компонент поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 3,97 л, г	Композиція	Кількість води, л	Об'єм композиції, л
Глюкоза	35	153	А	1,69	1,94
Кукурудз. екстракт	21	91,77			
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	4	17,48	Б	1,48	1,52
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	21,85			
СоСl <sub>2</sub>	0,005	0,022	В	0,512	0,513
<b>Всього</b>	<b>65,005</b>	<b>284</b>		<b>3,55</b>	<b>3,97</b>

#### ДР 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 153 г глюкози та 91,77 г кукурудзяного екстракту. Зважені компоненти поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають 1,69 л питної води та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

#### ДР 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 17,48 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> та 21,85 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Зважені компоненти поміщають у колбу об'ємом 3 л, добавляють 1,48 л питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

#### ДР 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В

На аналітичних вагах зважують 0,022 г СоСl<sub>2</sub>. Наважку поміщають у колбу об'ємом 750 мл, добавляють 512 мл питної води, перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

*ДР 4.3 Приготування та стерилізація 39,37 л поживного середовища для одержання посівного матеріалу в інокулятор об'ємом 63 л.*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища для культивування в інокуляторі на 63 л**

*Таблиця 8.3*

Компонент поживного середовища	Концентрація компоненті в г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 39,37 л, г	Композиція	Кількість води, л	Об'єм композиції, л
Глюкоза	35	1516	А	12,8	15,23
Кукурудз. екстракт	21	909			
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	4	173,2	Б	19,8	20,2
СоСL <sub>2</sub>	0,005	0,22			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	216,5			
Конденсат	3,937				
<b>Всього</b>	<b>65,005</b>	<b>2452</b>		<b>32,6</b>	<b>39,37</b>

*ДР 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 1516 г глюкози та 909 г кукурудзяного екстракту. Зважені компоненти поміщають у реактор (P-12) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-18), додають 12,8 л питної води. Закривають та вмикають перемішувач. Стерилізація проходить при температурі 112 °С упродовж 30 хв. Отримана композиція самопливом подається до ферментера об'ємом 63 л (Фр-39).

*ДР 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 173,2 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,22 г СоСL<sub>2</sub> та 216,5 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Зважені компоненти поміщають у реактор (P-13) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-20) та добавляють 19,8 л питної води. Закривають та вмикають перемішувач. З P-1 подають 40,4 мл 6%-го розчину соляної кислоти (ДР 2.1). Підкислюють до рН 4,5, слідкуючи за датчиком рН.

Стерилізація проходить при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Отримана композиція самопливом подається до ферментера об'ємом 63 л (Фр-38).

*ДР 4.4 Приготування та стерилізація 383 л поживного середовища для підготовки посівного матеріалу у ферментері на 630 л.*

**Розрахунок вмісту компонентів для культивування  
у ферментері на 630 л**

*Таблиця 8.4*

Компонент поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 383 л, кг	Композиція	Кількість води, л	Об'єм композиції, л
Глюкоза	35	14,77	А	118,9	142
Кукурудз. екстракт	21	8,86			
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	4	1,69	Б	198,1	201,9
СоСL <sub>2</sub>	0,005	0,002			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	2,11			
Конденсат	38,3				
<b>Всього</b>	<b>65,005</b>	<b>27,43</b>		<b>317</b>	<b>383</b>

*ДР 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 14,77 кг глюкози та 8,86 кг кукурудзяного екстракту. Зважені компоненти через об'ємно-ваговий дозатор (Д-22) поміщають у реактор (Р-14), додають 118,9 л питної води. Закривають та вмикають перемішувач. Стерилізація проходить при температурі 112 °С упродовж 30 хв. Отримана композиція за допомогою насоса (Н-24) подається до ферментера об'ємом 630 л (Фр-40).

*ДР 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 1,69 кг КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,002 кг СоСL<sub>2</sub> та 2,11 кг (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Зважені компоненти поміщають у реактор (Р-15) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-25) та добавляють 198,1 л питної води. Закривають та вмикають перемішувач. З Р-1 подають 403,8 мл 6%-го розчину

соляної кислоти. Підкислюють до рН 4,5, слідкуючи за датчиком рН. Стерилізація проходить при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Отримана композиція за допомогою насоса (Н-27) подається до ферментера об'ємом 630 л (Фр-40).

*ДР 4.5 Приготування і стерилізація 3,77 м<sup>3</sup> поживного середовища для виробничого біосинтезу.*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу**

*Таблиця 8.5*

Компонент поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 3,77 м <sup>3</sup> л, кг	Композиція	К-сть води, л	Об'єм композиції, л
Глюкоза	60	249	А	2000	2415
Кукурудз. екстракт	40	166			
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	4,6	19,1	Б	935	954,8
СоСL <sub>2</sub>	0,012	0,05			
5,6-ДМБ	0,9	3,7	В	20	23,7
<b>Конденсат</b>	<b>377</b>				
<b>Всього</b>	<b>105,512</b>	<b>437,85</b>		<b>2955</b>	<b>3770</b>

*ДР 4.5.1 Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 249 кг глюкози та 166 кг кукурудзяного екстракту. Зважені компоненти через об'ємно-ваговий дозатор (Д-31) поміщають у реактор (Р-17), подають 2000 л питної води. Закривають та вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізація проходить при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

*ДР 4.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 19,1 кг КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,05 кг СоСL<sub>2</sub>. Зважені компоненти поміщають у реактор (Р-16) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-28) та подають 935 л питної води. Закривають та вмикають перемішуючий пристрій. З Р-1 подають 1909,6 мл 6%-го розчину соляної кислоти.

Підкислюють до рН 4,5, слідкуючи за датчиком рН. Стерилізація проходить при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Отримана композиція насосом (Н-30) подається до ферментера об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> (Фр-41).

#### *ДР 4.5.3 Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 3,7 кг 5,6-ДМБ. Наважку поміщають у реактор (Р-36) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-34) та подають 20 л питної води. Стерилізація проходить при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Отримана композиція насосом (Н-37) подається до ферментера об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> (Фр-41).

### **ТП 5. Підготовка посівного матеріалу**

#### *ТП 5.1 Підтримання колекційної культури*

Колекційну культуру *P. freudenreichii* інкубують в пробірках зі скошеним агаром та зберігають в холодильнику при температурі 3 – 4 °С. Зважаючи на те, що на агаризованих середовищах культура зберігається погано, тому вона підтримується шляхом періодичних пересівів (щомісяця) на рідке поживне середовище наступного складу, г/л: глюкоза – 35 г; кукурудзяний екстракт – 21 г; дигідрофосфат калію – 4 г; амонію сульфат – 5 г і хлорид кобальту – 0,005 г. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

#### *ТП 5.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах*

Колекційну культуру відновлюють, в пробірках з МПА, потім розсівають мікробіологічною петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із сусло-агаром і вирощують при температурі 30<sup>0</sup>С упродовж 24 годин.

#### *ТП 5.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах*

Отримані ізольовані колонії (від ТП 5.2) пересівають в пробірки зі скошеним агаризованим середовищем МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год, температура 30 °С

#### *ТП 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках*

Для вирощування посівного матеріалу у засівну колбу об'ємом 500 л додають композиції від ДР 4.1.4. З колби по 180 мл поживного середовища.

Туди вносять посівний матеріал з пробірок зі середовищем МПА, засіяних продуцентом раніше. Параметри культивування: температура 30 °С, тривалість 24 години, 20 об/хв.

#### *ТП 5.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 6,3 л*

У стерильний інокулятор (ФР-38) об'ємом 6,3 л в асептичних умовах додають поживне середовище з колб через засівний пристрій (ЗП-42): композиція А (ДР 4.2.1), композиція Б (ДР 4.2.2) та композиція В (ДР 4.2.3). Через засівну колбу в асептичних умовах додають 360 мл культуральної рідини з 2 колб зі стадії вирощування на качалках (ТП 5.4). У ферментер подають стерильний азот для створення анаеробних умов і починають процес культивування. рН контролюють за допомогою датчика-рН. Культивування здійснюють за температури 30 °С протягом 24 год, швидкість перемішування становить 20 об/хв (для гомогенізації середовища). Посівний матеріал подають через трубу перетискання до ферментера об'ємом 63 л (ФР-39).

#### *ТП 5.6 Вирощування культури у ферментері об'ємом 63 л*

У стерильний ферментер-інокулятор (ФР-39) об'ємом 63 л в асептичних умовах через гребінку подають композицію А (від ДР 4.3.1, Р-12) та композицію Б (від ДР 4.3.2, Р-13). Посівний матеріал у кількості 3,97 л подається через трубу перетискання від ФР-38. Із Р-4 подають 98,4 мл стерильного розчину гідроксиду натрію (ДР 2.2) для підлужнення середовища до рН-7,0. У ферментер подають стерильний азот для створення анаеробних умов і починають процес культивування. рН контролюють за допомогою датчика-рН. Культивування здійснюють за температурі 30 °С протягом 24 год, швидкість перемішування становить 20 об/хв (для гомогенізації середовища). Посівний матеріал подають через трубу перетискання до ферментера об'ємом 630 л (ФР-40).

#### *ТП 5.7 Вирощування культури у ферментері об'ємом 630 л*

У стерильний ферментер (ФР-40) об'ємом 630 л в асептичних умовах через гребінку подають композицію А (від ДР 4.4.1, Р-14) та композицію Б (від ДР 4.4.2, Р-14). Посівний матеріал у кількості 39,37 л подається через трубу перетискання від ФР-39. Із Р-4 подають 957,5 мл стерильного розчину гідроксиду натрію (ДР 2.2) для підлужнення середовища до рН-7,0. У ферментер подають стерильний азот для створення анаеробних умов і починають процес культивування. рН контролюють за допомогою датчика-рН. Культивування відбувається при температурі 30 °С протягом 24 год, швидкість перемішування становить 20 об/хв (для гомогенізації середовища). Посівний матеріал подають через трубу перетискання до ферментера об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> (до ФР-41).

### **ТП 6. Біосинтез**

#### *ТП 6.1 Виробниче культивування*

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> (ФР-41). У ферментер через гребінку подають композицію А (від ДР 4.5.1, Р-17) та композицію Б (від ДР 4.5.2, Р-16). Посівний матеріал у кількості 383 л подається через трубу перетискання від ФР-40. Із Р-4 (ДР 2.2) подають 9425 мл стерильного розчину гідроксиду натрію (ДР 2.2) для підлужнення середовища до рН-7,0. У ферментер подають стерильний азот для створення анаеробних умов і починають процес культивування. рН контролюють за допомогою датчика-рН. Після 72 год культивування вносять розчин 5,6-ДМБ (від Р-36, ДР 4.5.3). Культивують за температури 30 °С, швидкість перемішування становить 20 об/хв (для гомогенізації середовища). Час культивування - 160 год. Рівень концентрації ціанокобаламіну за даний час буде становити 59,5 мг/л. Після закінчення процесу культивування, культуральну рідину з біомасою бактерій зливають у реактор (Р-47).

### **ТП 7. Відділення біомаси**

#### *ТП 7.1. Сепарування культуральної рідини*

Для відділення біомаси бактерій від культуральної рідини, останню подають зі збірника (Р-47) до сепаратора (С-49) за допомогою насоса (Н-48).

Температура сепарування становить 35<sup>0</sup>С. Процес триває до повного відділення біомаси від культуральної рідини. По завершенню сепарування субстанцію за допомогою насоса (H-50) подають до реактора (P-51).

## **ТП 8. Дезінтеграція клітин бактерій**

### *ТП 8.1. Дезінтеграція бактеріальних клітин P. freudenreichii*

Бактеріальну біомасу (від ТП 7.1) подають від реактора (P-51) до гомогенізатора високого тиску (Г-53) за допомогою насоса (H-52). Клітини бактерій *P. freudenreichii* піддаються лізису під високим тиском. Після завершення процесу дезінтеграції подають у реактор для екстракції (P-55) за допомогою насоса (H-54).

## **ТП 9. Виділення вітаміну В<sub>12</sub>**

### *ТП 9.1. Екстракція ціанокобаламіну*

Екстракція ціанокобаламіну здійснюється у реакторі (P-55), куди подають дезінтеграції (від ТП 8.1) від гомогенізатора високого тиску (Г-53). Далі за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-57) порційно подається фенол-хлороформна суміш з P-56 у кількості 40 л (ДР 3.1). Вмикають перемішувальний пристрій (200 об/хв.). Для повного вилучення вітаміну екстракцію проводять 2-3 рази до повного знебарвлення. Залишок хлороформу та фенолу видаляють етиловим ефіром. Суміш клітин з екстрагентом подають на повторну сепарацію (ТП 9.2) до сепаратора (С-59).

### *ТП 9.2. Сепарування розчину*

Отриманий екстракт ціанокобаламіну (від ТП 9.1), перекачують з екстрактора (P-55) до сепаратора (С-59) за допомогою насоса (H-58). Після сепарування залишки клітин йдуть на знешкодження (до ЗВ 13.1). Фугат (фенольно-хлороформна суміш з вітаміном В<sub>12</sub>) подають до збірника (P-61) за допомогою насоса (H-60). Далі його подають на вакуум-випарну установку (ВВУ-63) за допомогою насоса (H-62) на стадію концентрування (до ТП 10.1).

## **ТП 10. Концентрування екстракту**

### *ТП 10.1. Вакуум-випарювання екстракту*

Екстракт (від ТП 9.2) подається на випарювання до однокорпусної випарної установки (ВВУ-63). Екстракт упарюють до 80 %-го вмісту сухих речовин. Процес випарювання здійснюють протягом 1 год (продуктивність випарної установки 100 л/год) за температури 70<sup>0</sup>С. Упарений продукт подають на стадію висушування (до ТП 11.1) до вакуум-сушильної шафи (С-64).

## **ТП 11. Отримання сухого препарату**

### *ТП 11.1. Висушування ціанокобаламіну*

Після процесу випарювання (ТП 10.1) упарений продукт розміщують на піддоні і подають до сушильної шафи (С-64). Висушування здійснюється за температури 100<sup>0</sup>С за допомогою гарячого повітря. В результаті сушіння виділяється відпрацьоване повітря, яке направляється на знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 14.2). Висушений продукт направляють на наступні стадії (ТП 12).

## **ТП 12. Подрібнення та просіювання готового продукту**

Висушений продукт (від ТП 11.1) подрібнюють на молотковій дробарці (Др-65). Діаметр частинок висушеного продукту становить 5 мкм. Просіювання уже подрібненого продукту здійснюється на вібраційному ситі (ВС-66). Готовий продукт у вигляді порошку направляють на пакування (ПМВ 13).

## **ПМВ 13. Фасування та пакування та маркування готового продукту**

### *ПМВ 13.1. Пакування у металізовані пакети*

Після надання необхідної форми (ТП 12) готовий продукт герметично пакують у трьохшовні полімерні пакети. Фасують на дозувальній машині (ДМ-67) по 0,5 кг. Браковані пакети відправляють на знешкодження твердих відходів (до ЗВ 14.3).

### *ПМВ 13.2. Пакування у групову тару*

Наповнені вітаміном полімерні пакети (від ПМВ 13.1) пакують у картонні коробки на пакувальній машині (ПМ-68). Готові коробки

обклеюють стрічкою і відправляють на склад. Браковані коробки відправляють на знешкодження твердих відходів (до ЗВ 14.3).

#### **ЗВ 14. Знешкодження відходів**

##### *ЗВ 14.1. Знешкодження рідких відходів*

Розчини мийно-дезінфікувальних засобів (від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР 1.3.1) та відпрацьовану воду (від ДР 1.3.2) утилізують.

##### *ЗВ 14.2. Знешкодження газоподібних відходів*

Відпрацьований азот, що надходить від ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 5.7, ТП 6.1, а також відпрацьоване повітря (від ТП 11.1) відправляють у системи знешкодження газових відходів.

##### *ЗВ 14.3. Знешкодження твердих відходів*

Браковані пакети та коробки (від ПМВ 13.2, ПМВ 13.1) подають на полігон твердих відходів або утилізацію відходів.

**РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ВІТАМІНУ В12 *PROPIONIBACTERIM FREUDENREICHII* СІСС**

**10019**

*Таблиця 9.1.1*

**9.1. Карта постадійного контролю біосинтезу ціанокобаламіну**

<b>Номер контрольної точки та назва стадії</b>	<b>Об'єкт контролю та показник, що визначається</b>	<b>Засоби та методи контролю</b>	<b>Періодичність перевірки та порядок відбору проб</b>	<b>Нормативна характеристика показника, що визначається</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Кх 1.1.1 Приготування розчину хлорного вапна	Концентрація розчину хлорного вапна	Хімічний метод	Після приготування розчину	C= 2%
Кх 1.1.2 Приготування розчину засобу «Бланідас-Ц»	Концентрація розчину засобу «Бланідас-Ц»	Хімічний метод	Після приготування розчину	C= 0,5%
Кт 1.2.1 Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладання ,чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду

1	2	3	4	5
Кт 1.3.1 Миття обладнання	Мийний розчин для обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції, візуальний огляд після миття	$T = 80^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 1 \text{ год}$ , чисте обладнання
Кт 1.3.4 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	$P = 0,1-0,2 \text{ МПа}$ , $\tau = 40-60 \text{ хв}$ , $\Delta P < 0,01 \text{ МПа}$
Кт 1.3.5 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, надлишковий тиск визначають після проведення стерилізації	$P=0,15 \text{ МПа}$ $t = 135^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30-40 \text{ хв}$ ,
Кх 2.1 Приготування розчину соляної кислоти	Концентрація соляної кислоти	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	$C = 6\%$

1	2	3	4	5
Кх, Кт, Км 2.2. Приготування та стерилізація розчину гідроксиду натрію	Тиск, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину гідроксиду натрію	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль проводять після стерилізації	C = 6 %, $\tau = 45$ хв, P = 0,15 МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, час, тиск, стерильність.	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, $\tau = 30$ хв, $t = 112^{\circ}\text{C}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, час, тиск, стерильність.	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, $\tau = 40$ хв, $t = 131^{\circ}\text{C}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, час, тиск, стерильність.	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, $\tau = 40$ хв, $t = 131^{\circ}\text{C}$ , відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, час, стерильність, тиск	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, $\tau = 30$ хв, t = 112 °С, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, час, тиск, стерильність.	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, $\tau = 40$ хв, t = 131 °С, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, час, стерильність.	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, $\tau = 40$ хв, t = 131 °С, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, час, тиск, стерильність.	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, $\tau = 30$ хв, t = 112 °С, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, час, стерильність, рН	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, датчик рН	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, $\tau = 40$ хв, t = 131 <sup>0</sup> С, відсутність мікробіоти, рН=4,5
Кт, Км 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, час, стерильність.	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, $\tau = 30$ хв, t = 112 <sup>0</sup> С, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, час, рН, стерильність.	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, датчик рН	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, $\tau = 40$ хв, t = 131 <sup>0</sup> С, відсутність мікробіоти, рН=4,5
Кт, Км 4.5.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, час, стерильність.	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, датчик рН	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, $\tau = 30$ хв, t = 112 <sup>0</sup> С, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, час, рН, стерильність.	Манометр технічний, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль - після	$P=0,15$ МПа, $\tau =$ 40 хв, $t = 131^{\circ}\text{C}$ , відсутність мікробіоти, $\text{pH}=4,5$
Кт, Км 4.5.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, час, стерильність.	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль - після	$P=0,15$ МПа, $\tau =$ 40 хв, $t = 131^{\circ}\text{C}$ , відсутність мікробіоти,
Кт, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалці	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $n = 20$ об/хв, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 6,3 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються автоматично весь час вирощування посівного матеріалу	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $n = 20$ об/хв, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км, Кх 5.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 63 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	рН=7, T=30 <sup>0</sup> C, t=24 год, n = 20 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.7 Вирощування посівного матеріалу в ферментері на 630 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	рН=7, T=30 <sup>0</sup> C, t=48 год, n = 20 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері на 6300 л	Культуральна рідина, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури, концентрація біомаси концентрація вітаміну В <sub>12</sub>	Термометр технічний, годинник, тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль, фотокolorиметричний метод визначення концентрації біомаси	рН визначають в останні години культивування; температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування	рН=7, T=30 <sup>0</sup> C, t=72 год, n = 20 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт 6.1 Відділення біомаси бактерій від культуральної рідини	Біомаса бактерій, тривалість, температура кількість обертів	Таймер, термометр	Після процесу сепарування та під час	$\tau$ - до повного відділення біомаси $t=35^{\circ}\text{C}$ $n=8000$ об/хв
Кт 8.1 Дезінтеграція бактеріальних клітин	Біомаса бактерій, тривалість процесу, цілісність клітин, тиск	Таймер, термометр, манометр	Під час процесу дезінтеграції	$\tau$ - до повної дезінтеграції клітин $P= 1,5$ тис. бар
Кт 9.1 Екстракція ціанокобаламіну	Кількість обертів мішалки, співвідношення біомаси та екстрагента	Тахометр	Під час процесу екстракції	$\omega = 200$ об/хв., співвідношення Б:Е=1:2
Кт 9.2 Сепарування розчину	Температура	Термометр	Під час процесу сепарування	$t=35^{\circ}\text{C}$ $n=8000$ об/хв
Кт 10.1 Випарювання екстракту	Тиск, температура концентрату	Манометр, термометр	Під час проведення процесу випарювання	$T = 70^{\circ}\text{C}$ $\tau = 1$ год $P=20$ кПа

1	2	3	4	5
Кт 11.1 Висушування вітаміну	Температура	Термометр	Під час висушування	$t = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 2\text{ год}$
Кт 12 Подрібнення та просіювання продукту	Розмір часток	Сито	Після подрібнення	$d = 5\text{ мм}$
Кт 13 Фасування та пакування	Цілісність упаковки, маса, вологість готового продукту, вміст домішок, кількісне визначення	Візуальний огляд, ваги, параметри якості готового продукту	Під час проведення операції	$m = 5\text{ кг}$

Протягом усього культивування періодично відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, а також вмісту джерела вуглецю у глюкозі та азоту у кукурудзяному екстракті. Культуру переносять щомісяця в новий агар. Після закінчення ферментації відбирають пробу для визначення концентрації вітаміну В<sub>12</sub>.

## 9.2 Мікробіологічний контроль

**Посів на чашки Петрі.** Посів здійснюють методом паралельних штрихів на кукурудзяно-глюкозному середовищі. Невелику кількість матеріалу набирають стерильною бактеріологічною петлею і наносять на поверхню поживного середовища біля краю чашки. Знімають надлишок матеріалу і проводять посів його паралельними штрихами від краю до краю чашки. Після цього петлю стерилізують у полум'ї, щоб знищити надлишок матеріалу, охолоджують. Необхідно намагатись, щоб штрихи посіву тривали від краю до краю чашки, не пошкоджували поверхні агару і розташовувались близько один від одної. Цим штучно подовжується лінія посіву і створюються можливості для одержання ізольованих колоній.

Через добу інкубації посівів при оптимальній температурі за відсутності контамінації на поверхні чашки виростають ізольовані колонії *P. freudenreichii*, які будуть мати такий вигляд: округла, або у вигляді гречаного зерна, форма, колонії вологі, блискучі, маслянисті, кремового кольору (рис.9.2.1) [61].

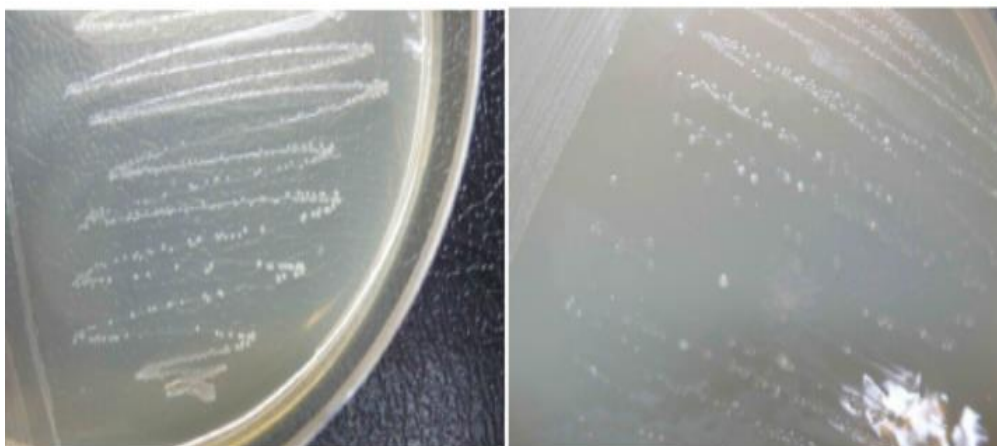


Рис.9.2.1. *P. freudenreichii* на кукурудзяно-глюкозному середовищі

Морфологію *P. freudenreichii* вивчали шляхом приготування препаратів, забарвлених метиленовим синім з подальшим мікроскопіюванням. Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою.

На чисте предметне скло, знежирене милом або спиртом і насухо протерте фільтрувальним папером (знежирення скелець здійснюють удалині від пальників), наносять краплю дистильованої води. Флаббованою бактеріологічною петлею чи голкою з пробірки з культурою беруть невелику кількість мікробної маси і вносять у краплю. Отриману суспензію рівномірно розтирають петлею на площі 2...4 см<sup>2</sup>. Мазок повинен бути тоненьким, рівномірним за товщиною, овальним за формою. Мазок висушують за кімнатної температури на повітрі або у теплом повітрі над запаленою спиртівкою, не допускаючи перегрівання. Потім фіксують мазок термічною обробкою - препарат тричі проводять через полум'я пальника, тримаючи скло мазком вгору.

Фіксований препарат поміщають на рівнобіжні скляні рейки містка, що лежить на стінках скляної ємкості й обливають з піпетки декількома краплями розчину метиленового синього. Тривалість фарбування – від декількох секунд до 1...3 хв. Необхідно стежити, щоб під час фарбування розчин барвника на мазку не підсихав, і в разі потреби доливати нові порції. По закінченню фарбування препарат промивають струменем води доти, доки стікаюча вода стане безбарвною. Потім препарат висушують на повітрі або обережно промокають фільтрувальним папером і розглядають з імерсією. Для цього на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини імерсійного масла. Після роботи ваткою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива [62].

При відсутності у зразку сторонньої мікрофлори під час мікроскопіювання можна побачити клітини, які мають форму паличок різної величини - від дуже коротких, майже коків, до довгих, розміром 0,5-0,8 чи 1,0-1,5 мкм.

### 9.3 Показники росту і синтезу

#### Визначення концентрації вітаміну В<sub>12</sub> в культуральній рідині

Концентрацію ціанкобаламіну в культуральній рідині визначають за допомогою спектрофотометричного методу. Метод полягає у відділенні і промиванні клітин бактерій з переміщенням вітаміну у водний розчин шляхом гідролізу, впливу світлом отриманий гідролізат для переходу кобаламіну в оксикобаламін та визначенні оптичної щільності при довжині хвилі 530 нм. Оптична щільність розчину пропорційна вмісту ціанкобаламіну. Чутливість методу – 10-100 мкг в пробі.

**Хід роботи.** Для аналізу беруть 100-150 мл культуральної рідини і центрифугують при 5000 об/хв. протягом 20 хв. Супернатант видаляють, клітини промивають 3-4 об'ємами дистильованої води, відокремлюючи промивні води центрифугуванням в тому ж режимі. Промиту вологу біомасу зважують і переносять кількісно в колбу Ерленмеєра з 30-кратним об'ємом дистильованої води, підкисленої 0,1 н. НСІ до рН 4,6-5,0.

Отриману суспензію гідролізують на киплячій водяній бані протягом 40 хв. Після охолодження гідролізат центрифугують, визначають значення рН і обсяг супернатанта. Гідролізат повинен мати рН 4,6-5,0. У випадку підлужнення його підкисляють 0, 1 н. НСІ. Після цього гідролізат поміщають під лампу (60 Вт) на відстані 25 см і висвітлюють протягом 30 хв. У разі випадіння осаду гідролізат фільтрують через паперовий фільтр.

Оптичну щільність розчину визначають на спектрофотометрі при довжині хвилі 530 нм відповідно до дистильованої води. Кількість ціанкобаламіну (мкг/мл) в культуральній рідині розраховують по формулі:

$$C = A_{530} \cdot 10^4 \cdot V_1 / 56 \cdot V_2,$$

де  $A_{530}$  – оптична щільність фільтрату, виміряна при довжині хвилі 530 нм;  $V_1$  – об'єм гідролізату, мл; 56 – питомий показник (коефіцієнт екстинкції) для оксикобаламіну при 530 нм;  $V_2$  – кількість культуральної рідини, взятої для дослідження, мл [63].

## Концентрація глюкози

Основним джерелом вуглецю в середовищі для культивування *P. freudenreichii* є глюкоза. Концентрацію глюкози визначають глюкозооксидазним методом з використанням біосенсорів з іммобілізованою глюкозооксидазою та амперометричним датчиком.

**Хід роботи.** Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 1500 об/хв 15-20 хв, далі відцентрифужовану суспензію фільтрують через фільтрувальний папір. Фільтрат відбирають в окрему ємність для аналізів. Відбирається певний об'єм проби, який розводять у 250-1000 разів, далі від розведеного розчину відбирають 5-10 мл і переносять у 20 мл 20 мМ буферного розчину системи:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  —  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  з рН 7.2. До даної системи додають глюкозооксидазу іммобілізовану на полімері ЕДТ (20 мМ фосфатному буфері, рН 6,2, яка складалася з 10–2 М 3,4-етилендіокситіофену, 10–3 М поліетиленгліколю та 30 мг/мл розчину ГОД) у вигляді суспензії.

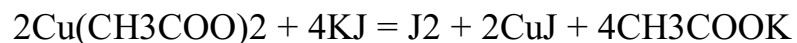
Вимірювання концентрації глюкози здійснюється за допомогою амперометричного перетворювального приладу, що складається з традиційної триелектродної системи, в якій друкований електрод SensLab поєднав у собі всі три електроди: платиновий робочий, допоміжний та електрод порівняння. Вимірювання проводять опусканням датчика амперометричного приладу у розчин-систему з глюкозооксидазою та підготовленою культуральною рідиною.

Величина, що вимірюється - це сила струму, що визначається у нА. Концентрацію глюкози визначають за градуовальним графіком залежності сили струму (нА) і концентрації глюкози (мМ). Отримане значення концентрації спочатку перемножують на ступінь розведення, а потім переводять концентрацію з мМ на г у певному об'ємі чи г/л [64].

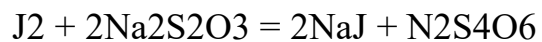
## Концентрація джерела азотного живлення

Основним джерелом азоту в середовищі для культивування *P. freudenreichii* є кукурудзяний екстракт та  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Вміст азоту визначають мідним методом за Попом і Стівенсом.

В основі мідного методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  у боратному буферному розчині. При цьому утворюються добре розчинні мідні з'єднання синього кольору. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді. Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину додають йодид калію:



В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію:



**Хід роботи.** В мірну колбу місткістю 50 мл піпеткою вносять 5 см супернатанту (отримують центрифугування протягом 20 хв. при 8000 об/хв), додають 3-4 краплини індикатору тімолфталеїну і по краплях розчин гідроксиду натрію концентрацією до появи блідо-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 мл суспензії ортофосфатуміді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують. Фільтрат повинен бути прозорим. 10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, додають 0,5 мл 80%-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином

тіосульфату натрію концентрацією. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію. 1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту [65].

#### **9.4. Методики контролю готового продукту**

##### **Ідентифікація вітаміну**

Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії, використовуючи пластинки із шаром силікагелю. Випробування проводять у захищеному від світла місці.

**Хід роботи.** Готують випробовуваний розчин: 2 мг субстанції розчиняють в 1 мл суміші рівних об'ємів 96 % спирту і води та розчин порівняння: 2 мг ціанокобаламіну розчиняють в 1 мл суміші рівних об'ємів 96 % спирту та води.

На лінію старту хроматографічної пластинки наносять 10 мкл (20 мкг) випробовуваного розчину і 10 мкл (20 мкг) розчину порівняння. Пластинку помішають у ненасичену камеру із сумішшю розчинників розчин аміаку розведений - метанол - метиленхлорид. Коли фронт розчинників пройде 12 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі та переглядають при денному світлі. На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром і забарвленням [66].

##### **Кількісне визначення**

**Хід роботи:** 25 мг субстанції розчиняють у воді і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 1 000 мл. Оптичну густину одержаного розчину вимірюють у максимумі за довжини хвилі 361 нм. Вміст обчислюють, використовуючи питомий показник поглинання, що дорівнює 207 [66].

##### **Випробування на чистоту**

Супровідні домішки. Визначення проводять методом рідинної хроматографії.

**Хід роботи.** Випробовуваний розчин: 10 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину тією самою рухомою фазою до 10 мл. Одержаний розчин використовують протягом 1 год.

*Розчин порівняння (а):* 3 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 1 00мл. Одержаний розчин використовують протягом 1 год.

*Розчин порівняння (в):* 5мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 50мл. 1 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100мл. Одержаний розчин використовують протягом 1 год.

*Розчин порівняння (с):* 25 мг субстанції розчиняють у 10 мл води, якщо необхідно, нагріваючи, охолоджують, додають 5 мл розчину 1 г/л хлораміну і 0,5 мл 0,05 М розчину кислоти хлористоводневої, доводять водою до об'єму 25 мл, струшують і витримують протягом 5 хв. 1 мл одержаного розчинудоводять рухомою фазою до об'єму 10 мл і відразу хроматографують [66].

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- ✓ колонка із нержавіючої сталі розміром 0,25 м x 4 мм,
- ✓ заповнена силікагелем для хроматографії із розміром частинок 5 мкм;
- ✓ рухома фаза: метанол - розчин 10 г/л динатрію гідрофосфату, рН якого попередньо доводять до 3.5 кислотою фосфорною розведеною;
- ✓ рухома фазу використовують протягом 2 діб;
- ✓ швидкість рухомої фази 0,8 мл/хв;
- ✓ детектування за довжини хвилі 361 нм.

Хроматографують по 20 мкл кожного розчину. Час хроматографування має бути у 3 рази більше часу утримування ціанокобаламіну.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- ✓ на хроматограмі розчину порівняння (с) виявляються 2 основних піка із коефіцієнтом розділення не менше 2.5;

- ✓ на хроматограмі розчину порівняння (в) виявляється один основний пік, для якого відношення сигнал/шум становить не менше 5.

На хроматограмі випробовуваного розчину сума площ усіх піків, крім основного, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (3 %). Не враховують піки, площа яких менше площі основного піка на хроматограмі розчин у порівняння (в) (0,1 %) [66].

### **Метод висушування до постійної маси**

Даний метод є більш точним за результатами, так як повністю видалається волога.

**Хід роботи.** Пусті бюкси, попередньо прожарені та охолоджені в ексикаторі, зважую з точністю до 0,0001 г. Беруть в них наважку масою близько 5 г і зважують також з точністю до 0,0001 г. У разі малого змісту аналізованого матеріалу беруть меншу масу наважки. Перед зважуванням при необхідності матеріал попередньо подрібнюють, від цього залежить час висушування.

Бюкси з наважкою при відкритих кришках поміщають в сушильну шафу при температурі 105<sup>0</sup>С. Після 2 години висушування бюкси закривають кришками, охолоджують в ексикаторі 10-15 хв. і роблять перше зважування (при закритому бюксі). Бюкси з відкритими кришками знову поміщають в сушильну шафу на 1 годину. Після охолодження зважують і при необхідності знову поміщають в сушильну шафу. Операції повторюють до досягнення постійної маси бюкса з наважкою [67].

### **Втрата в масі при висушуванні**

**Хід роботи.** 20 мг ціанокобаламіну сушать у вакуумі при температурі 105<sup>0</sup>С. Втрата в масі при висушуванні має бути не більше 12% [66].

## РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА

### 10.1 Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки

Випарювання - процес концентрування рідких розчинів практично нелетких речовин шляхом часткового видалення розчинника під час кипіння рідини. У процесі випарювання розчинник видаляється з усього об'єму розчину, водночас за температур нижчих за температуру кипіння випаровування рідини відбувається лише з поверхні розчину. Випарювання відноситься до числа розповсюджених технологічних процесів у фармацевтичному виробництві, що використовується для водних і спиртових витяжок при одержанні густих і сухих екстрактів, індивідуальних і сумарних екстракційних препаратів з рослинної, тваринної та мікробіологічної сировини, а також має ряд переваг:

- регенерація теплоносія і використання у виробництві;
- простота технології;
- висока продуктивність випарних установок
- ефективність;
- розчини не потребують ретельної підготовки та очищення;
- низькі енергетичні витрати [59].

Показником ефективності процесу є концентрація упареного розчину, а метою керування – підтримання певного значення цієї концентрації. З метою збереження діючих речовин випарювання з кипінням рідини здійснюють в установках, у яких вторинна пара, що утворюється над рідиною, постійно видаляється з робочої частини апарата (випарника), що створює розрідження (вакуум) і знижену температуру кипіння (40-65 °С) [68]. Дані апарати являють собою однокорпусні випарні установки. Початковий розчин із ємності подається насосом у підігрівач, де нагрівається до температури

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.13 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>Розділ 10. Автоматизація виробництва</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Волинець О.В.</i>						<b>106</b>	<b>6</b>
<i>Керівник</i>	<i>Стабніков В.П.</i>					<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Консульт.</i>	<i>Клименко О.М.</i>							
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Пирог Т.П.</i>							

кипіння, потім розчин надходить у нижню частину сепараційної камери для випарювання. Розчин випаровується за рахунок тепла конденсації гріючої пари, що надходить у міжтрубний простір гріючої камери, при цьому розчин нагрівається всередині труб гріючої камери та кипить в просторі над трубною дошкою гріючої камери.

Випарений до заданої концентрації розчин відводиться із випарного апарата у ємність випареного розчину та насосом відкачується на подальшу переробку. Сокова пара, що утворюється при кипінні розчину, відводиться через бризковловлювач у барометричний конденсатор, де пара конденсується при прямому контакті її з водою, що подається, на тарілки конденсатора. Суміш конденсату і води відводиться через барометричну трубу у барометричний ящик, а потім у систему оборотного водопостачання. Неконденсовані гази відводяться з конденсатора на всмоктування вакуум-насоса і потім викидаються в атмосферу [59,57].

Застосування мікропроцесорних засобів автоматизації для концентрування ціанокобаламіну випарюванням у однокорпусній вакуум-випарній установці дозволяє нам:

- підвищити точність і якість регулювання;
- підвищити ремонтпридатність;
- підвищити безвідмовність функціонування;
- організувати захист від помилкових дій персоналу.

Досвід створення МПК показав, що при впровадженні у виробництво автоматизованих систем зростає ефективність виробництва, знижується собівартість продукції, підвищується її якість. Тому створення таких систем є дуже важливим і перспективним напрямком розвитку. Введення мікропроцесорних засобів автоматизації дає змогу повністю автоматизувати процес випарювання рідини в випарному апараті, дає змогу постійно слідкувати за процесом при необхідності швидко вносити зміни, коригувати параметри.

## 10.2 Завдання на розробку схеми автоматизації

Таблиця 10.2.1

№	Місце відбору	Регульований параметр	Допустимі значення пару	Вид автоматизації	Характер контролю чи керування	Додаткові вимоги
1	2	3	4	5	6	7
1	Вакуумно-випарний апарат	Температура концентрату	50-70 °С	Контроль, регулювання	Покази, запис, сигналізація	Дія на клапан подачі пари, АРМ оператора
		Тиск в гріючій камері	0,4 МПа	Контроль	Покази, запис	АРМ оператора
		Тиск в апараті	0,05 МПа	Контроль, регулювання	Покази, запис, сигналізація	Дія на клапан відведення парів етанолу, АРМ оператора
2	Збірник фугату	Рівень рідини в апараті	65-70 %	Контроль, регулювання	Покази, запис, сигналізація	Дія на клапан подачі етанолу, АРМ оператора
		Швидкість обертів мішалки	30 об/хв	Контроль, регулювання	Покази, запис, сигналізація	Дія на двигун мішалки, АРМ оператора
3	Насос	Стан насосу	—	Контроль, переключення	—	Дія на двигун насосу, АРМ оператора

### **10.3 Опис схеми автоматизації зі специфікацією засобів автоматизації**

Регулювання рівня у збірнику здійснюється за допомогою індуктивного рівнеміра з уніфікованим вихідним сигналом 4-20мА (позиція 4а), який надходить на ПЛК та ПК для подальшої реєстрації та індикації. Також відбувається формування управляючого вихідного сигналу, який надходить на пневматичний виконавчий механізм (позиція 4в) (через електропневмо перетворювач, позиція 4б). Даний механізм відкриває чи закриває клапан подачі фугату в збірник.

Реалізовано контур управління насосом за допомогою кнопки по місцю SB1 та кнопки SB2 розташованих на щиті, що запускають магнітний пускач КМ1, який запускає двигун насосу.

Здійснюється реалізація контуру регулювання швидкості обертів мішалки за допомогою подачі аналогового сигналу 4-20 мА на частотний перетворювач. Останній локально регулює швидкість обертів завдяки зміні частоти обертів двигуна.

Реалізовано регулювання температури у вакуум-апараті завдяки мікропроцесорному вимірювальному перетворювачу, який містить вбудований чутливий елемент – платиновий термометр опору та вторинний показуючий пристрій з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА (позиція 1а). Сигнал надходить на ПЛК, де відбувається формування управляючого вихідного сигналу. Останній через електропневмо перетворювач (позиція 1б) надходить на пневматичний виконавчий механізм (позиція 1в), який відкриває чи закриває клапан подачі пари.

Тиск у гріючій камері вакуумно-випарної установки контролюють за допомогою реалізації перетворювача тиску з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА (позиція 2а). Для подальшої індикації та реєстрації сигнал надходить на ПЛК і ПК. Також формується управляючий вихідний сигнал, який через електропневмо перетворювач (позиція 3б) надходить на пневматичний виконавчий механізм (позиція 3в), який відкриває чи закриває клапан відводу парів екстрагену.

## Специфікація засобів автоматизації

№	№ позиції за схемою	Найменування	Технічна характеристика виробу	Тип, модель	Виробник
1	2	3	4	5	6
1	1б, 3б, 4б	Електропневматичний перетворювач	Вхідний сигнал 4-20мА, діапазон вимірювань 20-100кПа, напруга живлення, 12 - 36 В, допустиме перенавантаження датчика 250 кПа	РС-28G	Aplisens <sup>[1]</sup>
2	1в, 3в, 4в	Пневматичний клапан з позиціонером	Перетин (DN): 3 мм - 100 мм, робочий тиск до 25 бар, температура середовища: - 196 ... + 185 <sup>0</sup> С. Матеріал: нержавіюча сталь 316L.	8802GD	Burkert <sup>[2]</sup>
3	4а	Індуктивний рівнемір	Уніфікований вихідний сигнал 4-20мА, матеріал нержавіюча сталь 12Х18Н10Т, дискретність перетворення: 5 або 10 мм.	ПДУ-И.250.10.CL80	Owen <sup>[3]</sup>
4	SB1, SB2	Двопозиційна кнопка	Ступінь захисту: IP40, робоча напруга: 230, 380 В	БК-011ПП-213	Промфактор <sup>[4]</sup>
5	1а	Датчик температури	Термометр опору Pt100 з вимірювальним перетворювачем) з уніфікованим вихідним сигналом 4-20мА, клас точності 0,2-0,5	RS485	REGMIK <sup>[5]</sup>
6	KM1	Магнітний пускач	Напруга котушки: 220 В, номінальний струм: 40 А, сигнальні контакти: 1NO + 1NC	ПМ 3-40-11220В 40А	АСКО-УКРЕМ <sup>[6]</sup>
7	5а	Частотний перетворювач	Потужність 1.5-2.2 кВт, вихідний струм: 8.0/9.6	WJ200-015SFE	Hitachi <sup>[7]</sup>
8	SA1	Трьохпозиційний перемикач на щиті	Частота: 50-60 Гц, номінальний струм 32 А	SFT232	Hager <sup>[8]</sup>
9	2а, 3а	Датчик тиску	Уніфікований вихідний сигнал 4-20мА, живлення: 12 - 36 В	DSP-01	НВП «Гремпис» <sup>[9]</sup>

**Примітка\*** Пошук необхідних засобів автоматизації здійснювався за допомогою наступних джерел:

1. <https://aplisens.com.ua/prod/33>
2. <https://www.p-element.ru/content/pnevmaticheskiy-reguliruyushchiy-sedelnyy-klapan-s-pozicionerom-sistema-8802gd>
3. <https://owen.ua/ua/datchyky/pdu-i-poplavykovi-datchyky-rivnja-z-analogovym-vhidnym-sygnalom-4-20-ma>
4. <https://master-a.com.ua/ua/pereklyuchatel-dvukhpozicionnyjj-vk-011pr-2-1z-1no-promfaktor-30637cnt>
5. <https://regmik.com.ua/uk/product/datchiki-temperatury-i-s-unifitsirovannym-vyihodnym-sygnalom-modifikatsiya-303/>
6. <https://res.ua/magnitnyy-puskach-pm-3-40-11-220v-40a-askoukrem.html>
7. <https://eltech.kiev.ua/g2307577-wj200-vektornye-15kvt>
8. <https://shop220.com.ua/products/sft232-hager>
9. <http://grempis.com.ua/dsp/>

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Вороніна Л. М., Десенко В. Ф., Мадієвська Н. М.* та ін. Біологічна хімія. – Х.: Основа, Видавництво НФАУ, 2000. – 608 с.
2. Цианокобаламін (Cyanocobalamin) [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_1411.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1411.htm)
3. *J.H. Martens, H. Barg, M.J. Warren, D. Jahn.* Microbial production of vitamin B12 // *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002. – DOI 10.1007/s00253-001-0902-7.
4. *В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.;* Біотехнологія: Підручник // Під общ. ред. В.Г. Герасименка. — К.: Фірма «ІНККОС», 2006. — 647 с.
5. Державна Фармакопея України // ДП "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". 1-е вид. Доповнення 2 – 2015. – Т. 1. – 1128 с.
6. *Ластухін О.Ю.* Хімія природних органічних сполук. – Л: Національний університет «Львівська політехніка», «Інтелект-Захід». – 2005. – с. 560.
7. *Пирог Т. П., Ігнатова О.А.* Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
8. Vitamin B12. Fact Sheet for Health Professionals [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB12-HealthProfessional/>
9. Офіційний сайт «ЛікиКонтроль». Цианокобаламін (вітамін в12) [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: [http://likicontrol.com.ua/інструкція/?\[26317\]](http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[26317])
10. Производство витамина B12 [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: [http://chemanalytica.com/book/novyuy\\_spravochnik\\_khimika\\_i\\_tekhnologa/](http://chemanalytica.com/book/novyuy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/)
11. *Martens, H. Barg, M. Warren, D. Jah, J.-H.* Microbial production of vitamin B<sub>12</sub> // *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002. – DOI:10.1007/s00253-001-0902-7.

12. Kamil Piwowarek, Edyta Lipinska, Elzbieta Hac-Szymanczuk, Anna Bzducha-Wrobel, Alicja Synowiec. Research on the ability of propionic acid and vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* strain T82 //Antonie van Leeuwenhoek, 2017. – DOI 10.1007/s10482-017-0991-7.
13. Hidetaka Hatanaka, Enhao Wang, Masayuki Taniguchi, Shinji Iijima, and Takeshi Kobayashi. Production of vitamin B<sub>12</sub> by a fermentor with a hollow-fiber module // Appl Microbiol Biotechnol,1988.
14. Wei Xia, Wei Chen, Wei-fu Peng, Kun-tai Li. Industrial vitamin B<sub>12</sub> production by *Pseudomonas denitrificans* using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates // Bioprocess Biosyst Eng, 2015. – DOI 10.1007/s00449-014-1348-5.
15. Huina Dong, Sha Li, Huan Fang, Miaomiao Xia, Ping Zheng. A newly isolated and identified vitamin B<sub>12</sub> producing strain: *Sinorhizobium meliloti* 320 // Bioprocess Biosyst Eng, 2016. – DOI 10.1007/s00449-016-16283.
16. Peng Wang, Zhiwei Zhanga, Youjing Jiaoa, Shouxin Liuc. Improved propionic acid and 5,6-D MB controlstrategy for vitamin B<sub>12</sub> fermentation by *P.freudenreichii* // Direct Journal of Biotechnology, 2015. – doi:10.1016 /j.jbi otec. 2014.11.019.
17. Peng Wang, Zhiwei Zhanga, Youjing Jiaoa, Shouxin Liuc. Novel in situ product removal technique for simultaneous production of propionic acid and vitamin B<sub>12</sub> by expanded bed adsorption bioreactor // Bioresource Technolog, 2012.
18. Prom.ua [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://prom.ua>
19. Флагма [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://flagma.ua/uk/>
20. Компания «Пуцинские лаборатории» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.laboratorii.com>
21. «Molbase» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.molbase.com>

22. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. - Т. 2.- Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. - М.: Мир, 1997. - 325 с.
23. М.Г. Саубенова Т.В. Кузнецова Г.А. Имашпаева. Выделение и селекция пропионовокислых бактерий, перспективных для использования в биотехнологии // Приволжский научный вестник – 2015. – № 9 (49). – С.16
24. RU2250265C2 Способ производства кормопродукта
25. Офіційни сайт «ЛікиКонтроль» [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: [http://likicontrol.com.ua/інструкція/?\[26317\]](http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[26317])
26. Що треба знати про вітамін В12 [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://moz.gov.ua/article/health/scho-treba-znati-pro-vitamin-b12>
27. Статистичний Збірник: Заклади охорони здоров'я та захворюваність населення України у 2018 р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу:  
[http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat\\_u/2018/zb/06/zb\\_zoz\\_17.pdf](http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf)
28. Інфекційна захворюваність населення України за формою № 1 за серпень та 12 місяців 2018-2019 р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу:  
<https://www.phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/infekciyna-zakhvoryuvanist-naseleण्या-ukraini>
29. Зав'ялов В.Л., Зоткіна Л.В., Немирович П.М., Бодров В.С та ін. Процеси і апарати біотехнологічних виробництв: Метод. рекомендації до вивчення дисципліни, виконання курсових і контрольних робіт для студ. напряму 6.051401 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2012. – 98 с.
30. М.В. Стасевич, А.О. Милянч, І.О. Гузьова. Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв: навч. посібник для студ. вищ. навч. заклад./ за ред. В.П. Новікова. — В.: Нова Книга, 2012. — 408 с.
31. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад.: Т. П. Пирог, Ю.В Карлаш, В.О Красінько . – К.: НУХТ,

2015. – 10 – 19 с.

32. Хлоратоїн [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://prom.ua/p665834234-hlorantoin.html>

33. Хлорне вапно [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://prom.ua/p19361024-izvest-hlornaya-hlorne.html>

34. Сода каустична, кальцинована [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://officem.com.ua/promishlennaya-himiya>

35. Бланідаз-Ц [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://blanidas.com.ua/blanidas-c-star-20l/>

36. Лів-Атив [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://officem.com.ua/uk/6567-sredstvo-moyuschee-liv-aktiv-114-schelchnoj-s-ponizh-penoobraz-antibak-efektom-5kg>

37. Kenolux F 200 [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://officem.com.ua/uk/6567-sredstvo-moyuschee-liv-aktiv-114-schelchnoj-s-ponizh-penoobraz-antibak-efektom-5kg>

38. Сір-станція [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <http://www.milk-system.com/produktsiia/cip-stantsiia>

39. Герметизация аппаратуры и коммуникаций. Отбор проб [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: [https://studref.com/324402/meditsina/germetizatsiyaapparatury\\_kommunikatsiy\\_otb\\_or\\_prob](https://studref.com/324402/meditsina/germetizatsiyaapparatury_kommunikatsiy_otb_or_prob)

40. Wang, P., Zhang, Z., Jiao, Y., Liu, S., & Wang, Y. Improved propionic acid and 5,6-dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B12 fermentation by *Propionibacterium freudenreichii*. Journal of Biotechnology.– 2015 doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.019.

41. Данилов І. П. Апарати мікробіологічної промисловості: навч посібник / І. П. Данилов, С. І. Самойленко; Нац. техн. ун-т «Харків. політехн. ін-т». – Х.: НТУ «ХП», 2008. – 272 с.

42. Пирог Т. П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.

43. 5,6-диметилбензимидазол [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://chemdb.net/ru/compound/GerN162O9V>
44. *О. І. Юлевич*. Загальна біотехнологія: методичні рекомендації для самостійного вивчення дисципліни студентами денної форми навчання напряму підготовки 6.051401-"Біотехнологія"/ Уклад.: *О. І. Юлевич* - М: МНАУ, 2015. –157 с.
45. Отделение биомассы: флотация, фильтрование и центрифугирование. [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://students-library.com/library/read/30008-otdelenie-biomassy-flotacia-filtrovanie-i-centrifugirovanie>
46. Процеси та апарати хімічних виробництв + КП: відцентрове розділення неоднорідних систем [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://dl.sumdu.edu.ua/textbooks/22852/265871/index.html>
47. *Ю.О. Сазикін, С.Н. Горіхів, І.І. Чакалева*. Біотехнологія: Навчальний посібник для студентів вузів // Під ред. *А.В. Катлінській*. - М.: Академія, 2006.
48. *Ю.В. Карлаш*. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: *Ю.В.Карлаш* - К: НУХТ, 2013.–143 с.
49. *Сидоров Ю.І., Чуєшов В.І, Новіков В.П.* Процеси і апарати хіміко-фармацевтичної промисловості. В: Нова книга 2010. - 816 с.
50. Устаткування виробництв галузі: лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч./уклад.: *І.В.Житнецький, О.А.Терещенко, Л.В. Марцінкевич*, К.: НУХТ, 2014. - 50 с.
51. Дезінтеграція як інструмент для спрямованого руйнування клітин і клітинних структур [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://ukrbukva.net/page,4,94375-Dezintegraciya-kak-instrument-dlyanapravlenного-razrusheniya-kletok-i-kletochnyh-struktur.html>
52. Загальна біотехнологія: Учеб. Посібник/*О.М. Чечина* - Самара: Самар. держ. техн. ун-т, 2010. - 232 с.

53. *А.І. Капустян.* Дослідження лізису клітин бактерій під дією протеолітичних ферментів.- 2018. 168-178 с.
54. Лизис бактерий гомогенизацией [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: [https://www.gea.com/ru/applications/pharma/liquid-dosage/liquid-dosage\\_cell-disruption.jsp](https://www.gea.com/ru/applications/pharma/liquid-dosage/liquid-dosage_cell-disruption.jsp)
55. Екстракція [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2323/ekstrakciya>
56. Пат.№ 1717634 РФ,С12Р 19/42. Способ выделения витамина В12 / *Подпригора О. І., Єлисеєв С. А., Виговская Т. В., Дацюк Н. М.* Опубл. 25.04.1997
57. Випарювання розчинів. Розрахунок випарних апаратів та установок [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://dl.sumdu.edu.ua/textbooks/22852/266104/index.html>
58. Процеси та апарати хімічних виробництв + КП: Схеми сушильних установок та типові конструкції сушарок [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.google.com.ua/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=15&ved=2ahUKEwjB7PiykvmAhVGfZoKHfPcAHYQFjAOegQIARAB&url=https%3A>
59. Обладнання хімічних виробництв: конспект лекцій / укладач *М. П. Юхименко.* – Суми : Сумський державний університет, 2015. – 119 с.
60. Виды гибкой упаковки. Типы пакетов [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://packtech.com.ua/servis/stati/24-vidy-gibkoj-upakovki-tipy-paketov>
61. *Саубенова М.Г., Кузнецова Т.В., Имашпаева Г.А.* Выделение и селекция пропионовокислых бактерий, перспективных для использования в биотехнологии // Приволжский научный вестник. – 2015. – № 9 (49). – С.16.
62. Біологія клітин. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання / уклад.: *В.О. Красінько, І.М. Волошина.* – К.: НУХТ, 2014. – 147 с.

63. *Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М.* Практикум по микробиологии // Под ред. А. И. Нетрусова. — М.: Издательский центр «Академия», 2005. — 608 с
64. *Андріанова Т.В., Бобир В.В., Виноград Н.О. та ін.* Медична мікробіологія, вірусологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / За редакцією *В.П. Широбокова* / Видання 2-е. – В.: Нова Книга, 2011. – 952 с.
65. *Куц А.М., Бондар М.В., Булій Ю.В.* Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» спец. «Технологія продуктів бродіння і виноробства». – К.: НУХТ, 2011. – 53
66. Державна Фармакопея України // ДП "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". 1-е вид. Доповнення 2 – 2015. – Т. 1. – 1128 с.
67. Методи визначення вологості продукту [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: [https://cpo.stu.cn.ua/Oksana/harch\\_himia\\_lab\\_prakt/80.html](https://cpo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lab_prakt/80.html)
68. Вакуум-випарні установки [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://studfiles.net/preview/5465346/page:11/>

# ДОДАТКИ

## Додаток 1



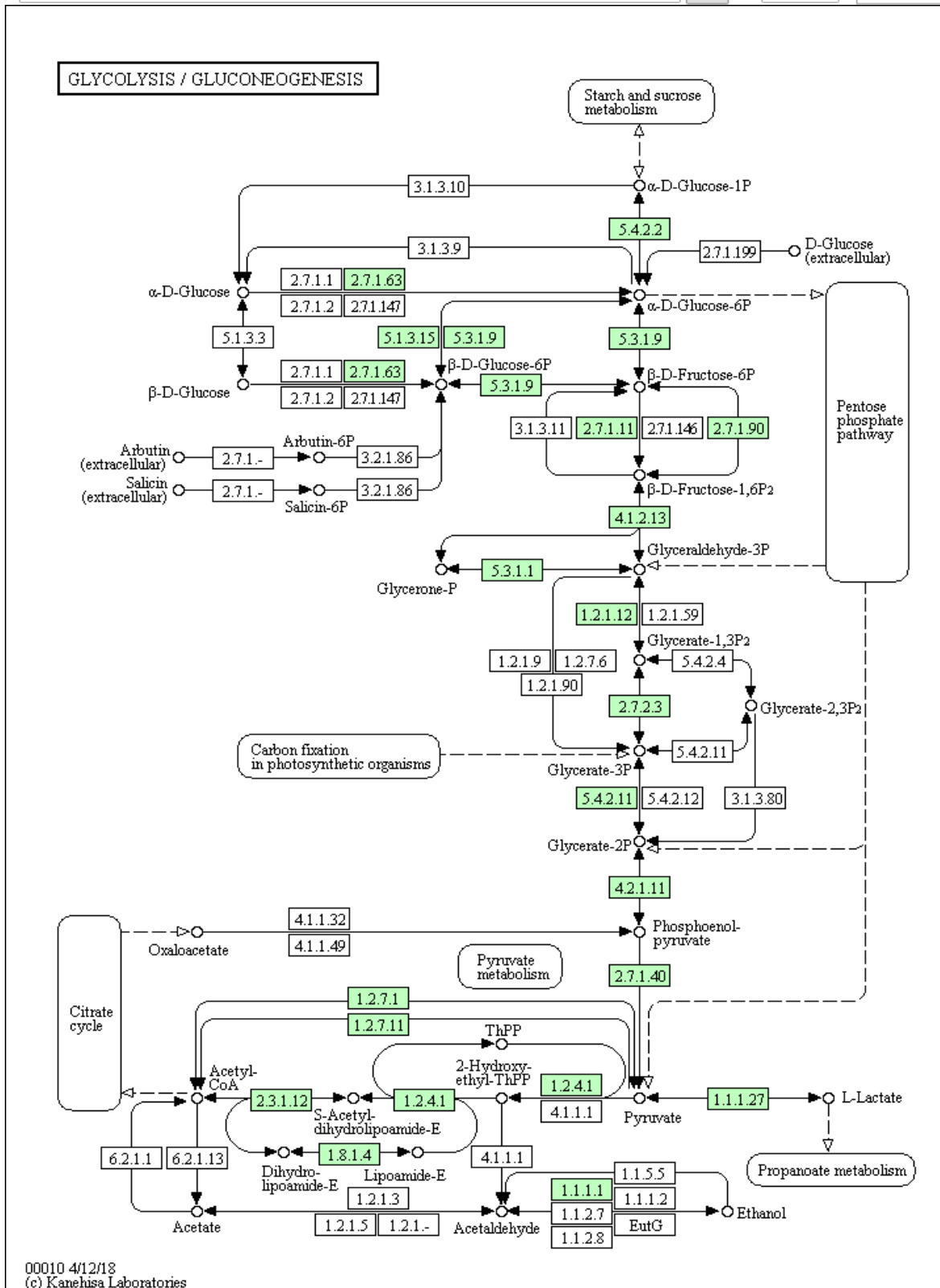
Glycolysis / Gluconeogenesis - *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSM 20271

[ Pathway menu | Organism menu | Pathway entry | Download KGML | Show description | User data mapping ]

Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii DSM 20271

Go

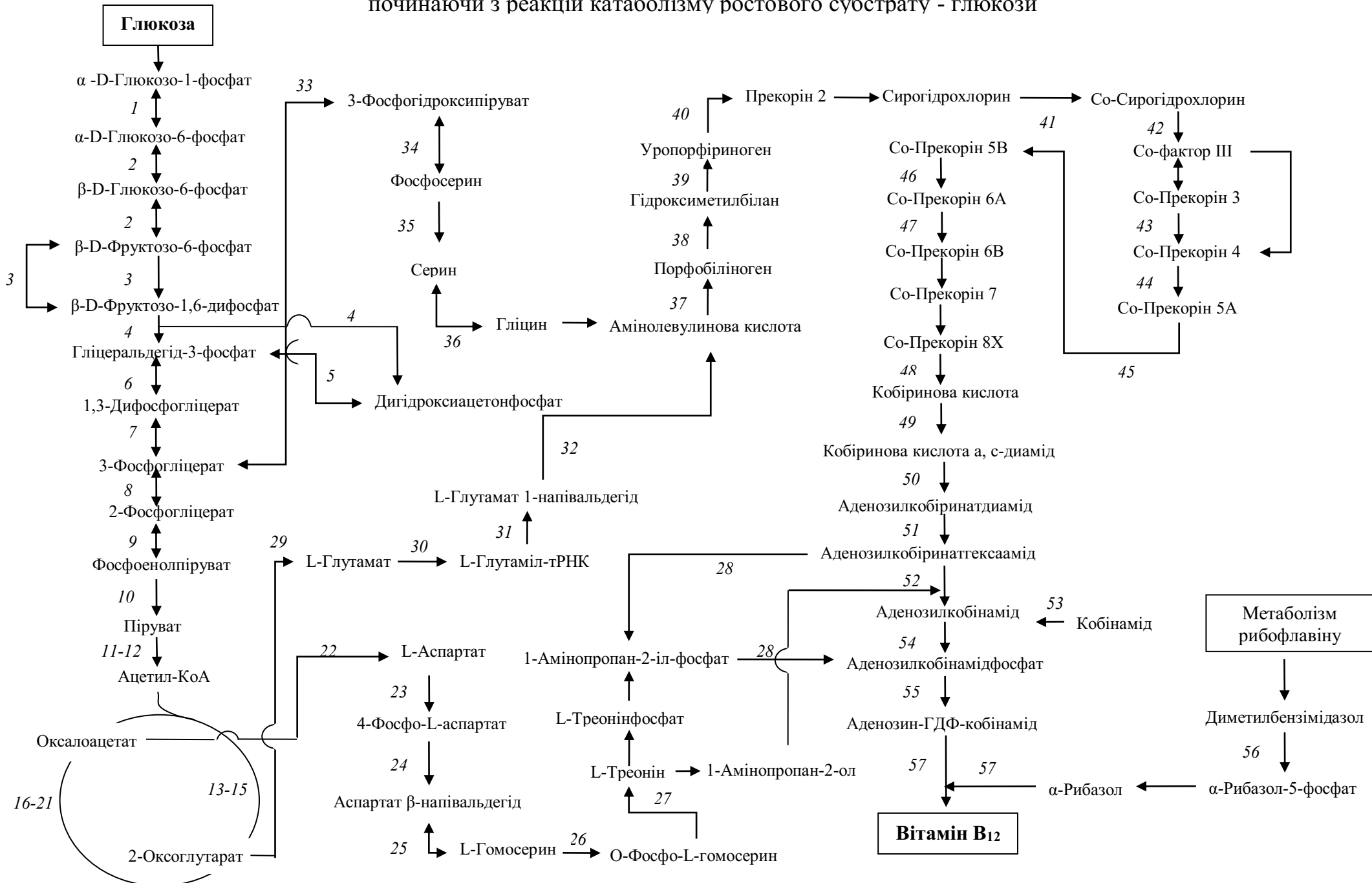
100%







починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату - глюкози





СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1717634 A1

(51)5 C 12 P 19/42, C 07 H 23/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4699525/13  
(22) 05.06.89  
(46) 07.03.92. Бюл. № 9  
(71) Львовский государственный университет им. Ив.Франко  
(72) С.А. Елисеев, Н.М. Дацюк, О.И. Подопригора и Т.В. Выговская  
(53) 668.394(088.8)  
(56) Патент ВНР № 167245, кл. С 07 D 55/62, 1976, Патент США № 4383110, кл. С 07 H 15/12, 1984, Кэнопкайте С. Кобаламины - Вильнюс: Макскас, 1978, с. 65-66.  
(34) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА В<sub>12</sub>  
(57) Изобретение относится к микробиологии, биохимии и физхимии, в частности к

2

способу выделения витамина В<sub>12</sub> из клеток пропионовокислых бактерий. Цель изобретения - увеличение выхода витамина и упрощение способа. Способ выделения витамина В<sub>12</sub> включает культивирование пропионовокислых бактерий, отделение культуральной жидкости, обработку биомассы для разрушения клеток, экстракцию фенол-хлороформенной смесью и получение готового продукта, при этом перед экстрагированием клетки обрабатывают 0.5-3%-ным раствором анионного детергента додецилсульфата натрия в щелочной среде при pH 9-10 в течение 30 мин. Обработку биомассы осуществляют путем замораживания клеток при температуре (-4)-(-12°C) и выдержки в течение 1 час последующим оттаиванием. 1 з.п. ф-лы, 3 табл.

Изобретение относится к микробиологии, биохимии и физхимии, в частности к способу выделения витамина В<sub>12</sub> из клеток пропионовокислых бактерий - промышленных продуцентов витамина В<sub>12</sub>

Известны способы получения витамина В<sub>12</sub>, заключающиеся в фотохимическом преобразовании кофермента В<sub>12</sub> или оксикобаламина и их алкильных производных в витамин В<sub>12</sub>; в аэробной ферментации артробактерий с последующим выделением из биомассы в результате гидролиза и фенольно-хлороформенной экстракции витамина В<sub>12</sub>; в выделении и очистке витамина В<sub>12</sub> на ионообменной смоле, содержащей сополимер дивинилбензола и стирола; в кислотном гидролизе бактериальной массы с последу-

ющим выделением витамина В<sub>12</sub> в результате фенольно-хлороформенной экстракции.

Недостатки приведенных способов выделения витамина В<sub>12</sub> заключаются в дороговизне оборудования и реактивов, применяемых для очистки, дороговизне многокомпонентных питательных сред для выращивания микроорганизмов, необходимости энергетических затрат для проведения гидролиза.

Наиболее близким по технической сущности является способ выделения витамина В<sub>12</sub> из биологического материала, заключающийся в том, что клетки микроорганизмов, содержащие кобаламины, отделяют от культуральной жидкости путем центрифугирования, заливают 5-6 объемами воды и в

(19) SU (11) 1717634 A1

редь обуславливает стабильность выхода витамина В<sub>12</sub>. При взаимодействии сильно щелочных детергентов с витамином В<sub>12</sub> образуется соединение кобаламиновой природы, снижающее рН до нейтрального, которое в дальнейшем не приводит к разрушению витамина В<sub>12</sub>. Существующие способы выделения витамина В<sub>12</sub> проводятся в средах с слабощелочным и нейтральным значением рН, что приводит к неполному извлечению витамина В<sub>12</sub> из клеток и низкому его выходу.

Снижение рН раствора до 9,0 либо увеличение свыше 10,0 снижает выход витамина В<sub>12</sub> из клеток за счет физико-химических изменений, происходящих с молекулами детергента. Более низкий выход витамина В<sub>12</sub> наблюдается и при снижении концентрации DDCNa менее 0,5% или увеличении ее свыше 3% за счет снижения числа мицелл детергента, способных специфически взаимодействовать с молекулами кобаламинов.

Выбор рН и концентрации детергента подтверждаются данными, приведенными в табл. 1.

Замораживание – процесс известный, но в предлагаемом способе он ускоряет разрушение клеток. В этих температурных границах (-4)–(-12)°С происходит кристаллизация свободной воды в клетке. Ослабевают межмолекулярные связи в клеточной стенке, облегчается доступ DDCNa к внутреннему содержимому клетки, а именно к веществам кобаламиновой природы.

Обработка 0,5–3%-ным раствором DDCNa, который взаимодействует с кобаламинами, ведет к образованию соединений, легко экстрагируемых органическими растворителями. Такое соединение с другими детергентами неионной (гритон X-100, 114, 305, твин 20, 40, 60, 65, 80), катионной (катамин АВ, цетилтриметиламмонийбромид, цетилтриметилпиридинийхлорид), анионной (холат и дезоксихолат натрия) природы, обладающих общеизвестным свойством – дезинтегрировать микроорганизмы, только DDCNa оказался способным специфически извлекать витамин В<sub>12</sub> из бактериальных клеток (табл. 1).

**Пример 1.** Культуру пропионовокислых бактерий (штамм *Propionibacterium shermanii* МУ-512) выращивают на синтетической среде. На 3-е сутки культивирования вносят 5,5-диметилбензамидозол (5,5-ДМБ). На 5-е сутки культивирования клетки отделяют от культуральной жидкости центрифугированием при 5000 об/мин, затем промывают физраствором и замораживают

при -4°С в течение 1 ч. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 0,5%-ного раствора DDCNa при рН 10,0 и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 2 мл 0,5%-ного раствора DDCNa при рН 10,0, центрифугируют в том же режиме, а супернатанты сливают. В супернатант добавляют 2 мг% KCN, встряхивают и выдерживают в темноте 20 мин. Витамин В<sub>12</sub> извлекают путем многократной экстракции небольшими порциями фенол-хлороформенной смеси (1:1). Из смеси витамин переводят в воду при добавлении 1,5 объема хлороформа и 0,75 объема н-бутанола. Следы хлороформа и бутанола удаляют посредством обработки содержимого этиловым эфиром. Концентрацию витамина В<sub>12</sub> определяют спектрофотометрически при длине волны 361 нм.

Параллельно проводят выделение витамина В<sub>12</sub> по известному способу с тем же количеством бактериальных клеток. Содержание витамина В<sub>12</sub> в экстрактах из клеток пропионовокислых бактерий: по известному способу – 480 ± 0,2 мкг/г сухого веса клеток; предлагаемым способом – 760 ± 0,1 мкг/г сухого веса клеток. Выход витамина В<sub>12</sub> при выделении предлагаемым способом выше на 57–58%.

**Пример 2.** Выращивание пропионовокислых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание их проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 3%-ного DDCNa при рН 9,0 с последующим перемешиванием на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 3%-ным раствором DDCNa при рН 9,0, центрифугируют, добавляют 2 мг% KCN, встряхивают, выдерживают в темноте 30 мин. Витамин В<sub>12</sub> извлекают путем многократной экстракции небольшими порциями фенол-хлороформенной смеси (1:1), затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина 110% по сравнению с известным способом.

**Пример 3.** Выращивание пропионовокислых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание их проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 4%-ного DDCNa при рН 11,0 с последующим перемешиванием на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 4%-ным DDCNa при рН 11, цен-

трифугируют, добавляют 2 мг% KCN, встряхивают в темноте 30 мин. Затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина B<sub>12</sub> составляет 37,5% по сравнению с известным способом.

**Пример 4.** Выращивание пропионово-кислых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание их проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 0,3%-ного DDCNa при pH 7,0 с последующим перемешиванием на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 0,3%-ным раствором DDCNa при pH 7,0, добавляют 2 мг% KCN, встряхивают и выдерживают в темноте 30 мин. Затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина 64,6% по сравнению с известным способом.

**Пример 5.** Выращивание пропионово-кислых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 0,50% ного тритона X-100 при pH 10,0 и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют, добавляют 2 мг% KCN, встряхивают, выдерживают в темноте 30 мин. Затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина B<sub>12</sub> не наблюдают.

**Пример 6.** Выращивание пропионово-кислых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 0,5%-ного цетильтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) при pH 10,0 и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 0,5%-ным ЦТАБ при pH 10,0, центрифугируют, добавляют 2 мг% KCN, встряхивают, выдерживают в комнате 30 мин. Затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина B<sub>12</sub> не наблюдают.

**Пример 7.** Выращивание пропионово-кислых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 0,5%-ного хлората натрия при pH 20,0 и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 0,5%-ным хлоратом натрия при pH 10,0, центрифугируют, добавляют 2 мг% KCN, встряхивают, выдерживают в

темноте 30 мин. Затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина B<sub>12</sub> не наблюдают.

Для сравнения данные, полученные под влиянием pH и концентрации DDCNa на выход витамина B<sub>12</sub> из клеток *Propionibacterium freudenreichii* subs. *shermanii*, сведены в табл. 1.

Во всех приведенных примерах используют известную синтетическую среду состава, г/л:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
NaCl	0,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
Глюкоза	40
Цитрат Na	0,5
CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5 мг%
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1мг%
Растворы витаминов и микроэлементов	По 1 мл/л
Дистиллированная вода	До 1,0 л.

Данные о специфической солюбилизирующей активности DDCNa характерны не только для мутантного штамма МУ-512, отличающегося высоким уровнем кобаламиногенеза, но и других штаммов (МУ-3, исходного природного штамма Познанского); табл. 2.

Конкретные значения концентрации DDCNa и величины pH обусловлены физико-химическим состоянием самого вещества, так как его солюбилизационные свойства обнаруживаются только при определенных значениях концентрации и pH.

В табл. 3 приведена зависимость содержания витамина B<sub>12</sub> от типа детергента (все детергенты используются в концентрации 0,5% при pH 10,0).

Как видно из приведенных в табл. 3 данных, предлагаемый способ выделения витамина B<sub>12</sub> существенно отличается от известных и обладает явными преимуществами: отсутствие процесса гидролиза сокращает время получения витамина, а отсутствие нагрева уменьшает затраты энергии.

## 50 Формула изобретения

1. Способ выделения витамина B<sub>12</sub>, включающий культивирование пропионово-кислых бактерий, отделение культуральной жидкости, обработку биомассы для разрушения клеток, экстракцию фенол-хлороформной смесью и получение готового продукта, отличающийся тем, что, с целью увеличения выхода витамина и упро-



## Improved propionic acid and 5,6-dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B12 fermentation by *Propionibacterium freudenreichii*



Peng Wang<sup>a,b,c,\*</sup>, Zhiwei Zhang<sup>a</sup>, Youjing Jiao<sup>a</sup>, Shouxin Liu<sup>c</sup>, Yunshan Wang<sup>d,\*\*</sup>

<sup>a</sup> College of Chemical & Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science & Technology, Shijiazhuang 050018, China

<sup>b</sup> Hebei Research Center of Pharmaceutical and Chemical Engineering, Hebei University of Science & Technology, Shijiazhuang 050018, China

<sup>c</sup> State Key Laboratory Breeding Base-Hebei Province Key Laboratory of Molecular Chemistry for Drug, Hebei University of Science & Technology, Shijiazhuang 050018, China

<sup>d</sup> National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, P.O. Box 353, Beijing 100190, China

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 August 2014

Received in revised form 22 October 2014

Accepted 21 November 2014

Available online 29 November 2014

#### Keywords:

Vitamin B12

Propionic acid

5,6-Dimethylbenzimidazole

Feed-back inhibition

Expanded bed adsorption bioreactor

### ABSTRACT

An efficient fermentation-strengthening approach was developed to improve the anaerobic production of vitamin B12 by cultivation process optimization with *Propionibacterium freudenreichii*. The effects of the byproduct propionic acid and the precursor 5,6-dimethylbenzimidazole (DMB) on vitamin B12 biosynthesis were investigated. Byproduct inhibition experiments showed that maintaining propionic acid concentration in broth below 10–20 g/L in the early stage and 20–30 g/L in the late stage can efficiently improve vitamin B12 biosynthesis. Batch fermentation indicated the occurrence of feed-back inhibition in intracellular intermediate biosynthesis. In addition, the incorporation of the precursor DMB depended on the fermentation level of the vitamin B12 intermediate. High vitamin B12 concentration (58.8 mg/L) and production (0.37 mg/g) were obtained with an expanded bed adsorption bioreactor by using the propionic acid and DMB control method. The optimum concentration and production of 59.5 and 0.59 mg/L.h for vitamin B12 production were respectively achieved after five continuous batches.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Vitamin B12 has various applications in the food and medicine industries (Wang et al., 2010) and also it is an important coenzyme in the metabolism of human tissues. Vitamin B12 can be biosynthesized in two ways: aerobic and anaerobic fermentation. Anaerobic fermentation with *Propionibacterium* has attracted increasing research interest because of the low-cost production of food-grade vitamin B12 (adenosylcobalamin) (Martens et al., 2002; Murooka et al., 2005; Kosmider et al., 2012). Considerable efforts have been exerted to improve vitamin B12-producing strains and vitamin B12 biosynthesis. Some studies have implemented random mutagenesis and genetic engineering method (Bykhovskii et al., 1998; Piao et al., 2004), whereas the others have attempted to optimize vitamin B12 fermentation by using various substrates

(e.g., whey, tomato pomace, and crude glycerol) (Marwaha et al., 1983; Haddadin et al., 2001; Kosmider et al., 2012). However, the yields and productivities in the current industrial fermentation continue to significantly fluctuate since the traditional approaches result in retarded cell growth and low efficiency for vitamin B12 synthesis. Therefore, in-depth investigations focusing on cultivation process optimization are important.

Propionic acid is a byproduct of the cultivation process of food-grade vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii*; this byproduct may accumulate to high concentrations of 30–40 g/L and cause feed-back inhibition in microbial cell growth. Among the methods employed to prevent propionic acid feed-back inhibition during fermentation, in situ product removal (ISPR) has shown advantages in improving production. This technique may also be used for large-scale production. Various ISPR processes have been reported using membrane-integrated bioreactors, plant fibrous-bed bioreactors, and expanded bed adsorption bioreactors (EBABs) (Bovayal et al., 1994; Feng et al., 2011; Wang et al., 2012a). However, most studies focused only on the increased production and/or yield of the extracellular product (propionic acid). Little is known about the effects of ISPR systems on intracellular product (vitamin B12) biosynthesis.

\* Corresponding author at: College of Chemical & Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science & Technology, Shijiazhuang 050018, China. Tel.: +86 311 81668397.

\*\* Corresponding author.

E-mail address: [wangpeng506@sina.com](mailto:wangpeng506@sina.com) (P. Wang).

In addition, in the industrial anaerobic fermentation of vitamin B12, exogenous 5,6-dimethylbenzimidazole (DMB) is usually used as a precursor to promote vitamin B12 biosynthesis (Woodson and Escalante-Semerena, 2006; Chandra and Brown, 2008). However, the main obstacle in this process is the addition of DMB. Current studies have used microexamination to determine the microbial growth state. However, this method is influenced by human factors, leading to an unsteady fermentation concentration. With regard to the fermentation mechanism, a key intermediate (adenosylcobal-amide, AdoCbi) of vitamin B12 has been isolated and characterized in our laboratory. This compound can be used to determine the condition of vitamin B12 biosynthesis corresponding to the molecular weight (Wang et al., 2012b). However, whether or not AdoCbi synthesis induces feed-back inhibition remains unknown, that is needed to be further clarified by the analysis of AdoCbi biosynthesis mechanism.

This study aims to develop an economic and efficient approach to improve vitamin B12 production. Research efforts have focused on determining the reciprocal effects of propionic acid biosynthesis on cell growth and vitamin B12 biosynthesis. An optimal precursor DMB supply strategy was proposed on the basis of the results of AdoCbi biosynthesis analysis. EBAB was employed to produce vitamin B12 using the propionic acid and DMB control method. Repeated fermentative properties in terms of substrate consumption, cell growth, and product biosynthesis were also discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms and medium

*P. freudenreichii* CICC 10019 was obtained from the Chinese Industrial Microorganism Conservation Center. The stock culture was incubated in deep agar slants and then stored at 4 °C. The culture was transferred to new agar monthly.

The preculture medium was composed of the following (per liter of deionized water): glucose, 35 g; corn steep liquor (CSL), 21 g; ammonium sulfate, 5 g; potassium dihydrogen phosphate, 4 g; and cobalt chloride, 0.005 g. The pH before autoclaving was within 6.8–7.0 (adjusted by 12% ammonia solution). The stock sugar solution was autoclaved separately before mixing with the rest of the medium.

The fermentation medium was composed of the following (per liter of deionized water): glucose, 60 g; CSL, 40 g; potassium dihydrogen phosphate, 4.6 g; and cobalt chloride, 0.0127 g. The pH before autoclaving was within 6.8–7.0. Glucose was autoclaved separately for medium preparation.

### 2.2. Propionic acid inhibition fermentation with the EBAB system

Four growth conditions without DMB addition were used in this study to examine the effect of propionic acid biosynthesis on vitamin B12 biosynthesis. The fermentation medium was prepared with different propionic acid concentrations ranging from 0 to 10 g/L, 10 to 20 g/L, and 20 to 30 g/L, respectively, using the EBAB system. The medium with propionic acid but not regulated by the EBAB system was set as a control. The EBAB columns were made of three glass columns packed with Duolite A30 resin; each column was equipped with a stainless steel wire mesh at both ends. A schematic of the columns is shown in Fig. 1, and a detailed description of the EBAB system can be found in the study by Wang et al. (2012a). Sampling and analysis of cell growth and AdoCbi biosynthesis (for vitamin B12 concentration determination) were regularly analyzed throughout the fermentation process.

### 2.3. DMB addition fermentation in shake flasks

Seed culture grown at 30 °C for 24 h and was used to provide 10% (v/v) inocula for fermentation at 30 °C. Five cultivations (50 mL) were employed in a fermentation broth supplemented with 0.9 mg/L DMB solution at 0, 24, 48, 72, and 96 h of fermentation to examine the effects of DMB on intermediate and vitamin B12 biosyntheses. The medium without DMB was set as a control. Accordingly, propionic acid control was dismissed after optimizing DMB fermentation. The samples were examined at specific time intervals to determine cell mass, residual sugars, and products, including AdoCbi and vitamin B12.

### 2.4. EBAB repeated-batch fermentation

Repeated-batch fermentation was performed in the EBAB system on the basis of the optimal approach using the propionic acid and DMB control strategy. Through this process, the fermentation broth with free cells was circulated through the EBA column when propionic acid was separated in the expanded bed column by the semi-continuous mode at specific time intervals. The expanded bed was operated wherein the fermentation broth flowed with a rate of 5 L/h. The columns were alternated and switched to their corresponding valves to repeatedly operate the circulation system after the resin reached saturation.

Vitamin B12 was obtained according to the intermediate biosynthesis level; DMB was added to the fermenter when necessary. Afterward, 90% volume of *Propionibacterium* cells in the fermenter was removed for vitamin B12 separation and purification. Consequently, fresh medium was shifted to the fermenter together with the remaining 10% broth for repeated fermentation. This cycle was repeated five times to obtain high production and yield in the reactor system. Fermentation kinetics was studied, and the total liquid volume in each batch was 1.5 L, including 200 mL in EBAB.

### 2.5. Analytical methods

Cell growth was determined with a spectrophotometer (UV721, Shanghai Precision & Scientific Instrument, China) at a wavelength of 600 nm. Before measuring cell concentrations, 1 mL of broth was centrifuged at 10,000 × g for 10 min, the supernatant was removed, and the cell pellets were resuspended in 1 mL of phosphate buffer.

The concentrations of the principal fermentation products (AdoCbi and vitamin B12) were determined through HPLC as previously described by Li et al. (2008a) with slight modifications. Biosynthetic intermediate AdoCbi and commercial vitamin B12 were used in this study as standards for quantitation. AdoCbi was synthesized from dicyanocobinamide [(CN)<sub>2</sub> Cbi] using homogeneous CobA and CobU enzymes as previously described by O'Toole and Escalante-Semerena (1995). The broth sample (25 mL) was added with 2.5 mL of 8% (w/v) NaNO<sub>2</sub> and 2.5 mL of glacial acetic acid. The mixture was boiled for 30 min and then filtered. The upper aqueous phase was injected into a Waters (Milford, MA) 2695 system automated gradient controller, a Beckman C18 column (5 μm, 4.6 μm × 25 cm) with a flow rate of 1.0 mL/min, and a 2996 Diode Array Detector (Waters Corporation, Milford, MA) in full wavelength at 25 °C. The mobile phase was 250 mmol phosphoric acid/acetonitrile (30/70, v/v).

The fermentation byproduct propionic acid was analyzed by HPLC using the Beckman C18 column, with 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min and a wavelength of 215 nm at 50 °C. Commercially available propionic acid was used as external standard.