

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет)
Кафедра

Біотехнології та екологічного контролю
Біотехнології та мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
ГРЕГІРЧАК Н. М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » лютого 2024р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
СТАБНІКОВ В.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » лютого 2024р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми: «Фармацевтична біотехнологія»
на тему: «Бактерії роду *Propionibacterium* у фармацевтичній біотехнології»

Виконав: здобувач ЗФБ 2 курсу, групи 2М

СЕМЬОНОВА Ганна Вікторівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

_____ (підпис)

Керівник СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

_____ (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент БАБЕНКО Л.П.
(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2024р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 30 ” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СЕМЬОНОВА Ганна Вікторівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Бактерії роду *Propionibacterium* у фармацевтичній біотехнології

керівник роботи доц., к.б.н. СТАРОВОЙТОВА С.О.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023 року № 914-к

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи Біологічний агент: *Propionibacterium acidipropionici*. Продукт: пропіонова кислота. Геометричний об'єм ферментера: 5 м³. Коефіцієнт заповнення: 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Огляд літератури. Техніко-економічне обґрунтування. Обґрунтування етапів виділення та очистки субстанції. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків. Специфікація обладнання. Опис технологічної схеми. Контроль виробництва субстанції. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Опис продукту згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема: 1 аркуш формату А1. Апаратурна 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Огляд літератури	25.02.2023 - 10.04.2023	
2.	Техніко-економічне обґрунтування виробництва субстанції для дезінфікуючого засобу	15.04.2023- 25.04.2023	
3.	Обґрунтування етапів виділення та очистки субстанції для одержання пропіонової кислоти	26.04.2023- 15.05.2023	
4.	Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях отримання пропіонової кислоти	16.05.2023 – 10.06.2023	
5.	Специфікація обладнання	11.06.2023- 25.06.2023	
6.	Опис технологічної схеми	26.06.2023 – 19.07.2023	
7.	Контроль виробництва субстанції для ЛЗ	20.07.2023 – 01.08.2023	
8.	Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання дезінфікуючого засобу	03.08.2023 – 01.09.2023	
9.	Опис дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою згідно АНД	02.09.2023 – 01.10.2023	
10.	Графічна частина	02.10.2023 – 01.12.2023	
11.	Оформлення роботи та підготовка списку літератури	02.12.2023 - 20.01.2024	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Ганна СЕМЬОНОВА
(ім'я та прізвище)

Світлана СТАРОВОЙТОВА
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена проектуванню технології виділення та очищення пропіонової кислоти, як метаболіту після культивування *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232 для отримання дезінфікуючого засобу на основі 15% розчину пропіонової кислоти у флаконах з поліетилену високої щільності (HDPE) в комплекті з помповими дозаторами з механізмом запобігання зворотного всмоктування. В ході порівняння біосинтетичної здатності мікроорганізмів встановили, що найкращим біологічним агентом для синтезу пропіонової кислоти є штам *P. acidipropionici* CGMCC 1.2232, адже він синтезує найбільше цільового продукту – пропіонової кислоти на відносно дешевому середовищі, що являє собою сироватку з лактозою.

Органічні кислоти можуть мати протимікробну дію завдяки своїй кислотній функції, а також своїй структурі. Так, пропіонова кислота проявляє перспективні антимікробні властивості, що обумовлює її використання у складі дезінфектантів.

В ході техніко-економічного обґрунтування було встановлено, що для забезпечення річної потреби у дезінфікуючому засобі для обробки площі 45000 м² 1 раз на місяць необхідно 8100 кг пропіонової кислоти.

Технологічний процес виділення включає приготування допоміжних розчинів, підготовку культуральної рідини, а також стадії виділення та очищення пропіонової кислоти (відділення біомаси центрифугуванням, десорбція пропіонової кислоти сумішшю 1 М NaOH та 70% етанолу, відновлення пропіонату натрію до пропіонової кислоти, адсорбція пропіонової кислоти, концентрування розчину пропіонової кислоти вакуум-випарюванням). Технологічний процес отримання дезінфікуючого засобу включає отримання дезінфікуючого розчину шляхом змішування всіх його складових та фасування розчину у флакони з помповими дозаторами.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, 9 розділів та списку використаної літератури. В роботі використано 121 літературних джерел, кількість сторінок – 124. Робота містить 8 таблиць, 6 рисунків.

Ключові слова: дезінфікуючі засоби, *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232, пропіонова кислота, антимікробні властивості, ферментер, біосинтез.

ABSTRACT

The qualified robot is dedicated to the design technology and purification of propionic acid, as a metabolite after the cultivation of *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232 for the extraction of a disinfectant based on 15% propionic acid acids in bottles made of high density polyethylene (HDPE) complete with pump dispensers with a valve release mechanism. In the course of upgrading the biosynthetic production of microorganisms, it was found that the strain of *P. acidipropionici* CGMCC 1.2232 is the most biological agent for the synthesis of propionic acid, and it also synthesizes the largest amount of the target product – propionic acid on a very cheap middle product, which is lactose whey.

Organic acids can have an antimicrobial effect due to their acidic function, as well as their structure. Thus, propionic acid exhibits promising antimicrobial properties, which makes it a popular choice among disinfectants.

During the technical and economical priming, it was established that in order to meet the river demand for a disinfectant, 8100 kg of propionic acid is required to treat an area of 45,000 m² once a month.

The technological process includes the preparation of additional components, the preparation of cultural raw materials, as well as the stages of purification of propionic acid (biomas separation by centrifugation, desorption of propionic acid adding 1 M NaOH and 70% ethanol, reducing sodium propionate to propionic acid, adsorption of propionic acid, concentrating the solution propionic acid vacuum evaporation). The technological process for extracting the disinfectant agent includes extracting the disinfectant mixture by mixing all of its warehouses and packaging it in bottles with pump dispensers.

The qualification of the work consists of the entry, 9 sections and a list of relevant literature. The work contains 121 literary pieces, the number of pages – 124. The work includes 8 tables, 6 figures.

Keywords: disinfectants, *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232, propionic acid, antimicrobial power, fermenter, biosynthesis.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1. Роль біомаси та метаболітів бактерій роду <i>Propionibacterium</i> у фармацевтичній промисловості.....	11
1.1.1. Пропіонова кислота.....	12
1.1.2. Ціанкобаламін	18
1.1.3. Біомаса бактерій роду <i>Propionibacterium</i> та її пробіотичний потенціал	22
1.1.4. Бурштинова кислота.....	26
1.1.5. Трегалоза.....	29
1.1.6. Бактеріюцини	31
1.2. Біотехнологія отримання пропіонової кислоти представниками роду <i>Propionibacterium</i>	32
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ.....	37
2.1. Аналіз фармакологічних властивостей дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою.....	37
2.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу.....	40
2.2.1. Обґрунтування форми випуску дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою.....	42
2.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою	46
2.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції.....	51
2.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції	56
РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИСТКИ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ПРОПІОНОВОЇ КИСЛОТИ.....	63
РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ ОТРИМАННЯ ПРОПІОНОВОЇ КИСЛОТИ.....	72
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	77
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	79
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ.....	82

РОЗДІЛ 8. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ	87
8.1. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік	87
8.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень	87
8.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	93
8.4. Обґрунтування вибору підготовки води	96
8.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	98
РОЗДІЛ 9. ОПИС ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ З ПРОПОНОВОЮ КИСЛОТОЮ ЗГІДНО АНД	101
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	110
ДОДАТКИ.....	126

ВСТУП

Бактерії роду *Propionibacterium* були виділені та описані в першій половині двадцятого століття Едуардом фон Фройденрайхом, Орл-Йенсенем і ван Нілем. За класифікацією рід належить до класу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales* і родини *Propionibacteriaceae*. Усі класичні бактерії роду *Propionibacterium* мають здатність до ферментації, вони є основними джерелами цінних метаболітів, таких як пропіонова кислота, вітамін B₁₂, бактеріоцини, трегалоза та інші [1, 2]. Серед наведених метаболітів перспективність практичного використання проявляє пропіонова кислота, оскільки даний метаболіт володіє рядом властивостей, що обумовлюють її застосування у складі антимікробних засобів.

Наразі пропіонова кислота переважно виробляється шляхом нафтохімічного синтезу (> 4 105 тонн на рік) через економічні аспекти. Однак зростаючий ринок біопродуктів, зростання цін на нафту та проблеми з навколишнім середовищем перетворили біосинтез на оптимальний варіант, особливо в рамках концепції біопереробки з використанням відновлюваної сировини або промислових відходів, таких як патока, залишковий гліцерин з біодизеля, та інші перспективні субстрати для біосинтезу важливих метаболітів представників роду *Propionibacterium* [3, 4].

Пропіонову кислоту одержують хімічним синтезом з етилену, оксиду вуглецю та пари або з етанолу та оксиду вуглецю, використовуючи в якості каталізатора бору трифторид [5]. Однак хімічний синтез промислово важливих сполук наразі відходить на другий план, оскільки біотехнологічний спосіб біосинтезу є більш екологічно та економічно вигідним. Хімічний синтез пропіонової кислоти потребує певних реагентів та каталізаторів, що здорожчує виробництво, а біотехнологічний метод характеризується зниженим впливом на навколишнє середовище з одночасним отриманням

					НУХТ БТЕК 02.02.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Семьонова Г.В.			Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					8	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

цільової кислоти.

Серед переваг біотехнологічного виробництва пропіонової кислоти виділяють наступні:

- індивідуальні підходи та технології біосинтезу, можливість регулювання процесу шляхом зміни критично важливих параметрів, що забезпечує ефективний вихід пропіонової кислоти;
- використання в якості субстратів відходи різноманітних виробництв, що характеризується екологічністю та економічністю для підприємства;
- досить значна кількість пропіоновокислих бактерій синтезує одночасно пропіонову кислоту з іншими цінними для промисловості метаболітами, що також позитивно впливає на економічну складову;
- прості методи виділення та очищення пропіонової кислоти завдяки її здатності виділятися у культуральну рідину.

Процес дезінфекції є важливою діяльністю, тісно пов'язаною з видаленням мікроорганізмів у системах обробки. Традиційних дезінфікуючих засобів часто недостатньо для уникнення розповсюдження патогенів; отже, інноваційні стратегії знезараження мають вирішальне значення для протидії передачі патогенних мікроорганізмів [6].

Відомі кислотні мийні засоби, які використовують у СІР-мийці для попереднього оброблення технологічного обладнання. Вони містять переважно органічні кислоти C_6-C_{12} з обов'язковим додаванням окиснювачів з вмістом пероксиду водню, пероксикарбонної кислоти та їх сумішей. У засобах із використанням органічних кислот зазначені молочна, оцтова, оксиоцтова, лимонна, глютамінова, глютанова та глюконова кислоти. зазначено, що кількість кислоти в розчині становить від 0,25 мас.% і не перевищує 10 мас.%, але найбільш рекомендовані із вмістом кислоти від 0,5 до 1,5 мас.% [7].

Останні дослідження показали, що введення органічних кислот до складу дезінфікуючих засобів посилює бактерицидну активність органічних кислот та ефективність обробки [8].

Зважаючи на антимікробні властивості пропіонової кислоти та переваги використання органічних кислот в складі дезінфектантів, актуальним напрямком є розробка складу дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль біомаси та метаболітів бактерій роду *Propionibacterium* у фармацевтичній промисловості

Бактерії роду *Propionibacterium* були виділені та описані в першій половині двадцятого століття Едуардом фон Фройденрайхом, Орл-Йенсенем і ван Нілем. За класифікацією рід належить до класу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales* і родини *Propionibacteriaceae*. Усі класичні бактерії роду *Propionibacterium* мають здатність до ферментації, вони є основними джерелами цінних метаболітів, таких як пропіонова кислота, вітамін В₁₂, бактеріюцини, трегалоза та інші [9].

Рід *Propionibacterium* нещодавно перекласифікували на три групи мікроорганізмів: *Propionibacterium* і *Acidipropionibacterium*, які зазвичай містяться в молочних продуктах, і *Cutibacterium*, які зустрічаються на шкірі людей та інших ссавців. Це неспороносні, факультативні анаероби та паличкоподібні грампозитивні бактерії.

Крім пропіонової кислоти та бактеріюцинів, пропіонової бактерії мають здатність до синтезу екзополісахаридів і вітаміну В₁₂ та використовуються як пробіотичний засіб, оскільки ці штами мають статус загально визнаної безпеки – Generally recognized as safe (GRAS) і здатні виживати в травному тракті. Пропіонова кислота відома як інгібітор росту багатьох бактерій і дріжджів, а її вплив як пребіотики на здоров'я людини також привернув певну увагу [2].

Пропіоновокислі бактерії також стимулюють імунну систему та обмежують прогресування раку, хоча задіяний механізм не визначено. Визначили, що молочні пропіонової бактерії здатні запобігати інфекціям та алергіям, сприяти зміцненню імунної системи та знижувати ризик раку, оскільки вони зв'язують канцерогенні сполуки (мікотоксини, рослинні

					НУХТ БТЕК 02.02.16 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Семьонова Г.В.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.				11	26
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 1. Огляд літератури		

лектини та важкі метали). Шкірні пропіонові бактерії демонструють подібний генетичний і біохімічний профіль та знайшли використання в якості попереднього лікування пацієнтів з колоректальною карциною, завдяки імуностимулюючому ефекту [10].

Основними проблемами використання пропіонокислих бактерій як «біофабрик» для виробництва речовин для хіміко-фармацевтичної галузі є повільний ріст представників, слабка стійкість до низького рН та інгібування продукту. В літературі представлено відомості, що для подолання цих обмежень використовувалися різні стратегії, такі як екстракційна ферментація, іммобілізація клітин, послідовне та циклічне періодичне культивування [2].

1.1.1. Пропіонова кислота

Пропіонова кислота та її солі кальцію, калію та амонію знаходять застосування у фармацевтиці, косметиці та сільському господарстві. Наразі ця органічна кислота переважно виробляється шляхом нафтохімічного синтезу (> 4 105 тонн на рік) через економічні аспекти. Однак зростаючий ринок біопродуктів, зростання цін на нафту та проблеми з навколишнім середовищем перетворили біосинтез на оптимальний варіант, особливо в рамках концепції біопереробки з використанням відновлюваної сировини або промислових відходів, таких як патока, залишковий гліцерин з біодизеля, та інші перспективні субстрати для біосинтезу важливих метаболітів представників роду *Propionibacterium* [4].

Вітчизняний та закордонний ринок пропіонової кислоти представлений препаратами, що містять її похідні [11].

М01А Е Похідні пропіонової кислоти:

- М01А Е01 Ібупрофен
- М01А Е02 Напроксен
- М01А Е03 Кетопрофен
- М01А Е09 Флурбіпрофен
- М01А Е14 Дексібупрофен

- M01A E17 Декскетопрофен
- M01A E51 Ібупрофен, комбінації
- M01A E52 Напроксен і езомепразол
- M01A E53 Кетопрофен, комбінації

Згідно АТХ класифікації, група M01A представлена нестероїдними протизапальними та протиревматичними засобами [11].

На сьогодні нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) посідають лідируючі позиції за обсягами споживання населенням [12]. Так, в усьому світі більше 30 млн осіб змушені постійно приймати НПЗЗ, а 300 млн споживають їх короткими курсами. У країнах Європи НПЗЗ посідають перше місце серед лікарських засобів (ЛЗ) для зняття больового синдрому [12].

№ з/п	МНН	Загальна кількість ТН НПЗЗ	Частка у загальній кількості ТН, %	Кількість ТН монокомпонентних НПЗЗ	Кількість ТН комбінованих НПЗЗ
1	2	3	4	5	6
1	Диклофенак	84	21,2	72	12
2	Парацетамол	50	12,6	20	30
3	Ібупрофен	47	11,8	41	6
4	Ацетилсаліцилова кислота	33	8,3	12	21
5	Мелоксикам	31	7,8	31	
6	Метамізол натрію	23	5,8	12	11
7	Німесулід	23	5,8	18	5
8	Кетопрофен	20	5,0	19	1
9	Кеторолак	14	3,5	14	
10	Декскетопрофен	11	2,8	11	
11	Ацеклофенак	8	2,0	8	
12	Лорноксикам	7	1,8	7	
13	Піроксикам	7	1,8	7	

1	2	3	4	5	6
14	Напроксен	6	1,5	4	2
15	Індометацин	5	1,3	5	
16	Целекоксиб	5	1,3	5	
17	Дексібупрофен	3	0,8	3	
18	Еторикоксиб	3	0,8	3	
19	Мефенамова кислота	3	0,8	3	
20	Рофекоксиб	3	0,8	2	1
21	Теноксикам	3	0,8	3	
22	Пропіфеназон	2	0,5		2
23	Етодолак	1	0,3	1	
24	Набуметон	1	0,3	1	
25	Оксацепрол	1	0,3	1	
26	Парекоксиб	1	0,3	1	
27	Фенілбутазон	1	0,3	1	
28	Флурбіпрофен	1	0,3	1	
	Всього	397	100,0	306	91

Рис.1.1. Структура асортименту НПЗЗ за міжнародними непатентованими та торговельними найменуваннями.

Тенденція превалювання НПЗЗ серед інших анальгетиків простежується і в Україні. Препарати даної групи широко використовуються для купірування післяопераційного болю, болю в нижній частині спини, головного болю, в тому числі мігрені. Також НПЗЗ відносять до числа найважливіших симптоматичних ЛЗ, які застосовуються при ревматологічних захворюваннях, що визначається характерним тільки для даної групи препаратів поєднанням протизапальних, анальгетичних і жарознижувальних властивостей.

Найбільша кількість препаратів, зареєстрованих в Україні, представлена країнами Європи, що у сукупності складає 45,3 % загального асортименту, серед яких лідируючі позиції за обсягами постачання НПЗЗ займають Німеччина (6,8%), Словенія (3,8 %), Польща (3,0 %), Ірландія (2,8 %) та Швейцарія (2,8 %). Необхідно зазначити, що достатньо велику частку ЛЗ займають препарати індійського виробництва, що становить 15,9 %. Найменшу кількість асортиментних позицій на фармацевтичному ринку України представляють Єгипет, Йорданія та Японія, які постачають по 0,3% НПЗЗ іноземного виробництва [12].

За даними Державного реєстру лікарських засобів, загальна номенклатура за-реєстрованих в Україні НПЗЗ складає 397 торгових назв препаратів без урахування форм випуску. Разом з тим варто відмітити, що в Україні виробляється близько 135 торгових найменувань досліджуваних препаратів з урахуванням лікарських форм, а 262 торгові назви НПЗЗ представлені закордонними виробниками [12].

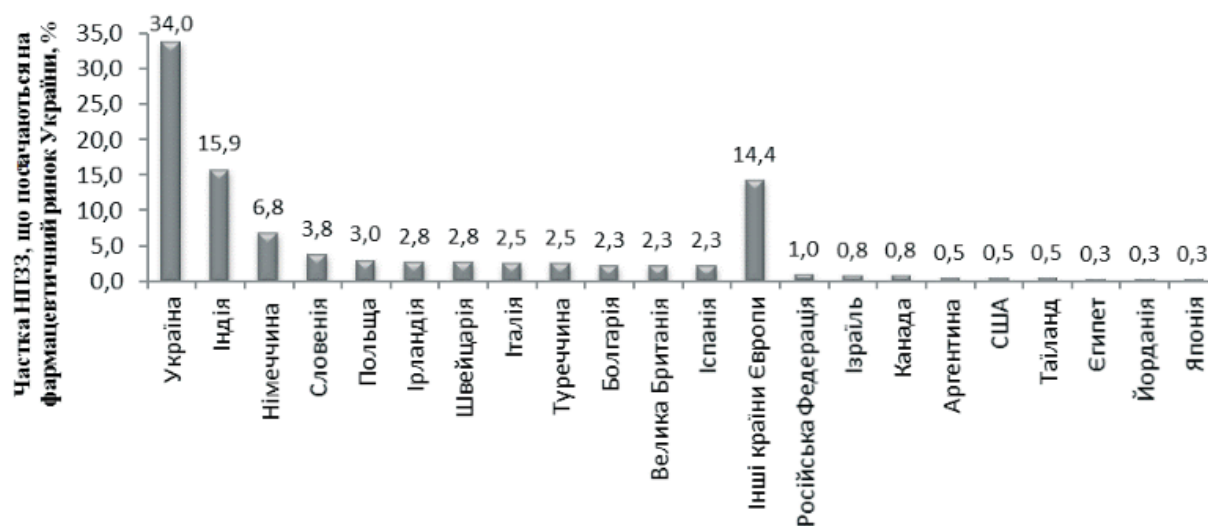


Рис.1.2. Розподіл зареєстрованих в Україні НПЗЗ за країнами-виробниками [12].

Як бачимо з рис. 1.2, найбільша частка зареєстрованих в Україні препаратів похідних пропіонової кислоти належить саме препаратам вітчизняного виробництва. Вполовину менше належить препаратам індійського походження.

Варто відмітити, що зазвичай сировина для виробництва лікарських препаратів на основі пропіонової кислоти та її похідних має закордонне походження та отримується шляхом хімічного синтезу.

Китайські постачальники зазначають [13], що пропіонова кислота їхнього виробництва може бути отримана з формальдегіду та пропіональдегіду шляхом конденсації та реакцій окислення. Пропіонова кислота китайського походження являє собою білий кристалічний порошок, її вміст у субстанції складає більше 98% згідно із сертифікатом виробника.

指标名称Index	标准Standard
外观Appearance	白色粒状晶体White crystal
含量Content (%)	≥98
水份Water (%)	≤0.3
熔点Melting Point (°C)	≥180
灰份Ash (%)	≤0.03
残醛Residue Formaldehyde (%)	≤0.03
酸值Acid Value (mgKOH/g)	380.0-430.0
羟值Hydroxyl Value (mgKOH/g)	810-860
铁Fe ³⁺ (PPM)	≤5
钾K ⁺ (PPM)	≤10
丙酮-三乙胺溶解试验 Acetone-Et ₃ N Soluble Experiment	澄清透明 Transparent

Рис. 1.3. Сертифікат якості на пропіонову кислоту китайського постачальника.

Дана сировина постачається у барабанах фасуванням по 25 кг [13].

Також на ринку Індії наявна значна кількість постачальників пропіонової кислоти хімічного походження [14]. Пропіонова кислота представлена у вигляді сухого порошку та розчинів, за призначенням поділяється на сировину, призначену для виробництва, та стандартні зразки для лабораторних досліджень. Індійські виробники постачають пропіонову кислоту фасуванням від 100 г до 200 кг, чистота субстанції складає від 95% і досягає більше 99% [14].

На рис. 1.4 зображено які форми препаратів похідних пропіонової кислоти наявні на вітчизняному фармацевтичному ринку.

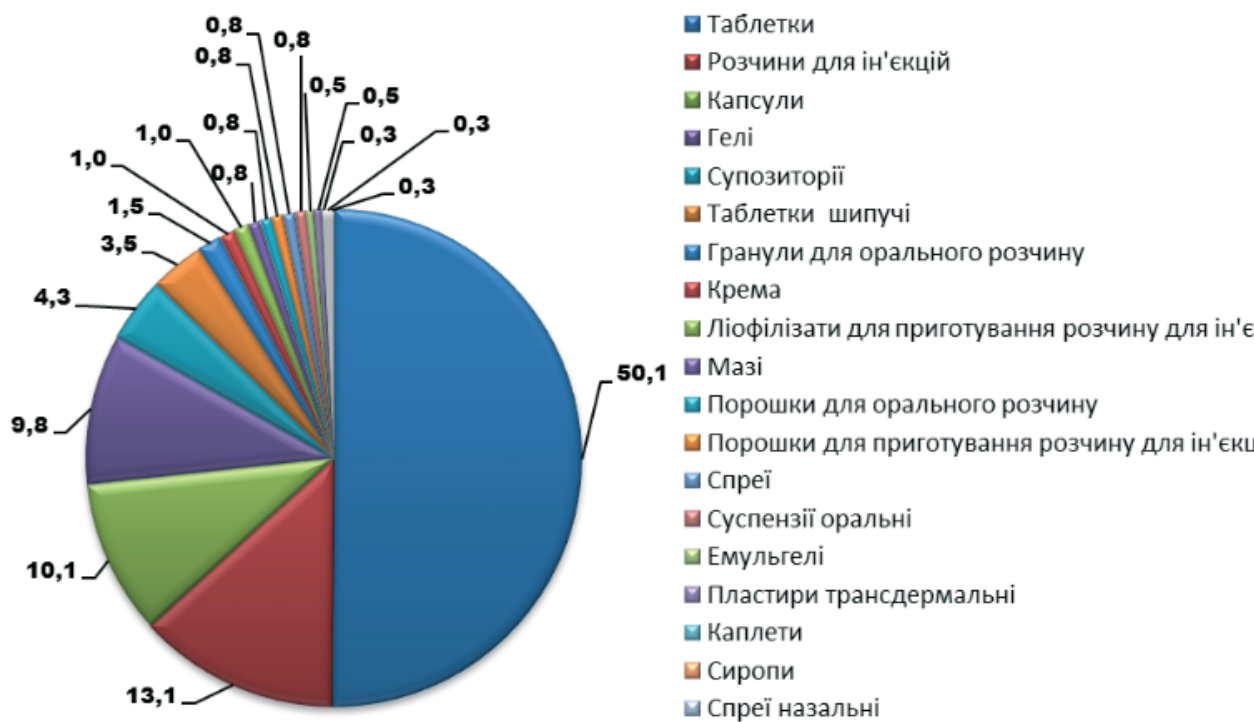


Рис. 1.4. Розподіл НПЗЗ за формою випуску [12].

Статистичні дані обсягів виробництва препаратів похідних пропіонової кислоти обумовлюють необхідність пропіонової кислоти для вітчизняної фармацевтичної промисловості.

Пропіонову кислоту одержують хімічним синтезом з етилену, оксиду вуглецю та пари або з етанолу та оксиду вуглецю, використовуючи в якості каталізатора бору трифторид. Також пропіонову кислоту отримують з природного газу. Також ця кислота виступає побічним продуктом у піролізі деревини. Очищену пропіонову кислоту одержують з пропіонітрилу [15].

Однак хімічний синтез промислово важливих сполук наразі відходить на другий план, оскільки біотехнологічний спосіб біосинтезу є більш екологічно та економічно вигідним. Хімічний синтез пропіонової кислоти потребує певних реагентів та каталізаторів, що здорожчує виробництво, а біотехнологічний метод характеризується зниженим впливом на навколишнє середовище з одночасним отриманням цільової кислоти.

Загальні переваги біотехнологічних виробництв:

- можливість отримання специфічних і унікальних природних речовин, частину з яких ще не вдається отримувати іншим шляхом;

- проведення біотехнологічних процесів при відносно невисоких температурах і тисках;
- високі швидкості росту і накопичення біомаси та цільових продуктів;
- використання в якості сировини дешевих відходів сільського господарства і промисловості;
- біотехнологічні процеси зазвичай екологічні, дають менше шкідливих відходів і близькі до природних процесів;
- технологія та апаратура біотехнологічних виробництв прості, а також недорогі.

Серед переваг біотехнологічного виробництва пропіонової кислоти виділяють наступні:

- індивідуальні підходи та технології біосинтезу, можливість регулювання процесу шляхом зміни критично важливих параметрів, що забезпечує ефективний вихід пропіонової кислоти;
- використання в якості субстратів відходи різноманітних виробництв, що характеризується екологічністю та економічністю для підприємства;
- досить значна кількість пропіоновокислих бактерій синтезує одночасно пропіонову кислоту з іншими цінними для промисловості метаболітами, що також позитивно впливає на економічну складову;
- прості методи виділення та очищення пропіонової кислоти завдяки її здатності виділятися у культуральну рідину.

1.1.2. Ціанкобаламін

Ціанкобаламін (вітамін В₁₂) – це АФІ природного походження, синтезується бактеріями роду *Propionibacterium*. Фармакологічні ефекти: протианемічний, метаболічний, гепатопротекторний, нейропротекторний, гіпохолестеринемічний, репаративний; активує згортальну систему крові. В організмі, який росте, сприяє синтезу жирів, у дорослому — їх утилізації. Застосування: хронічні анемії, що супроводжуються дефіцитом вітаміну В₁₂, мієлоз, травматичні ушкодження та запальні процеси периферичних нервів, боковий аміотрофічний склероз, енцефаломієліт, розсіяний склероз,

діабетична нейропатія, дитячий церебральний параліч, хвороба Дауна, захворювання шкіри, травматичні пошкодження кісток та стан після хірургічних операцій на опорно-руховому апараті (при гальмуванні кісткової консолідації), гострі та хронічні гепатити, цироз печінки і променева хвороба, радикуліти, мігрені, каузалгії, дистрофія у недоношених та новонароджених дітей після перенесених інфекцій [16].

Пропіоновокислі бактерії здатні до ефективного синтезу вітаміну В₁₂. Вітамін В₁₂ є важливим кофактором у метаболізмі вуглеводів, ліпідів, амінокислот і нуклеїнових кислот. Таким чином, вітамін є важливою добавкою до кормів для тварин і використовується в хіміотерапії, зокрема, для запобігання перніціозної анемії. Досі вітамін В₁₂ вироблявся шляхом ферментації в промислових масштабах, оскільки хімічний синтез вітаміну дуже складний. Довгий час пропіоновокислі бактерії використовувалися для виробництва вітаміну В₁₂. Наразі дві третини вітаміну В₁₂ виробляється *Pseudomonas denitrificans*, а решта – *Propionibacterium freudenreichii*. Оскільки вітамін, вироблений двома видами, продається за однаковою ціною, переваги використання того чи іншого процесу здаються незначними. Швидкість виробництва вітаміну В₁₂ становить близько 20 мг на літр культури, у випадку використання пропіоновокислих бактерій цільовий вітамін є внутрішньоцитоплазматичний, на відміну від екзогенного способу біосинтезу псевдомонадами [17].

Так, у роботі [18] досліджували вплив коферментації на вміст вітаміну В₁₂ і мікробіологічний склад пшеничних висівок. *P. freudenreichii* DSM 20271 використовувався як продуцент вітаміну, тоді як *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 був обраний для забезпечення мікробної безпеки висівкового тіста. Рівень вітаміну В₁₂ досяг 357 ± 8 нг/г сухої маси після 1 дня рН-контрольованої ферментації з монокультурою *P. freudenreichii* DSM 20271. Під час спільної ферментації з *L. brevis* ATCC 14869 за 1 день було утворено трохи менше вітаміну В₁₂ (255 ± 31 нг/г сухої ваги), спостерігали ефективно

пригнічення росту представників роду *Enterobacteriaceae* і *Bacillus cereus*. Рівень рН контролювали на рівні 5,0, підтримували температуру 32°C.

У дослідженні [19] вивчався вплив різних довжин хвиль світла на швидкість росту та синтезу вітаміну В₁₂ *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* DSM 20270. Були обрані червоні, зелені та сині світлодіоди, а відсутність світла використовували як контроль. Значення оптичної густини при 600 нм (OD₆₀₀) показали, що штам DSM 20270 краще росте в умовах забезпечення синього світла. Крім того, в умовах синього світла *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* DSM 20270 мав тенденцію до більш високої швидкості росту (0,332 год⁻¹) і синтезу вітаміну В₁₂ – приблизно 10 мкг/мл у стічних водах тофу, ніж при відсутності світла. Так, результати транскрипції гена *cbiB* показали, що синє світло індукує синтез ферменту синтезу вітаміну В₁₂. Вирощування здійснювали 72 години при 30 °С.

У дослідженні [20] визначено особливості біосинтезу вітаміну В₁₂ потенційною пробіотичною бактерією з використанням агропромислових залишків, рідкого кислотного білкового залишку сої (вміст цукрів 51,45 г/л) як недорогого альтернативного культурального середовища, що не містить похідних тваринного походження. У цьому повністю рослинному середовищі клітини *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 виробляли високі концентрації вітаміну В₁₂ (0,6 мг/г клітин). Культивування проводили при 30°C, 200 об/хв, рН 6,5. Кінетика росту клітин була розділена на дві стадії, спочатку 72 години в анаеробіозі, потім 96 годин в мікроаерофільних умовах, підтримуючи швидкість аерації на рівні 0,5 об/об/хв.

Біосинтез вітаміну В₁₂ на відходах смаження соняшникової олії як економічно ефективного і відновлюваного субстрату дослідили у статті [21]. Кількість 4% мас./об. олії виявилася оптимальною для виробництва вітаміну В₁₂. Середовище, що містить 35,56 мг/л ДМБ, 14,69 мг/л СоСl₂*6Н₂О, 5,82 мг/л FeSO₄*7Н₂О та 11,41 мг/л СаСl₂*2Н₂О, забезпечує максимальну концентрацію вітаміну В₁₂ – 2,60 мг/л при 130 об/хв і температурі 30 °С після вирощування протягом 120 годин.

З метою оптимізації середовища для виробництва вітаміну В₁₂ із сирого гліцерину штамми *Propionibacterium freudenreichii* sp *shermanii* було використано двоетапне культивування [22]. *P. freudenreichii* sp. *shermanii* 1, *P. freudenreichii* sp. *shermanii* 41 та *P. freudenreichii* sp. *shermanii* 566 розглядали для синтезу вітаміну. Через 96 годин додавали 16 мг/л 5,6-диметилбензімідазолу, загальний час становив 168 год, кількість гліцерину становила 10-40 г/л. Вдалось досягти найвищої концентрації вітаміну В₁₂ 3,867 мг/л за допомогою *P. freudenreichii* sp. *shermanii* 1 при 30°C і рН 6,8.

Авторами роботи [23] визначено, що *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 у процесі росту продукує 31,67 мг/л вітаміну В₁₂. Після 72 год анаеробної інкубації поживне середовище, що містило 2 г/л глюкози, інкубували протягом 60 год в аеробних умовах за перемішування 200 об/хв, 37°C та рН 7.

Вітамін В₁₂ широко використовується у фармакологічному секторі, де, окрім CN-кобаламін, також виробляються та розповсюджуються інші форми, такі як ОН-кобаламін, Адо-кобаламін і Met-кобаламін, завдяки їх більш високому поглинанню та більш стійким рівням у сироватці. Фармакологічний вітамін В₁₂ представлений у різних формах, таких як назальні спреї, пероральні та сублінгвальні продукти та навіть прями ін'єкції для лікування перніціозної анемії, дефіциту В₁₂, отруєння ціанідами та зниження рівня гомоцистеїну. Є також кілька тверджень щодо його позитивного впливу на пацієнтів із хворобою Альцгеймера та в якості стимулятора імунної системи, хоча для підтвердження цього потрібні додаткові докази [24].

Враховуючи різноманітні способи використання та ринки, не дивно, що загальне світове виробництво та обсяг ринку вітаміну В₁₂ неухильно зростають, хоча точні світові ринкові значення важко отримати через дефіцит достовірної інформації. Проте можна з упевненістю припустити значне зростання загального виробництва за останні десятиліття. У 1989 році загальний обсяг виробництва становив близько 3 тонн на рік, а до 2005 року

він уже зріс до 10 тонн і мав ринкову вартість приблизно 77 мільйонів євро. Виробництво в Китаї в 2020 році досягло 31,41 тонн з ринковою вартістю 339,48 мільйонів доларів США, однак існують прогнози, що ринок вітаміну В₁₂ досягне загальної вартості 410 мільйонів доларів США до 2027 року. Поступове збільшення чисельності літнього населення, зростання альтернативних веганських і вегетаріанських дієт, а також дефіцит продуктів тваринного походження є факторами, які пояснюють таке різке зростання ринку, а також є причинами очікування зростання ринку препаратів ціанокобаламіну [24].

1.1.3. Біомаса бактерій роду *Propionibacterium* та її пробіотичний потенціал

В літературі наведено ряд робіт, присвячених дослідженню пробіотичних властивостей пропіоновокислих бактерій. Дослідники акцентували увагу на тому, що такі дослідження були зумовлені високою харчовою цінністю та сприятливою динамікою споживчого попиту на таку продукцію.

Так, Голуб Б. зі співавторами [25] зазначили, що існує низка робіт відносно наявності пробіотичних властивостей у різних видів *Propionibacterium*, але визнаним пробіотиком є лише один вид – *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Найважливішими з них, крім зазначеного вище виду, є *Propionibacterium acidipropionici*, *P. thoenii* та *P. jensenii*. Отже, було досліджено способи стимулювання біфідофлори пропіоновокислими бактеріями при ферментації молока без участі інших молочнокислих бактерій. Для цього проведено порівняльний аналіз впливу культивованих спільно пропіоновокислих бактерій на пробіотичні штами біфідобактерій, вирощуваних на мікробіологічних середовищах та в коров'ячому молоці при виготовленні кисломолочного напою типу простокваша. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 5103 інбукували 96 год. Ферментація на мікробіологічних середовищах показала наявність стимулювального ефекту пропіоновокислих бактерій на розвиток

біфідобактерій. Найбільший вплив виявлено при вирощуванні монокультур. У випадку культивування суміші біфідобактерій та пропіоновокислих бактерій ймовірно вираженішим є взаємне стимулювання.

При виготовленні кисломолочного продукту пропіоновокислі бактерії посилили ріст штаму *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 на 49 %, а штаму *Bifidobacterium longum* VKPM-1514 – на 39 %. Використання *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 5103 дало змогу також скоротити час утворення згустка: з 8.3 до 7.0 год для штаму BB-12 і з 7.5 до 6.5 год – для штаму VKPM-1514. Таким чином, було доведено позитивний вплив пропіоновокислих бактерій на біфідофлору при їх спільному культивуванні [25].

Винахід, що стосується складу їстівної плівки з пробіотиком, що містить пропіоновокислі бактерії, з'явився у вітчизняній літературі в 2017 році [26]. Даний винахід може використовуватися для одержання продуктів з підвищеною харчовою цінністю, а також спеціального і профілактичного призначення. До складу плівки входили: крохмаль модифікований з високоамілозних сортів кукурудзи – 0,5-5%, желатин – 0,5-3%, гліцерин 0,5-2%, пробіотик, що містив ряд бактерій, включаючи *P. freudenreichii* – 0,5-1,5%, а також вода. *P. freudenreichii* було обрано зважаючи на те, що дана культура створює середовище, в якому ростуть біфідобактерії, виробляє пропіонову і оцтову кислоти, а також речовини, активні щодо ентеробактерій, гнильних бактерій, грибів, бере участь в ферментації вуглеводів і вітаміноутворенні, сприяє засвоєнню вітаміну B₁₂.

Так, у зразку хліба з таким пробіотиком кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів була нижче ($3,3 \times 10^2$), на відміну від контрольного зразка, де МАФМ збільшувався – $6,3 \times 10^3$. Також кількість молочнокислих бактерій в зразку при зберіганні виробу, обробленого покриттям, що містить пробіотик, зменшувалась на два порядки, так як на поверхні хліба відсутнє живильне середовище [26].

Пробіотичним властивостям та біотехнологічному потенціалу пропіоновокислих бактерій була присвячена стаття Л.В. Капрельянц та Л.А. Крупицької [27]. Автори розглянули дані наукової літератури щодо фізіологічних та біохімічних властивостей пропіоновокислих бактерій, зокрема про їх метаболічну здатність бути в ролі препаратів та продуктів пробіотичного призначення при дисбіотичних порушеннях шлунково-кишкового тракту. Зокрема, важливу роль відіграють антиоксидантні ферменти, такі як супероксиддисмутаза та каталаза, які синтезують представники роду *Propionibacterium*. Загалом пропіоновокислі бактерії відіграють важливу роль у підтриманні балансу мікробної екосистеми людини, тому актуальною ж розробка пробіотичних препаратів нового покоління з включенням даної бактеріальної культури.

Окрім цього, в базі патентів України за останні 10 років налічуються патенти, присвячені одержанню пробіотичних препаратів з пропіоновокислими бактеріями у їх складі [28-31].

Спосіб одержання мультипробіотика “симбілакт пролісок” наведено у патенті [28]. Спосіб одержання мультипробіотика передбачає приготування живильного середовища на молочній основі, культивування клітин полівидового симбіозу, до складу якого входять біфідобактерії, молочнокислі стрептококи, лактобацили виду, оцтовокислі та пропіоновокислі бактерії видів *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* і *P. acidipropionici*, відділення біомаси, змішування її з захисним середовищем і пакування. Процес культивування проводили протягом 22 годин при температурі 37 °С і рН 6,5.

Спосіб одержання мультипробіотика “симбілюкс” представлено Широбоковим зі співавторами [29]. Процес був ідентичний описаному у попередній роботі, мультипробіотик містив бактерії роду *Propionibacterium*, після одержання біомаси її змішували з бентоніто-олійним гелем. Особливістю було введення до складу поживного середовища шроту насіння льону й морквяного пюре, а до складу бентоніто-олійного гелю - масло амаранту, катіони йоду, цинку й селену. Інокульоване середовище

інкубували при температурі 35 °С протягом 24 год. Готовий мультипробіотик містить $2,2 \times 10^9 / \text{см}^3$ життєдіяльних клітин пробіотичних бактерій, 2 % бентоніту, 1 мкг/см³ селену, 5 мкг/см³ йоду, 0,5 мг/см³ цинку, 2 % риб'ячого жиру, 1,5 % олії зародків пшениці й 1,5 % олії амаранту.

Також було досліджено спосіб виробництва лікувально-профілактичного кисломолочного продукту “лактіум” [30]. Спосіб виробництва лікувально-профілактичного кисломолочного продукту передбачає нормалізацію, гомогенізацію та пастеризацію молочної суміші, охолодження до температури заквашування, внесення закваски, що містить набір бактерій, зокрема і пропіоновокислі – *P. freudenreichii shermanii* ВКПМ В-7530.

Особливості одержання бактеріальної закваски “біфідолакт” встановили автори роботи [31]. До складу бактеріальної закваски залучали біфідобактерії *Bifidobacterium bifidum* ІМВ В-7032, *B. longum* ІМВ В-7033, *B. adolescentis* ІМВ В-7035 у співвідношенні 1:1:1, термофільні молочнокислі *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* ІМВ В- 7179, ВКПМ В-7773, В-7774 у співвідношенні 1:1:1, та пропіоновокислі бактерії *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* ІМВ В-7290, зі співвідношенням між видами мікрофлори 5:3:2. Проводили накопичення біомаси - сумісне культивування біфідобактерій та пропіоновокислих бактерій за температури (37±1)°С протягом (7±1) год, після чого вносили термофільні молочнокислі бактерії і культивували ще (7±1) год. В результаті отримували бактеріальну закваску, яка містить в 1 г не менше 1×10^{10} життєздатних клітин біфідобактерій, 1×10^{10} молочнокислих і 1×10^9 пропіоновокислих бактерій [31].

Оскільки пробіотики демонструють різноманітний спектр біологічних функцій, вони є перспективним терапевтичним допоміжним засобом для лікування та/або профілактики різних захворювань, включаючи нейродегенеративні розлади, рак, остеопороз, серцево-судинні захворювання та запальні захворювання. Останніми роками пробіотики як основні системи доставки ліків також привертають велику увагу, оскільки вони забезпечують

додаткові переваги, включаючи інгібування клітинної адгезії та інвазії патогенних організмів, антимікробну активність і модуляцію імунної відповіді господаря. Зокрема, вони можуть бути економічним і надійним способом доставки макромолекул, таких як рекомбінантні білки, цитокіни та ферменти. Таким чином, пробіотики можна використовувати не тільки як ефективні терапевтичні допоміжні засоби, але й як носії доставки ліків [32].

1.1.4. Бурштинова кислота

Бурштинова кислота та її солі, як продукти обміну речовин, володіють потужною захисною дією і є стимуляторами вироблення імунітету до нових для організму шкідливих речовин. Сукцинатовмісні лікарські препарати призначаються з лікувально-профілактичною метою у вигляді замісної, регулюючої і модулюючої терапії в кардіології, неврології, гепатології. Натрію сукцинат входить до складу ряду лікарських засобів на основі антибіотиків та глюкокортикостероїдів [33].

Китайські вчені дослідили ефективне спільне виробництво пропіонової кислоти та бурштинової кислоти *Propionibacterium acidipropionici* з використанням технології розділення мембран [34]. У середовищі для *P. acidipropionici* CGMCC 1.2230 були такі компоненти: глюкоза 60 г/л, кукурудзяний лікер – 41 г/л, 4,6 г/л KH_2PO_4 . Забезпечували температуру 30 °С, перемішування 50 об/хв. Під час культивування стерильне повітря не було потрібне, а рН контролювався на рівні 6,5 шляхом автоматичного додавання $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ протягом 180 годин. Здійснювали підживлення глюкозою (500 г/л). Концентрації пропіонової та бурштинової кислот досягли $62,22 \pm 2,32$ та $20,45 \pm 1,34$ г/л відповідно.

Здатність до біосинтезу практично цінних кислот мав і штам *P. acidipropionici* ATCC 4875 [35]. Три послідовні ферментації проводили протягом 70 годин з рециркуляцією клітин у чотирьох одночасно працюючих біореакторах, при рН 6,5, 30°С і 100 об/хв. *P. acidipropionici* ATCC 4875 був здатний виробляти пропіонову та бурштинову кислоти з сорбіту (10-80 г/л).

Концентрація пропіонової кислоти становила $39,5 \pm 5,2$ г/л, а кількість бурштинової досягла $14,8 \pm 0,9$ г/л.

Одним з пріоритетних напрямків сучасної фундаментальної і практичної медицини є застосування лікарських засобів на основі бурштинової кислоти та її похідних. Бурштинова кислота (БК) та її солі (сукцинати) - внутрішньоклітинні метаболіти, важливі проміжні продукти обміну живих організмів, що приймають активну участь у процесах клітинного дихання. Вміст БК в плазмі крові людини в нормі становить у середньому $0,5$ мг/100 мл, вона добре впливає на обмін речовин, підтримує діяльність ендокринної та нервової системи, що доставляє кисень тканинам, покращує засвоюваність поживних речовин, нормалізує рівень медіаторів запалення гістаміну і серотоніну, підвищує мікроциркуляцію в органах і тканинах без зміни системної гемодинаміки. Через дефіцит БК в організмі утворюються вільні радикали, що негативно впливає на здоров'я в цілому. Бурштинова кислота та її солі, як продукти обміну речовин, володіють потужною захисною дією і є стимуляторами вироблення імунітету до нових для організму шкідливих речовин. Сукцинатовмісні лікарські препарати призначаються з лікувально-профілактичною метою у вигляді замісної, регулюючої і модулюючої терапії в кардіології, неврології, гепатології. Натрію сукцинат входить до складу ряду лікарських засобів на основі антибіотиків та глюкокортикостероїдів [33].

Бурштинова кислота та її похідні широко застосовуються у виготовленні метаболічних медикаментозних засобів, що мають антиоксидантні та антигіпоксичні властивості. Області застосування препаратів БК вельми різноманітні і включають кардіологію, неврологію, ендокринології, токсикологію і наркологію, інфекційні хвороби, педіатрію, відновну медицину. Досить успішно використовують ці препарати в хірургії, пульмонології, гематології, дерматології, акушерстві, гінекології та ендокринології особливо при лікуванні ускладнень цукрового діабету, таких як синдром діабетичної коми та сенсомоторна поліневропатія. Такий

широкий спектр застосування БК обумовлено безпосередньою участю сукцината в процесах тканинного дихання і окисного фосфорилування в мітохондріях, здатність сукцината підтримувати енергосинтезуючу здатність клітин в умовах гіпоксії.

Саме дефіцит сукцината завжди приводить до розвитку гіпоксії, до порушення субстратної ланки в дихальному ланцюзі мітохондрій [33].

Відомо, що у природних умовах продукція бурштинової кислоти відбувається в мітохондріях (Мх), з яких вона практично не виходить оскільки миттєво використовується за місцем утворення. Поза Мх, поза клітини, та у кровообігу дана сполука зазвичай відсутня. Вона з'являється поза Мх при тяжкому анаеробіозі, при глибокій гіпоксії або при активації систем відтворення бурштинової кислоти при одночасному гальмуванні ферментної системи її окислення, в умовах вираженого енергетичного дефіциту. Отже, рецепторні регульовальні системи організму оцінюють появу в кровообігу даної сполуки, як сигнал на те, що в якійсь ділянці не вистачає енергетичних ресурсів або є кисневе голодування. Організм реагує на цей сигнал відповідними змінами в системах нейроендокринної, гормональної регуляції, поліпшенням периферичного кровообігу, підвищенням сили серцевих скорочень, полегшенням віддачі кисню оксигемоглобіном і низкою інших фізіологічних та біохімічних компенсаторних реакцій [36].

Було досліджено зміни, які відбуваються з функціональним станом спортсменів під час тривалих фізичних навантажень за рахунок вживання сукцинату натрію. Встановлено, що курсове застосування сукцинату натрію мало позитивний ефект для метаболізму, цитоархітектоніки і функціональних можливостей еритроцитів, відмічалась висока фізична активність і низька втомлюваність [36].

В даний час лікарські засоби, що містять сукцинати, існують і застосовуються як в пероральній, так і в парентеральній формах. БК та НС як лікарські засоби можуть застосовуватися в монотерапії, а також в поєднанні з іншими препаратами. Найбільша кількість лікарських засобів це комбіновані

системи, що складаються з допоміжних речовин, які доповнюють, потенціюють дію активних фармацевтичних інгредієнтів, а також покращують переносимість ЛЗ [33].

1.1.5. Трегалоза

Щодо трегалози, то ця сполука являє собою нередукуючий дисахарид, що складається з двох молекул глюкози, поєднаних α, α -1,1-зв'язком. У фармацевтичній та косметичній галузі трегалоза знайшла застосування в якості стабілізатора ліпосом та зволожувача. У медицині трегалоза використовується для стабілізації антитіл, ад'ювантів, ферментів та з метою захисту клітин ссавців упродовж сублімаційного висушування [37].

Досліджено, що пропіоновокислі бактерії є й ефективними продуцентами трегалози. Трегалоза є стабільним невідновлюючим дисахаридом із різноманітним застосуванням, ця речовина широко поширена в природі. Трегалоза накопичується в бактеріальних клітинах у відповідь на стресові умови; тому мікробний синтез використовують для комерційного виробництва трегалози. Раніше повідомлялося про медичне використання трегалози для зменшення симптомів таких захворювань, як хорія Хантінгтона та остеопороз [38, 39].

Трегалоза використовується для захисту клітин від тепла, холоду, окислення або зневоднення. Було встановлено, що трегалоза посилює аутофагічну активність. Показано, що трегалоза сприяє клітинному виведенню патогенних білків, таких як мутантний гентінгтин, α -синуклеїн і тд, які пов'язані з хворобами Паркінсона, Альцгеймера відповідно. Однак більш детального вивчення потребує роль трегалози в клітинному метаболізмі білка-попередника амілоїду, пов'язаного з хворобою Альцгеймера.

Встановлено, що трегалоза має нутрицевтичну цінність. Вона вдвічі солодша за сахарозу, забезпечує великий запас енергії та викликає дуже низьку реакцію на інсулін. Різні підходи до промислового виробництва трегалози включають як ферментативне перетворення, так і її накопичення

під час ферментації глюкози з використанням дріжджових клітин. Хоча ферментативні методи є ефективними для виробництва трегалози, однак мікробний, зокрема бактеріальний синтез, є більш перспективним підходом для комерційного виробництва [38, 39].

Автори статті [40] повідомили про здатність кількох штамів з роду *Propionibacterium* продукувати трегалозу з чистого та неочищеного гліцерину. Найвищу концентрацію трегалози 195,04 мг/л було отримано після культивування штаму *P. freundenreichii* ssp. *shermanii* 1 у середовищі з 8 % чистого гліцерину при 30°C, рН 7 протягом 168 годин.

Покращення виробництва трегалози з відходів виробництва біодизелю з використанням мутанта *P. freundenreichii* subsp. *shermanii* в аеробних умовах дослідили у роботі [41]. За умов аерації при 30% насичення повітрям та перемішування 200 об/хв споживалося приблизно 98 % неочищеного гліцерину як субстрату. За використання вихідного штаму було досягнуто концентрації трегалози 361 мг/л, тоді як у мутантному штамі *P. shermanii* NCIM 5137 кількість трегалози становила 1,3 г/л. З використанням сирого гліцерину як субстрату вдалось досягти концентрації трегалози приблизно 1,56 г/л за вирощування мутантного штаму при 30 °C, рН 6,8 упродовж 24 годин .

У іншій статті було оптимізовано виробництво трегалози при забезпеченні концентрації лактози 20 г/л, температурі 30°C і швидкості перемішування 100 обертів за хвилину [37]. За цих умов був отриманий найвищий вихід трегалози (595 мг/л). При контролі рН на рівні 7 та при додаванні лактози у кількості 60 г/л упродовж 222 год концентрація трегалози в кінці культивування штаму *P. acidipropionici* DSM 20273 досягла 0,925 г/л.

Аналоги трегалози демонструють властивості, які представляють інтерес для фармацевтичної галузі. Оскільки трегалоза є основним метаболітом для мікобактерій, дезокси- або азидопохідні трегалози утворюють цінні сполуки для пригнічення росту мікобактеріальних клітин

або для подальшого виявлення *Mycobacterium tuberculosis*, збудника туберкульозу [42].

1.1.6. Бактеріюцини

В останні кілька десятиліть велика увага приділялася виділенню, характеристиці та механізму дії бактеріюцинів. Бактеріюцини - це антибактеріальні пептиди або білки, що виробляються широким спектром мікроорганізмів. Бактеріюцини, що виробляються мікроорганізмами харчового призначення, такими як молочнокислі бактерії та пропіоновокислі бактерії, становлять особливий інтерес через їх потенційне застосування для консервування харчових продуктів. Хоча низка бактеріюцинів з грампозитивних бактерій показала відносно широкий інгібуючий спектр, більшість вже досліджених бактеріюцинів має загалом вузький діапазон активності [43].

Відомо, що проблема виникнення та стрімкого поширення антибіотикорезистентності патогенів стає дедалі серйознішою внаслідок зловживання антибіотиками. Бактеріюцини є ефективною альтернативою антибіотикам. Бактерицидний механізм бактеріюцинів в основному локалізується в рецепторах, що зв'язуються на поверхні бактерій, а потім через мембрану, що викликає цитотоксичність бактерій. Крім того, бактеріюцини є малотоксичними пептидами або білками, чутливими до протеаз, таким як трипсин і пепсин [44].

У роботі [45] наведено очищення та характеристику пропіоніцину F, першого бактеріюцину, виділеного з *Propionibacterium freudenreichii*. Бактеріюцин пропіоніцин F володів бактерицидною активністю лише проти штамів *P. freudenreichii*.

З двох штамів *Propionibacterium thoenii* було виділено новий бактеріюцин під назвою пропіоніцин T1. Цей бактеріюцин не має послідовності, подібної до інших бактеріюцинів. Пропіоніцин T1 проявляв антимікробну дію проти всіх протестованих штамів *P. acidipropionici*, *P.*

thoenii та *Propionibacterium jensenii*, а також проти *Lactobacillus sake* NCDO 2714 [46].

Екстрагований з твердого середовища бактеріоцин, синтезований штамом *P.thoenii* P127 (ATCC 4874), був інгібуючим для деяких грамнегативних бактерій, дріжджів і цвілі, що обумовлює перспективність його використання у фармацевтичній галузі [47].

1.2. Біотехнологія отримання пропіонової кислоти представниками роду *Propionibacterium*

Пропіоновокислі бактерії роблять важливий внесок у розвиток фармацевтичної галузі. Зокрема, дослідники вважають, що пропіонова кислота може пригнічувати синтез простагландинів. Фармацевтичні компанії зазвичай включають пропіонову кислоту, яка є метаболітом пропіоновокислих бактерій, в рецептуру стероїдних і нестероїдних протизапальних препаратів. Аспірин, ібупрофен та інші безрецептурні та рецептурні протизапальні препарати зазвичай містять пропіонову кислоту як естер. У цій формі сполука приєднується до активних інгредієнтів ліків. Інгалятори з флютиказоном, які використовуються при респіраторних захворюваннях, зазвичай містять пропіонову кислоту. Сполука часто супроводжує стероїдні препарати, включаючи тестостерон. Лікарі зазвичай призначають препарат проти раку грудей і замісної гормональної терапії. Деякі комбінації антигістамінних і протинабрякових засобів також містять ланцюжки пропіонової кислоти.

Дослідження показують, що пропіонова кислота впливає на кількість придатних для використання ліків, що циркулюють в організмі. Без естерної групи рівень багатьох ліків досягає піку в крові. Через певний час концентрації ліків у крові швидко знижуються, оскільки організм виводить препарат. У поєднанні з кислотою стероїди та інші лікарські засоби залишаються в організмі протягом більш тривалого періоду часу [48].

Отже, розглянемо детальніше біотехнологію отримання такого промислово важливого метаболіту бактерій роду *Propionibacterium* як пропіонова кислота.

Так, метою дослідження [49] була оцінка впливу контролю рН на виробництво біомаси, пропіонової, оцтової та молочної кислот при періодичному культивуванні з підживленням *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* і *Lactobacillus acidophilus*. Штам *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* DSM20270 культивували у середовищі з 25 л м'яса та 350 мл знежиреного молока (містить ~ 23 г лактози). Культивування з підживленням проводили протягом 144 годин при температурі 30 °С, підживлення відбувалось після 36 годин вирощування кожні 8 годин з постійною швидкістю 0,03 л/год. Здійснювали проведення контролю рН додаванням 1 н NaOH, а також досліджували процес без розчину лугу. Кінцева концентрація синтезованих речовин з контролем рН і без нього була наступною (г/л): біомаса 6,22 і 13,76; пропіонова кислота 5,25 і 5,67; оцтова кислота 5,86 і 6,33. Також дослідили синтез ціанкобаламіну – кінцева концентрація вітаміну В₁₂ при контролі рН розчином лугу становила 3,9 мг/л, а за відсутності контролю рН значення кількості вітаміну було 0,05 мг/л. Таким чином, додавання лугу позитивно впливало на підвищення кількості вітаміну, у той час як більші кількості пропіонової, оцтової кислоти та біомаси спостерігали без контролю рН.

У іншій роботі також представлено спосіб одержання пропіонової кислоти у середовищі з лактозою [50]. Середовище для *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232 готували з сухої сироватки, що містить лактозу – >65% (маса/об'єм) і білок – >11% (маса/об'єм). Розчин сироватки для культивування містив 20% лактози. Досліджували традиційне глибинне культивування та процес з іммобілізованими клітинами. Так, при культивуванні з підживленням, температурі 32 °С протягом 250 годин за рН 6,0 і вмісту лактози 200 г/л отримали 125 г/л пропіонової кислоти. А за

аналогічних умов при культивуванні іммобілізованих клітин протягом 220 годин кількість пропіонової кислоти склала 135 г/л.

В роботі 2020 року для синтезу пропіонової кислоти використали гідролізат жому солодкого сорго [51]. *P. freudenreichii* DSM 4902 культивували у середовищі з 10 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л триптиказо-соевого бульйону, 0.25 г/л K_2HPO_4 , 0.05 г/л $MnSO_4$. Гідролізат жому солодкого сорго додавали у кількості 75 та 100%, при цьому синтезувались найвищі кількості пропіонової кислоти – 10,5 і 11,5 г/л. Під час ферментації температуру підтримували на рівні 32 °С, рН підтримували на рівні 6,5 за допомогою 5 М розчину NaOH, а перемішування підтримували на рівні 100 об/хв.

Перспективність використання рослинних відходів для отримання пропіонової кислоти та вітаміну B_{12} описано у статті [52]. *P. freudenreichii* CICC 10019. Гідролізат кукурудзяного стебла стерилізували при 115 °С протягом 20 хв і додавали до середовища для підтримки початкової концентрації 30 г/л. При проведенні підживлення через 258 год було синтезовано 47,6 мг/л вітаміну B_{12} і 91,4 г/л пропіонової кислоти відповідно. Швидкість потоку азоту була встановлена на рівні 0,1 л/хв, щоб гарантувати проходження ферментації в анаеробних умовах. Температура була 30 °С, рН автоматично контролювався на 7,0 шляхом додавання 12% розчину аміаку.

В роботі [53] наведено результати використання штаму *P. freudenreichii* T82 для ефективного біосинтезу пропіонової кислоти та оцтової кислоти в середовищі з екстрактом яблучних вичавок та стічних вод картоплі. Найбільше утворення пропіонової кислоти 14,54 г/л було на середовищі з яблучними вичавками (1 кг/л), дріжджовим екстрактом (20 г/л), пептоном (10 г/л) після 120 годин. Культивування проводили годин при 37°С. Середовище нейтралізували 20% NaOH з інтервалом 24 години. Максимальну кількість оцтової кислоти (5,01 г/л) отримали у середовищі із картопляними стічними водами (4%) після 120 годин.

Штам *P. acidipropionici* АСТ-1 продукував >55 г/л пропіонової кислоти при культивуванні з дробним підживленням при 32°C протягом 230 годин [54]. Ферментацію досліджували протягом в синтетичному середовищі, що містило 10 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л триптикази, 0,25 г/л K_2HPO_4 , 0,05 г/л $MnSO_4$ і 70-80 г/л глюкози; розчин для підживлення містив 500 г/л глюкози. Також додавали 50 г/л $CaCO_3$ для рН 5,0.

Гліцерин та картопляний сік як джерело вуглецю для біосинтезу пропіонової кислоти використали автори статті [55]. При концентраціях гліцерину 85 і 120 г/л було отримано 43,8 і 50,8 г/л пропіонової кислоти відповідно. *P. acidipropionici* DSM 4900 культивували при 200 об/хв і підтримували температуру 32°C протягом 500 годин.

Інші дослідники використали соєву мелясу для синтезу пропіонової кислоти [56]. За наявності меляси (вміст цукрів 54,1 г/л), дріжджового екстракту (10 г/л) та триптикази (5 г/л) кількість цільової кислоти становила 21,9 г/л. Рівень рН контролювали на рівні 6,5 за допомогою карбонату кальцію (50 г/л), підтримували температуру 32°C протягом 4 діб.

Виробництво пропіонової кислоти досліджували шляхом застосування різних систем культивування, таких як періодичне культивування, періодичне культивування з підживленням і безперервна ферментація. Переваги та недоліки кожного методу були вивчені з метою високого виробництва пропіонової кислоти при низьких витратах ресурсів [57].

Ферментації в періодичному режимі є найбільш часто використовуваною системою для виробництва пропіонової кислоти, при цьому процес виробництва займає 2 тижні. Основною перешкодою в процесі періодичної ферментації є повільний ріст бактерій і сильне пригнічення кінцевого продукту. Однак періодичне культивування дозволяє легко контролювати процес.

Періодичне культивування з підживленням з екстрактивними мембранами та без них також використовувалося для підвищення швидкості виробництва та загального виходу пропіонової кислоти. Додавання

цукровмісних речовин та/або інших джерел вуглецю через часті проміжки часу було найбільш поширеною стратегією підживлення. Повідомлено, що таку систему можна використовувати для одночасного виробництва пропіонової кислоти та вітаміну В₁₂.

Покращена продуктивність пропіонової кислоти обумовлює економічність виробництва. Незважаючи на це, проведено мало досліджень щодо виробництва пропіонової кислоти з використанням систем безперервної ферментації. Досліджено безперервне виробництво пропіонової кислоти із сирної сироватки. Повідомили про вихід пропіонової кислоти 51% і 54% (на основі кількості спожитої лактози) у періодичній і безперервній системах відповідно. Вихід пропіонової кислоти в системі безперервної ферментації із збереженням клітин досягнув 70% [57].

Отже, відповідна попередня адаптація мікроорганізмів і застосування метаболічно сконструйованих мутантів може призвести до збільшення виходу біомаси та пропіонової кислоти. Найважливішими факторами, що впливають на виробництво пропіонової кислоти під час глибинного культивування, є температура та рН, які безпосередньо впливають на рівень синтезу цільового продукту.

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ

2.1. Аналіз фармакологічних властивостей дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою

Пропіонова кислота та її солі кальцію, калію та амонію знаходять застосування у фармацевтиці, косметичі та сільському господарстві. Наразі ця органічна кислота переважно виробляється шляхом нафтохімічного синтезу (> 4 105 тонн на рік) через економічні аспекти [4].

Стратегії, що використовуються для боротьби з бактеріями, включають використання біоцидів у формі антисептиків і дезінфікуючих засобів. Дезінфікуючі засоби регулярно використовуються у тваринництві, ветеринарії, харчовій промисловості (включаючи ресторани), медицині та в будинках споживачів і часто містять різноманітні активні інгредієнти в кількох комбінаціях. Використання дезінфікуючих засобів або біоцидів призвело до перехресної резистентності до антимікробних засобів. Зростання множинної стійкості патогенів викликає занепокоєння як у медицині, так і у ветеринарії, і деякі дослідники припускають, що резистентність бактерій до біоцидів зростає.

Базове розуміння сприйнятливості патогенних бактерій до дезінфікуючих засобів є дуже важливим, оскільки дезінфікуючі засоби часто використовуються для контролю бактеріального зараження. У лікарнях, ветеринарних клініках, фермах, молокозаводах, переробних підприємствах, ресторанах і вдома споживачів для боротьби з хвороботворними бактеріями використовується ряд дезінфікуючих засобів, що складаються з різних хлоридів четвертинного амонію. Найвищий рівень резистентності до дезінфікуючих засобів був до четвертинних амінних дезінфікуючих засобів, які використовуються в різних галузях промисловості [58].

					НУХТ БТЕК 02.02.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва субстанції для дезінфікуючого засобу	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Семьонова Г.В.					37	26
Перевір.		Старовойтова С.О.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Однією з можливостей для токсикологічно прийнятних дезінфікуючих активних інгредієнтів є органічні кислоти. Органічні кислоти - це середні або слабкі карбонові кислоти, які мають принаймні одну карбоксильну групу.

На додаток до антимікробного ефекту, іншими можливими застосуваннями органічних кислот є використання як регуляторів рН або добавок у, зокрема, дезінфікуючих композиціях і антисептиків. Застосування знаходить як вільну кислотну форму, так і відповідну сіль, при цьому спеціалісти в даній галузі розуміють, що обидві можуть бути перетворені одна в одну. Індивідуальні органічні кислоти проявляють слабку антимікробну дію у вигляді пригнічення росту специфічних бактерій. Таким чином, мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) 9% оцтової кислоти на *Staphylococcus aureus* становить 72 години експозиції, тому вона використовується як консервант і харчова добавка. Крім того, молочна кислота демонструє при концентрації 0,3% коефіцієнт зниження $> 5 \log$ для *S. aureus* упродовж тривалості реакції 72 години. Однак ці дані не підтверджують ефективність такого засобу щодо бактерій, а лише відображають певні лабораторні результати. Крім того, наведено дію високих концентрацій та/або тривалий час дослідження антимікробної дії, що обумовлює використання органічних кислот як дезінфікуючих активних інгредієнтів економічно і практично не вигідним. Як наслідок, на даний момент на ринку немає продуктів для дезінфекції поверхонь, які базуються виключно на органічних кислотах і зумовлюють ефективне зменшення бактерій, дріжджів та навіть мікобактерій при застосуванні у сучасних виробничих умовах.

Комбінація кількох органічних кислот також являє собою синергетичну композицію завдяки забезпеченню комбінованого механізму дії та проявляє достатній бактерицидний ефект.

Органічні кислоти можуть проявляти протимікробну дію завдяки своїй кислотній функції, а також своїй структурі. Відповідно, жирна кислота з довгим ланцюгом може також мати антимікробний ефект завдяки своїй

гідрофільній і гідрофобній частині молекули як поверхнево-активної речовини, порівняно з поверхнево-активними речовинами, тоді як кислота з коротким ланцюгом може проявляти свою активність, знижуючи рН. Кислотність можна визначити за значенням рКа. рКа (також рKs) відповідає від'ємному декадному логарифму кислотної константи Ks і свідчить про положення рівноваги кислоти, яка реагує з водою. Таким чином, рКа служить мірою сили кислоти з невеликим значенням для сильної кислоти. Так, згідно з винаходом [59] в складі дезінфікуючого засобу і концентрату дезінфікуючого засобу як антимікробний активний інгредієнт (активний компонент) використовували виключно органічні кислоти, що мають значення рКа від 2 до 6, переважно зі значенням рКа від 3 до 5 [59]. Отже, серед властивостей дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою можна виділити наступні:

- 1) відсутність резистентності патогенів до такої речовини;
- 2) токсикологічна прийнятність;
- 3) можливість регуляції рН дезінфікуючого засобу;
- 4) антимікробний ефект [59].

Тому такі властивості пропіонової кислоти обумовлюють її використання у складі дезінфектанту. Дезінфектант будемо виробляти у формі рідкого концентрованого розчину, згідно патенту [59], розфасованого у пластикові флакони по 1 л, пластикові каністри по 5 л.

Основні характеристики дезінфекційного засобу: наявність пропіонової кислоти як активного інгредієнту забезпечує бактерицидну дію; антимікробна активність проти широкого спектру мікроорганізмів досягається за короткий час дії без активних додаткових інгредієнтів; низька токсичність; хороша сумісність з робочими поверхнями (метал, пластик, полімери).

Сфери застосування: очищення та дезінфекція промислового та медичного обладнання, технологічних приміщень, робочих поверхонь на виробництвах харчової та фармацевтичної промисловості.

2.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

Дезінфекційні заходи - невід'ємна складова системи інфекційного контролю. Пошуки нових дезінфікуючих засобів, які мають високу ефективність і низьку токсичність вже дали свої результати, такі засоби є і в Україні. Їх широке застосування виводить заходи із попередження і лікування інфекцій на новий більш надійний, безпечний і ефективний рівень [60].

Найширше застосування знайшли хімічні методи дезінфекції. В їх основу покладено використання різних хімічних речовин, які вбивають мікроорганізми на поверхні та всередині різних об'єктів і предметів навколишнього середовища.

Залежно від основної діючої речовини дезінфікуючі засоби поділяються на декілька основних груп:

- галоїдовмісні, у т. ч. хлоровмісні;
- альдегідовмісні на основі глутарового альдегіду, формальдегіду, альдегіду бурштинової кислоти, гліюксалу;
- окисники (киснево-вмісні, пероксиданти, пероксисполуки); - спиртовмісні; - поверхнево-активні речовини (ПАР), до яких належать препарати на основі четвертинних амонієвих сполук (ЧАС);
- препарати на основі похідних гуанідину; - композиційні препарати на основі різних класів хімічних сполук.

За кількістю використовуваних препаратів на першому місці - хлоровмісні засоби. Вони мають різкий запах, високотоксичні, взаємодіють з оброблюваними поверхнями та матеріалами, викликають корозію металу, нестабільні, у більшості з них відсутній мийний ефект, що додатково змушує використовувати мийні засоби. Також вони являють реальну загрозу для здоров'я персоналу. Звичайно, спектр антимікробної активності хлоровмісних препаратів широкий, але застосування такого токсичного агента, як хлор (не кажучи вже про фенол) важко виправдати універсальністю його дії, тим більше, що багато штамів патогенних

мікроорганізмів давно виробили резистентність до хлоровмісних препаратів [60].

Найактивнішими відносно всіх об'єктів для дезінфекції являються альдегіди. Препарати, що містять глутаровий альдегід (бацилоцид-расант, дескотон, сайдекс, лізоформін-3000) при їх застосуванні потребують дотримання техніки безпеки та застосування засобів індивідуального захисту (гумові рукавички, респіратори та ін.), а також наявність спеціальних приміщень з належною вентиляцією або витяжними системами, так як альдегіди мають різкий запах, токсичні, в деяких випадках можуть взаємодіяти з різними матеріалами.

Ефективність і безпечність - основа вибору засобу для дезінфекції конкретних об'єктів. Дезінфекційні засоби в гігієнічному відношенні повинні [60]:

- мати широкий антимікробний спектр дії;
- володіти низькою токсичністю і алергенністю для людини;
- мати хорошу розчинність у воді або легко утворювати в ній суспензії, емульсії;
- діяти швидко і в малих концентраціях;
- забезпечити незаражувальну дію навіть при наявності органічних речовин, таких, як кров, сеча, мокротиння;
- бути достатньо стійкими при зберіганні;
- не пошкоджувати оброблювані поверхні;
- мати мийні властивості;
- бути дешевими і доступними у виробництві, зручними для транспортування і зберігання;
- бути екологічно безпечними.

Дуже важливо, щоб сучасні дезінфекційні засоби були малотоксичними (належали до 3 або 4 класу токсичних речовин), це надасть змогу зберегти здоров'я персоналу та раціонально використовувати ресурси підприємства [60].

Для зручного використання дезінфікуючих засобів їх виробляють у формі концентрованих розчинів, які слід розвести до необхідної концентрації та використовувати у вигляді робочого розчину. Відповідно виробництво таких засобів передбачає фасування у відповідну тару, що володіє стійкістю до дезінфікуючого засобу та зручністю при транспортуванні.

У даній роботі розглядається використання пропіонової кислоти після культивування *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232 в складі дезінфектанту обробки площі 45000 м² 1 раз на місяць. Розглянемо детальніше які форми випуску дезінфектантів представлені на ринку та з яких матеріалів виготовляють відповідну тару для таких засобів.

2.2.1. Обґрунтування форми випуску дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою

Найчастіше використовуються хімічні дезінфікуючі засоби, які включають широкий спектр продуктів, класифікованих за хімічною природою їхніх активних інгредієнтів. Існує понад 275 різних активних інгредієнтів, які використовуються як основний компонент дезінфікуючого засобу або як частина комбінованого складу (наприклад, продукти, що містять кілька активних інгредієнтів). Продукти можуть продаватися у вигляді серветок, готових до використання, спреїв або рідин, або концентрованих рідин, порошків чи таблеток [61].

Так, на ринку України представлені дезінфікуючі серветки виробників «Еколаб» (Україна) [62], Portwest (Ірландія) [63]. Виробники заявляють, що дані серветки мають широкий спектр антимікробної активності, мають хорошу сумісність з різними матеріалами, характеризуються зручністю та легкістю у використанні. Форма випуску – серветки, просочені дезінфікуючим розчином. Пакування – герметична полімерна ємність з кришкою, що щільно закриває отвір. Однак рекомендована площа обробки поверхні однією серветкою до 1 кв.м. [64], що обмежує використання таких дезінфікуючих засобів на великих площах. Подібні засоби містять до 17% спирту у своєму складі – документально підтверджено недоліки

використання спиртів для обробки поверхонь та обладнання, оскільки спирт пошкоджує цілісність гумових матеріалів. Спирти легкозаймісті, тому їх потрібно зберігати в прохолодному, добре провітрюваному приміщенні. Вони також швидко випаровуються, що ускладнює подовження часу впливу на оброблюваний об'єкт [65].

Іншою формою випуску дезінфектантів є спреї. Так, прикладом даної групи засобів є засіб дезінфекційний «КВІКЦИД» об'ємом 1000 мл [66]. Виробник «Дана Медікал», Україна. Склад засобу: 1-пропанолу – 35%, 2-пропанолу – 35%, алкілдиметилбензиламонію хлорид – 0,15%, необхідні функціональні добавки, вода очищена – до 100%. Форма випуску рідина, форма упаковки спрей. Спрей «КВІКЦИД» підходить для багатьох поверхонь, окрім чутливих до спиртів – фарбовані, лаковані поверхні, виготовлені з акрилового скла, вітрильного каучуку, мореного дуба тощо. Засіб відноситься до 4 класу небезпеки, однак є легкозаймістим. Норма витрати засобу складає 30-50 мл/м³.

Засіб «АКАСПРЕЙ» дез-засіб для поверхонь на основі спирту об'ємом 1000 мл також є спиртовмісним дезінфектантом [67]. Використовується на поверхнях в операційних палатах, виділеннях інтенсивної терапії, стоматологічної хірургії та лабораторії. Склад засобу: 50% етанол, 10% 2-пропанол, 0,05% дидецилдиметиламонію хлорид. Виробник Detro Healthcare Kimya Sanayi A.Ş., Туреччина. Спосіб застосування: розпилити на відстані 30-40 см від дезінфікованої поверхні.

Дезінфекційний засіб Ласепт Рапід представлений у формі спрею 250 мл [68]. Склад засобу: ізопропіловий спирт - 62,0%, глутаровий альдегід - 0,15%, вода очищена - до 100%. Засіб Ласепт Рапід відноситься до 4 класу небезпеки. Норма витрати засобу 30-40 мл/м². Даний засіб є вогненебезпечним, обмежено використання при включених нагрівальних електроприладах, поблизу відкритого вогню або нагрітих вище 35-40°C поверхонь.

Серед твердих форм дезінфектантів представлено порошки та таблетки. Так, поширеним порошковим засобом є «Дезактин» [69]. Склад засобу, мас. %: 1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн (дихлорантин) - 21,0-23,0 (діюча речовина); 5,5-диметилгідантоїн - 12,4-16,4; диспергатор - 9,0-12,0; аніонні поверхнево-активні речовини - 3,2-5,0; інгібітор корозії до 10,0; наповнювач до 100,0. Виробник - ТОВ «Делана» (Україна). Порошок від білого до жовтуватого кольору з помірним запахом хлору. Розчинність у воді становить не менше 20 мг/дм³. Водні розчини «Дезактину» прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору. «Дезактин» належить до помірно небезпечних речовин (3 клас безпеки). Робочі розчини засобу готують у промаркованій тарі з будь-яких матеріалів, за винятком оцинкованого заліза, шляхом розчинення у воді при перемішуванні протягом 1-2 хв.

Засіб «Бланідас 300» масою 1кг має таблетовану форму [70]. Склад: натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти - 80,52%. Виробник «Lysoform», Україна. Згідно з параметрами гострої токсичності, «Бланідас 300» (за умови введення його в шлунок) відноситься до третього класу помірно небезпечних речовин. З 1 банки таблеток отримують 3000 л робочого розчину. Термін зберігання готового робочого розчину засобу «Бланідас 300» 6 днів, але неодмінно в тарі з щільно закритою кришкою, оскільки засіб швидко розкладається, що зумовлює повторне приготування робочого розчину.

Зручною формою дезінфікуючих засобів є рідкі концентрати. На ринку України представлено засоби, що містять у своєму складі різні хімічні активні речовини. «ЛАСЕПТ 344-М» - дезінфікуючий засіб з мийними властивостями виробництва ТОВ «Лабораторія антисептики» (ТУ У 20.2-3827992-001:2012), є прозорою рідиною від безбарвної до жовтого кольору із специфічним запахом [71]. Містить у якості діючих речовин: додецилбіспропілентриамін – 10 %, алкілдиметилбензиламоній хлорид – 13,0 %, дидецилдиметиламонія хлорид – 7,0 %; у якості допоміжних речовин – неіногенні ПАВ, комплексоутворювач, інгібітор корозії та інші функціональні добавки – до 100%. Засіб «ЛАСЕПТ 344-М» застосовується

для мийки, профілактичної дезінфекції та санітарної обробки будь-яких видів устаткування, інвентарю, тари, виготовлених із всіх видів матеріалів, дозволених для використання на підприємствах птахопереробної промисловості, поверхонь виробничих, санітарно-побутових і підсобних приміщень, санітарно-технічного обладнання, прибирального інвентарю, транспорту для перевезення готової продукції, а також для генеральних прибирань тощо. Дезінфікуючий засіб «ЛАСЕПТ 344-М» упакований в оригінальну тару підприємства виробника: у полімерні флакони або пляшки 500 мл, 1000 мл або в поліетиленові каністри 5 л, 10 л. Термін зберігання засобу 3 роки з дня виготовлення.

«БАЦИЛЛОЛ АФ» - дезінфікуючий засіб виробництва компанії BODE Chemie GmbH (Німеччина) [72]. Склад засобу: 1-пропанол – 45,0; 2-пропанол – 25,0; етанол – 4,7; 2-бутанон, вода – до 100,0. Засіб не призначений для дезінфекції поверхонь, покритих розчинними у спиртах лаками, об'єктів, що виготовлені із акрилового скла (плексиглас), нітрильного каучуку та інших матеріалів, чутливих до дії спиртів. Засіб «БАЦИЛЛОЛ АФ» за параметрами гострої токсичності при введенні в шлунок та нанесенні на шкіру належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки згідно вимог ГОСТ 12.1.007). Кількість засобу, що наноситься на поверхню, не повинна перевищувати 50 мл/м² поверхні (в середньому 30-40 мл/м²), яка підлягає обробці. БАЦИЛЛОЛ АФ» випускають у пластикових флаконах по 50 мл, 500 мл, 1 л; у пластикових каністрах по 5 л; у пластикових діжках по 200 л; у пластикових контейнерах по 640 л. Термін придатності засобу – 5 років. Засіб належить до легкозаймистих розчинів. Зберігати в упаковці виробника у приміщеннях, що добре провітрюються, захищених від прямих сонячних променів при температурі не вище +25°C, подалі від джерел вогню та тепла.

Проаналізувавши споживчі властивості кожної форми випуску наявних в Україні дезінфектантів можна підсумувати, що серветки та спреї не є ефективними при обробці великих площ, порошки та таблетки потребують приготування робочого розчину, що ускладнює роботу з такими формами

засобів. Найбільш оптимальним є використання рідких концентрованих засобів на підприємствах фармацевтичної промисловості.

Отже, запропоновано випускати дезінфектант з пропіоновою кислотою *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232 у формі рідкого концентрату концентрації 15%, за якої досягається ефективна дія даного дезінфікуючого засобу, згідно [59].

2.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою

Вибір упаковки (тари, пакувальних матеріалів і закупорювальних засобів) є складним процесом, який залежить від:

- властивостей упакуваної форми;
- стану атмосфери і мікроклімату приміщень;
- захисних властивостей тари або пакувальних матеріалів;
- виробничих факторів;
- термінів зберігання препаратів [73].

Тара з полімерних матеріалів (полістирол блоковий, полістирол ударостійкий, поліпропілен, поліетилен низького тиску та ін.) в останні роки набуває все більшого поширення. Тара, виготовлена з пластмас, має переваги за експлуатаційними властивостями перед тарою, виготовленою з інших матеріалів (скло, папір, картон, метали). До них відносяться: довговічність, стійкість до атмосферного впливу, низька теплопровідність і проникність, хороша герметичність [73].

Нараховують близько 150 видів пластмаси. Для одержання певних властивостей до їхнього складу вводять до 20 різних добавок, більшість із яких токсичні. Типи пластику і коди для них визначені Спілкою пластикової промисловості (SPI). Коди SPI застосовують для позначення типу пакувального матеріалу. Така практика є обов'язковою в багатьох країнах [74].

- 1) Поліетилен терефталат, PET або ПЕТ

Донедавна його вважали одним із найбезпечніших типів пластику. Проте дослідження вчених Європи та США довели, що він шкідливий. Під дією високої температури та сонячного проміння пластик починає випаровуватися. Він розчиняється у продукті, насичуючи його шкідливими речовинами, однією з яких є бісфенол А (ВРА), що виділяється з пластику при багаторазовому використанні або частому митті такої тари. ВРА спричиняє розвиток раку грудей, серцеві захворювання, діабет, захворювання печінки й порушення репродуктивної функції. Цей пластик переробляється; біла ПЕТ-пляшка – лише у Запорізькій області.

2) Поліетилен високої щільності, PEHD (HDPE)

Використовують для виготовлення пляшок та пакетів для молочних продуктів, косметичних засобів (шампуні), одноразового посуду, контейнерів для їжі, іграшок, різних ковпачків та кришок для пляшок і флаконів, міцних господарських сумок, фасувальних пакетів і ящиків. У побуті поширений у вигляді «плівки», що добре розтягується, – пакування палет із напоями, обгортка до побутової техніки, тонка самоклейна харчова плівка. Пакування з такого типу пластику стійке до масел, кислот, лугів та інших агресивних речовин. HDPE-тара має достатньо високий температурний діапазон експлуатації – від -80°C до $+110^{\circ}\text{C}$. HDPE-вироби безпечні для здоров'я людини. Цей пластик переробляється.

3) Полівінілхлорид, PVC або ПВХ

Канцерогени, що містить цей матеріал, можуть проникати в їжу. Це найбільш отруйний та найбільш небезпечний для здоров'я вид пластмас. При спалюванні полівінілхлориду утворюються високотоксичні хлорорганічні сполуки, а після десяти років служби вироби з ПВХ починають самостійно виділяти токсичні сполуки. Цей пластик не переробляється.

4) Поліетилен низької щільності, PELD (LDPE)

З нього виготовляють різні пакувальні матеріали, пакети для супермаркетів, CD- та DVD-диски. До 60-х років повністю замінив целофан. Маркування LDPE можна знайти на великих поліетиленових кульках

(пакетах) тощо. Від поліетилену високого тиску відрізняється тим, що погано розтягується і при натягуванні рветься. Станом на весну 2017 року не приймався пунктами прийому вторсировини. Цей пластик переробляється.

5) Поліпропілен, РР або ПП

З нього виготовляють відра, посуд для гарячих страв, одноразові шприци, мішки для цукру, контейнери для заморожування продуктів, кришки для пляшок, диски, пляшки для кетчупів, ємності для йогуртів, труби, бампери. Цей пластик переробляється [74].

6) Полістирол, PS або ПС

З нього виготовляють одноразовий посуд, контейнери для їжі, ємності для йогуртів, дитячі іграшки, теплоізоляційні плити, декоративну плитку для стелі, пакувальні таці для продуктів у супермаркетах, фасувальні коробки для яєць. Цей пластик переробляється.

7) Інше, або other

В цю групу входять інші види пластмас, найчастіше – багат шарові пакунки або пакунки із суміші кількох видів пластику. Загалом не переробляється [74].

Оскільки цільовий продукт являє собою концентрат дезінфікуючого розчину на основі пропіонової кислоти, первинне пакування має бути представлено щільним матеріалом, який не взаємодітиме з концентратом та характеризуватиметься здатністю до переробки. Таким матеріалом є поліетилен високої щільності (HDPE).

Отже, концентрат дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою будемо випускати у флаконах та каністрах об'ємом 1 л, 5 л та 10 л з поліетилену високої щільності.

Для забезпечення стерильності вмісту необхідно передбачити встановлення механічного дозатора на флакони та каністри. Механічні помпові дозатори забезпечують безкрапельне точне дозування речовин та гігієнічне порціонування. Помповий дозатор дозволяє економно використовувати цільовий продукт. Завдяки можливості встановлення дози

досягається точність дозування необхідної кількості рідини для подальшого її використання [75]. Помпові дозатори, що представлені на закордонному ринку, виготовлені з високоякісного пластику [75-77].

На ринку України представлено пластикові помпові дозатори різних виробників – Fiab (Італія) [78], Хімрезерв (Україна) [79], Ecolab (ЄС) [80].

З метою забезпечення стерильності дезінфектанту помповий насос має містити механізм, що запобігає зворотному всмоктуванню [80]. Таким чином, для збереження стерильності дезінфектанту та зручності використання флакони та каністри оснащують помповими дозаторами з механізмом запобігання зворотного всмоктування.

Пакування є важливим аспектом, оскільки воно забезпечує безпеку та захист товарів, а також впливає на презентацію продукції та ефективність логістичних процесів. Одним з ключових елементів пакування є плівка стрейч, яка є невід'ємною частиною надійного упакування товарів чи продукції. Виробничі підприємства використовують стрейч плівку для забезпечення безпеки під час упаковки готової продукції. Вона допомагає захистити товари від пошкоджень та забруднень під час маніпуляцій на лінії виробництва. Застосування стрейч плівки дозволяє підвищити ефективність роботи, зменшити ризик пошкоджень товарів та забезпечити їх якісне зберігання [81].

Термозбіжна плівка – пакувальний матеріал, що використовується для пакування товарів методом термічної усадки. Під впливом температури плівка скорочується у розмірах, щільно облягає каністру і набуває її форми [82].

Серед різноманітності термозбіжних плівок виділяються два основних типи: полівінілхлоридні (ПВХ) та поліолефінові (ПОФ).

ПВХ плівка виготовляється з полівінілхлориду, який є пластиковим полімером. ПВХ плівка відома своєю міцністю та стійкістю до зовнішніх впливів, таких як волога, хімічні речовини та ультрафіолетове випромінювання. Це робить її чудовим вибором для товарів, які вимагають

довгострокового захисту та збереження свіжості. Вона також має високу прозорість, що дозволяє ясно бачити запакований продукт, що особливо корисно для продажу товарів, які потребують візуального представлення. ПВХ плівка справляється з упаковкою таких предметів як пляшки, коробки, канцелярські товари та багато іншого.

ПВХ плівка має високий ступінь усадки при нагріванні, що дозволяє обернути запакований предмет щільно і без складок. Це забезпечує надійний захист від пилу, бруду та пошкоджень під час транспортування. Однак, слід враховувати, що плівка ПВХ містить хлор, який є шкідливою речовиною при спалюванні. Тому використання ПВХ плівки несе шкоду для екології навколишнього середовища [83].

ПОФ плівка виготовляється з поліолефінових матеріалів. Вона має деякі унікальні характеристики, які роблять її привабливим вибором для певних завдань.

ПОФ плівка більш гнучка та еластична порівняно з ПВХ. Це дозволяє їй охоплювати товари щільніше та легше адаптуватися до різних форм та розмірів. Завдяки своїй гнучкості, ПОФ плівку також легше використовувати та складати, що економить час та спрощує процес упаковки.

ПОФ плівка має нижчу температуру стиснення, що означає, що вона скорочується за більш низької температури порівняно з ПВХ. Це дозволяє використовувати ПОФ плівку для пакування тепло сприйнятливих товарів, які можуть бути пошкоджені за високої температури. Крім того, ПОФ плівка має кращу прозорість після усадки, що створює привабливий зовнішній вигляд упаковки. Вона ідеально підходить для пакування продуктів харчування, оскільки не впливає на їхню якість та безпеку [83].

Термозбіжна плівка ПОФ витримує підвищені механічні і кліматичні навантаження, морозотривка, завдяки багат шаровій структурі зберігає основні споживчі властивості при зменшенні загальної товщини плівки [82]. Отже, плівка ПОФ є екологічно безпечною альтернативою ПВХ.

Таким чином, вторинним пакуванням дезінфектанту з пропіоновою кислотою *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232 є термозбіжна плівка з поліолефінових матеріалів, що характеризується екологічністю використання та збереженню цілісності первинної упаковки.

2.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції

Усі бактерії роду *Propionibacterium* мають здатність до ферментації та є основними джерелами цінних метаболітів, таких як пропіонова кислота, вітамін В₁₂, бактеріюцини і трегалоза.

Пропіоновокислі бактерії роблять важливий внесок у розвиток фармацевтичної галузі. Фармацевтичні компанії зазвичай включають пропіонову кислоту, яка є метаболітом пропіоновокислих бактерій, в рецептуру стероїдних і нестероїдних протизапальних препаратів. Дослідження показують, що пропіонова кислота впливає на кількість придатних для використання ліків, що циркулюють в організмі [84].

Дослідники вважають, що пропіонова кислота може пригнічувати синтез простагландинів. Фармацевтичні компанії зазвичай включають пропіонову кислоту, яка є метаболітом пропіоновокислих бактерій, в рецептуру стероїдних і нестероїдних протизапальних препаратів. Аспірин, ібупрофен та інші безрецептурні та рецептурні протизапальні препарати зазвичай містять пропіонову кислоту як етер. У цій формі сполука приєднується до активних інгредієнтів ліків. Інгалятори з флютиказоном, які використовуються при респіраторних захворюваннях, зазвичай містять пропіонову кислоту. Сполука часто супроводжує стероїдні препарати, включаючи тестостерон. Лікарі зазвичай призначають препарат проти раку грудей і замісної гормональної терапії. Деякі комбінації антигістамінних і протинабрякових засобів також містять ланцюжки пропіонової кислоти [84]. Тому доцільним є дослідження методів одержання пропіонової кислоти.

Отже, для вибору найкращого продуцента пропіонової кислоти було підбрано трьох продуцентів – *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232, *P. acidipropionici* DSM 49 та *P. acidipropionici* АСТ-1 [85-87].

Зокрема, штам *P. acidipropionici* CGMCC 1.2232 є мутантним [85]. Штами *Escherichia coli* DH5 α та *Escherichia coli* JM109 використовували для клонування, підтримки та розмноження плазмід. Штам *E. coli* S17-1 використовували для перенесення плазмідної ДНК шляхом кон'югації з *P. acidipropionici* CGMCC 1.2232.

Для надекспресії гена, що відповідає за синтез цільового метаболіту, повнорозмірний ген з *P. acidipropionici* CGMCC 1.2232 був ампліфікований за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням геномної ДНК як матриці та олігонуклеотидних праймерів.

Продукт ПЛР лігували у вектор pGEM-T Easy для створення плазміди pGEM-otsAEX. Плазмиду pGEM-otsAEX згодом розщеплювали і фрагмент, що містить цільовий ген, вставляли в сайти човникового вектора pBRESP36A, отримуючи плазмиду pBRESP36A-otsA. Одержаний мутантний штам використовували для синтезу пропіонової кислоти [85].

Продуцентів порівнювали за кількістю синтезованого метаболіту, часом вирощування та складом поживного середовища.

Отже, з даних таблиці 2.1 видно, що найменше пропіонової кислоти синтезує штам *P. acidipropionici* АСТ-1 при рості на м'ясі, а найбільше цільової кислоти отримали за вирощування *P. acidipropionici* CGMCC 1.2232 у середовищі із сироваткою, що містить лактозу. *P. acidipropionici* DSM 49 синтезував майже удвічі більше кислоти, ніж штам АСТ-1, але майже утричі менше, ніж штам CGMCC 1.2232 в середовищі з гліцерином. Однак на основі цієї інформації обрати найкращого продуцента не доцільно, слід врахувати вартість кожного поживного середовища для врахування економічної доцільності – див. табл. 2.2.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика штамів пропіоновокислих бактерій для одержання пропіонової кислоти

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Кількість пропіонової кислоти, г/л	Особливості культивування	Література
<i>P. acidipropionici</i> CGMCC 1.2232	Сироватка – 20% лактози (200)	125	Температура 32 °С, рН 6,0, при перемішуванні 150 об/хв Час культивування 250 год	[85]
<i>P. acidipropionici</i> DSM 49	Гліцерин –120, Дріжджовий екстракт – 10, K ₂ HPO ₄ – 2.5, KH ₂ PO ₄ – 1.5 Цистеїн-НСl – 0.25	50,8	Температура 32 °С, час 500 годин, 200 об/хв	[86]
<i>P. acidipropionici</i> ACT-1	Соева меляса (вміст цукрів 54,1 г/л) Дріжджовий екстракт – 10, Триптиказа – 5, K ₂ HPO ₄ – 0.25, MnSO ₄ – 0.05.	21,9	Температура 32 °С, 96 год, рН контролювали на рівні 6,5 за допомогою карбонату кальцію (50 г/л)	[87]

**Вартість поживних середовищ для вирощування продуцентів
пропіонової кислоти**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело* (1,2,3,4,5)
<i>P. acidipropionici</i> CGMCC 1.2232	Лактоза – 200	35	7	1
Вартість 1 л середовища становить – 7 грн.				
<i>P. acidipropionici</i> DSM 49	Гліцерин –120	82	9,84	2
	Дріжджовий екстракт – 10	1100	1,1	3
	K ₂ HPO ₄ – 2.5	123	0,3	4
	KH ₂ PO ₄ – 1.5	31	0,04	5
	Цистеїн-НCl – 0.25	361	0,09	6
Вартість 1 л середовища становить – 11,37 грн				
<i>P. acidipropionici</i> ACT-1	Соева меляса (вміст цукрів 54,1 г/л)	40	2,1	7
	Дріжджовий екстракт – 10	1100	1,1	3
	Триптиказа – 5	23 078,9	115,3	8
	K ₂ HPO ₄ – 0.25	123	0,03	4
	MnSO ₄ – 0.05	43	0,002	9
Вартість 1 л середовища становить – 118,53 грн				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на грудень 2022 р.:

- 1 – <https://megachem.com.ua/ua/laktoza.html>
- 2 – https://novohim.com.ua/ru/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/glicerin/?gclid=Cj0KCQiA45qdBhD-ARIsAOHbVdE-rzLc5oMGx97doDCnOiPQy5uRNPXJfrbN4YnR-uT_4B7HWkK69TMaApyBEALw_wcB
- 3 – <https://prom.ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- 4 – <https://prom.ua/p1514436596-ammonij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?&primelead=Mi4wOA>
- 5 – <https://soda.kiev.ua/ua/p18394377-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
- 6 – <https://soda.kiev.ua/p18862391-tsistein-gidrochlorid.html>
- 7 – <https://soda.kiev.ua/p376299698-patoka-krahmalnaya.html>
- 8 – <https://shop.hlr.ua/triptoza-dlya-mikrobiologii-1-kg-234176.html>

Отже, поживне середовище для культивування першого продуцента *P. acidipropionici* CGMCC 1.2232 має найменшу вартість за рахунок того, що воно складається із сироватки, що містить лактозу. Трохи дорожчим є середовище для вирощування штаму DSM 49. Однак найбільшу ціну має середовище для *P. acidipropionici* АСТ-1 за рахунок наявності в його складі дороговартісного компонента.

На заключній стадії необхідно вирахувати умовну вартість 1 г пропіонової кислоти, синтезованої за 1 год. За даними таблиці 2.3, *P. acidipropionici* DSM 49 синтезує найменше пропіонової кислоти за годину, *P. acidipropionici* АСТ-1 – удвічі більше за попередній штаму, а *P. acidipropionici* CGMCC 1.2232 – у 5 разів вище відповідно. Також умовна вартість пропіонової кислоти, одержаної після культивування штаму *P. acidipropionici* АСТ-1, є найдорожчою, що свідчить про недоцільність використання цього продуцента для одержання цільового продукту. Обираючи між двома іншими біологічними агентами, перевагу слід віддати штаму *P. acidipropionici* CGMCC 1.2232, адже він синтезує найбільше пропіонової кислоти на відносно дешевому середовищі.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г пропіонової кислоти при культивуванні пропіоновокислих бактерій

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Кількість пропіонової кислоти, г/л	Умовна вартість 1 г кислоти, грн	Час культивування, год	Концентрація кислоти, синтезованої за год, г/л
<i>P. acidipropionici</i> CGMCC 1.2232	7	125	0,056	250	0,5
<i>P. acidipropionici</i> DSM 49	11,37	50,8	0,22	500	0,1
<i>P. acidipropionici</i> АСТ-1	118,53	21,9	5,4	96	0,2

Таким чином, найкращим біологічним агентом для синтезу пропіонової кислоти є штам *P. acidipropionici* CGMCC 1.2232, адже він синтезує найбільше цільового продукту на відносно дешевому середовищі, що являє собою сироватку з лактозою.

2.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції

Виробництво фармацевтичних продуктів враховує безліч факторів, що впливають на робочі процеси, їх швидкість та якість. Крім того, необхідність відповідності стандартам GMP вимагає від фармацевтичного підприємства приділяти особливу увагу належному рівню кваліфікації.

Одним із елементів необхідної оптимізації виробничих процесів для українських фармацевтичних підприємств є прибирання та дезінфекція виробничих приміщень [88].

У даному проекті розробляємо технологію унікального дезінфектанту на основі пропіонової кислоти біотехнологічного походження, що має такі переваги – наявність пропіонової кислоти як активного інгредієнту забезпечує бактерицидну дію, антимікробна активність проти широкого спектру мікроорганізмів досягається за короткий час дії без активних додаткових інгредієнтів, низька токсичність, хороша сумісність з робочими поверхнями (метал, пластик, полімери); тому пропонується його використання для очищення та дезінфекція промислового обладнання, технологічних приміщень, робочих поверхонь на фармацевтичному виробництві.

Найближчими аналогами за складом, спектром дії та ефективністю є препарати на основі оцтової кислоти, C₆-C₁₂ жирних кислот та сумішей пропіонової та молочної кислоти [59, 89], що використовуються для очищення промислового або медичного обладнання, але вони мають недоліки – проявляють активність лише проти бактерій, активність щодо

інших мікроорганізмів не спостерігалась [59, 89]. Таких недоліків позбавлений препарат на основі пропіонової кислоти.

АТ «Фармак» з 2010 року є лідером фармацевтичного ринку України та одним із найбільших експортерів лікарських засобів. «Фармак» має два заводи у м. Київ та у м. Шостка Сумської області.

На підприємстві функціонують 25 виробничих дільниць. У «Фармак» створений повний цикл виробництва – від синтезу класичних та біотехнологічних АФІ до виготовлення різноманітних готових лікарських форм. Виробничі потужності, лабораторно-технічний комплекс компанії мають міжнародну сертифікацію та відповідають високим вимогам європейських стандартів GMP [90].

Тому для розрахунку потреби у дезінфікуючому засобі з пропіоновою кислотою обираємо завод компанії «Фармак» у м. Шостка Сумської області.

З огляду на дані реєстру реконструкції комплексу споруд, які перебувають у власності ВАТ "Фармак" у м. Шостка Сумської області, загальна площа комплексу під виробництво активних фармацевтичних інгредієнтів складає 45 000 м² [91].

Згідно інструкції до застосування дезінфікуючих засобів, що представлені на ринку України, норма витрати робочого розчину дезінфікуючого засобу складає 50-150 мл/м² [92]. Приймаємо значення витрати робочого розчину дезінфікуючого засобу 100 мл/м², оскільки на ринку України немає аналогів дезінфікуючих засобів з пропіоновою кислотою у складі. Як було зазначено вище, до дезінфектантів на основі органічних кислот патогенна мікрофлора не резистентна, тому розрахунки будемо проводити без врахування заміни.

Розрахуємо норму витрати засобу на 45 000 м² площі комплексу ПАТ «Фармак»:

$$100 \text{ мл} \times 45\,000 = 4\,500\,000 \text{ мл} = 4\,500 \text{ л}$$

Один раз на місяць здійснюється генеральне прибирання (обробка стін, підлоги, вікон тощо). Отже, річна потреба у дезінфікуючому засобі з пропіоновою кислотою становитиме:

$$4\,500 \text{ л} \times 12 = 54\,000 \text{ л}$$

За інформацією, наведеною у патенті [59], вміст пропіонової кислоти у дезінфікуючому засобі становить 15%, що відповідає 150 г на 1 л засобу.

Тоді частка пропіонової кислоти у 54 000 л дезінфікуючого засобу складає:

$$150 \text{ г} \times 54\,000 \text{ л} = 8\,100\,000 \text{ г} = 8100 \text{ кг}$$

Таким чином, для забезпечення річної потреби у дезінфікуючому засобі для обробки площі 45 000 м² 1 раз на місяць необхідно 8100 кг пропіонової кислоти.

Так, при культивуванні штаму *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232 синтезує 125 г/л пропіонової кислоти. Тоді розрахуємо об'єм культуральної рідини для отримання 8100 кг пропіонової кислоти:

$$\frac{8100}{0,125} = 64\,800 \text{ л}$$

Врахуємо сумарні втрати цільового продукту при виробництві 15 % (5% на етапі десорбції сумішшю 1 М NaOH та етанолу, 5% на етапі адсорбції пропіонової кислоти та 5% на етапі концентрування), тоді необхідний об'єм культуральної рідини буде:

$$V_{\text{кр}} = 64\,800 \text{ л} / (1-0,15) = 64\,799 \text{ л}$$

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 260. Тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{д}}$) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 64\,799 / 260 = 250 \text{ л}$$

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{\text{ц}} = V_{\text{кр}} / ((V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24) = 64\,799 / ((250 \times 256) / 24) = 24 \text{ цикли,}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год,

охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 250 год).

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

$$V_{крц} = K1 \times V_d \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 250 \times 256 / 24 \approx 3000 \text{ л,}$$

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

Геометричний об'єм ферментера для отримання 3000 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{г} = V_{крц} / K_{зап} = 3000 / 0,6 = 5000 \text{ л} = 5 \text{ м}^3,$$

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

Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для біосинтезу у ферментері 5 м³

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 3000$ л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{3000}{1 - 0,1} \approx 3333 \text{ л}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 3333$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\phi.1} = 3333 / 0,6 = 555$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 5000$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{3333}{5000} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

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

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1+X_{\phi}} = \frac{3333}{1+0,1} = 3030 \text{ л}$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 3333 - 3030 = 303 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для інокулятора 500 л

Для одержання 303 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1-E_{\text{ін}}} = \frac{303}{1-0,1} = 336 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 336/0,6 = 560 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 500 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{336}{500} = 0,67$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1+X_{\text{ін}}} = \frac{336}{1+0,1} = 306 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 336 - 306 = 30 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для інокулятора 50 л

Для одержання 30 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{30}{1 - 0,1} = 33,3 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 33,3/0,6 = 55,5 \text{ л}$.
 Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 50 \text{ л}$ та
 уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{33,3}{50} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{33,3}{1 + 0,1} = 30,3 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 33,3 - 30,3 = 3 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для інокулятора 5 л

Для одержання 3 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм4}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{3}{1 - 0,1} = 3,3 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 3,3/0,6 = 5,5 \text{ л}$.
 Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 5 \text{ л}$ та
 уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{3,3}{5} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{3,3}{1 + 0,1} = 3 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 3,3 - 3 = 0,3 \text{ л} = 300 \text{ мл}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для качалочних колб

Для культивування 300 мл інокуляту використовують качалочні колби об'ємом 750 мл, приймаємо коефіцієнт заповнення $K_{зк} = 0,2$. Тоді кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} \times K_{зк}} = \frac{300}{750 \times 0,2} = 2 \text{ колби}$$

Для культивування посівного матеріалу в колбах на качалках слід передбачити наявність 2 качалочних колб.

Згідно розрахунків, отримання інокуляту для біосинтезу пропіонової кислоти у ферментері об'ємом 5 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 будемо здійснювати у чотири стадії.

РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИСТКИ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ПРОПОНОВОЇ КИСЛОТИ

Стадії виділення та очищення пропіонової кислоти мають передбачити отримання цільової кислоти без побічних продуктів біосинтезу. Отже, одержання пропіонової кислоти включає такі етапи: відділення клітинної біомаси, виділення пропіонової кислоти із супернатанту, доочищення елюату пропіонової кислоти, концентрування [93, 94].

Відділення клітинної біомаси

Розділення культуральної рідини на тверду і рідку фази вимагає великих витрат, оскільки пов'язана з переробкою великих об'ємів суспензій. Для інтенсифікації цієї стадії і зниження втрат цільового продукту культуральну рідину перед розділенням фаз, як правило, піддають спеціальній обробці. В результаті змінюється структура осаду, що забезпечує максимальний ступінь переходу продукту в ту фазу, з якої його далі виділяють, а також видалення домішок, які ускладнюють виділення цільового продукту. Залежно від вимог до повноти відділення дисперсної фази і особливостей культуральної рідини для розділення використовують процеси фільтрації, центрифугування, сепарації, рідше флоатації.

Фільтрування. Під фільтруванням розуміють розділення твердої та рідкої фаз під час перепускання суспензії крізь пористу перегородку (фільтр). У виробництвах, де цільовим продуктом є один з метаболітів, розчинений у культуральній рідині, для відокремлення клітин біомаси найчастіше використовують фільтрування. Основна характеристика процесу – швидкість фільтрації (кількість фільтрату, що отримується з одиниці фільтруючої поверхні в одиницю часу) [95].

Осаджування (седиментація) - це процес розшарування дисперсних

					НУХТ БТЕК 02.02.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Семьонова Г.В.			РОЗДІЛ 3. Обґрунтування етапів виділення та очистки субстанції для одержання пропіонової кислоти	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					63	9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

систем під дією сили тяжіння і відділення дисперсної фази у вигляді осаду. Швидкість осаджування біомаси з культуральної рідини незначна і складає близько 10^{-6} - 10^{-7} м/с [96].

Для прискорення процесу осаджування застосовують:

- 1) коагулянти – речовини, що переводять зважувані часточки в агрегатно-нестійкий стан;
- 2) флокулянти – речовини, що сприяють руйнуванню колоїдних структур і утворенню великих пластівців;

В якості коагулянтів застосовують зазвичай желатин, рибний клей, казеїн, як флокулянти – метилцеллюлозу, пектин, альгінат натрію тощо.

Центрифугування – це розподіл неоднорідних систем під впливом поля відцентрових сил. Для центрифугування застосовують центрифуги різних конструкцій. Центрифуги, що мають високий фактор поділу і оснащені тарілчастим барабаном, називають сепараторами. В мікробіологічній промисловості сепаратори є одним з самих розповсюджених типів центрифуг. Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90%.

В останні роки з'явилися спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють вести процес сепарування в автоматизованому режимі, оптимально підбраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин.

Область застосування центрифугування:

1. Виділення біомаси з культуральної рідини (дріжджі, бактерії, гриби).
2. Відділення різних цільових продуктів мікробного синтезу (антибіотики, ферменти, вітаміни тощо).
3. Поділ емульсій, що утворюються при екстракції [96].

У статті [97] описано спосіб відділення клітинної біомаси з культуральної рідини для подальших стадій виділення та очищення пропіонової кислоти. Відділення біомаси проводять центрифугуванням при 12000 об/хв за кімнатної температури (25°C) протягом 10 хв.

Спосіб відділення біомаси для подальших стадій виділення пропіонової кислоти є швидким та ефективним, тому обираємо центрифугування для розділення культуральної рідини.

Виділення пропіонової кислоти із супернатанту

Для виділення продуктів мікробного синтезу з нативного розчину або біомаси в промислових умовах вибір методів обмежений і визначається фізико-хімічними властивостями цих продуктів. Так, для виділення промислово цінних речовин використовують екстрагування, іонообмінну сорбцію, осадження продукту з нативного розчину, сорбцію з нативного розчину макропористими неіоногенними сорбентами і екстракцію з біомаси органічним розчинником [95].

Одне з провідних місць в технології виділення біологічно активних речовин з нативних розчинів займають процеси екстрагування. Розчинник, рН середовища, співвідношення фаз й інші умови підбирають так, щоб концентрувати цільовий продукт не менше ніж у 2-5 рази, а також забезпечити високу вибірковість процесу. Так, якщо продукт, що виділяється, є кислотою, то в кислій водній фазі залишаються практично всі речовини, добре розчинні у воді, органічні основи, а також кислоти, сильніші, ніж екстрагована. Якщо вміст цільового продукту в нативному розчині зазвичай досягає 15...20%, то в екстракті він підвищується до 80...85%, тобто вдається відокремити більше 80% домішок. Однак суттєвим недоліком такого методу є те, що домішки, які перейшли в екстракт, як правило, близькі за хімічною структурою до цільового продукту і їх виділення може бути ускладнене [95].

Метод осадження або кристалізації з нативних розчинів застосовується для виділення речовин, здатних утворювати з деякими реагентами нерозчинні з'єднання або кристалізуватися за певних умов з водного середовища. Основним чинником, що обмежує застосування процесу осадження біологічно активних речовин з нативного розчину, є низька концентрація цих речовин у розчинах (зазвичай не більше 1-2%). При цьому залишкова концентрація цільового продукту в маточному розчині не повинна

перевищувати 0,1-0,2%, інакше помітно зростають втрати продукту [95]. Однак метод осадження знайшов промислове застосування у виробництві ферментів і тетрациклінових антибіотиків, тому для виділення пропіонової кислоти даний спосіб не підходить.

Екстрагування цільового продукту органічним розчинником з біомаси використовують у тих випадках, коли він не розчиняється у водному середовищі і міститься головним чином у твердій фазі. Продукт екстрагують з вологої або висушеної біомаси, підбираючи розчинник, що забезпечує отримання достатньо концентрованого екстракту. Потім розчинник випаровують і виділяють цільовий продукт з екстракту [95]. Оскільки пропіонова кислота є екзометаболітом, тобто виділяється у культуральне середовища, то метод екстрагування з біомаси також не підходить для виділення пропіонової кислоти.

Щодо іонообмінної сорбції, то даний спосіб зазвичай застосовують для виділення продуктів біосинтезу лише за умови чималої обмінної місткості сорбенту за цільовим продуктом (близько 10 мг-екв на 1 г сорбенту). Іонообмінну сорбцію використовують для виділення речовин, що є достатньо сильними електролітами і тих, що дисоціюють у водному середовищі з утворенням багатозарядних іонів. Підбір сорбентів, умов сорбції і елюції забезпечує високу селективність процесу і дозволяє концентрувати цільовий продукт в 10 разів і більше. Іонообмінну сорбцію застосовують також для подальшого очищення біологічно активних речовин, проводячи за допомогою спеціальних сорбентів демінералізацію, нейтралізацію і обезбарвлення розчинів. Переваги методу іонообмінної сорбції – простота апаратурного оформлення і відсутність потреби в органічних розчинниках, недоліки – значна тривалість процесу і необхідність регенерації сорбентів [95]. Зважаючи на зазначені переваги, метод іонообмінної сорбції є доцільним для виділення пропіонової кислоти із супернатанту.

Отже, наступним етапом виділення пропіонової кислоти є пропускання супернатанту через іонообмінні колони для проведення адсорбції

пропіонової кислоти з іонообмінної смоли. Після цього смолу промивають водою, щоб змити побічні речовини.

Адсорбція – це процес поглинання одного або декількох компонентів цільового продукту з газової суміші або розчину твердою речовиною – адсорбентом. Процеси адсорбції, як й інші процеси масопередачі, вибагливі і зазвичай зворотні. Завдяки цьому стає можливим виділення поглинених речовин з адсорбенту, тобто проведення процесу десорбції [98].

Далі здійснюють десорбцію пропіонової кислоти з іонообмінної смоли.

Так, у літературі наведено метод десорбції [93] з використанням розчину 1 М гідроксиду натрію та 70% етанолу, внесених у співвідношенні 40:60 відповідно. При застосуванні даних речовин в якості елюенту етанол можна використовувати повторно, що є суттєвою перевагою проведення такого способу десорбції пропіонової кислоти. Внаслідок цього отримуємо елюат, що містить суміш пропіонової кислоти, 1 М гідроксиду натрію, етилового спирту та води.

Доочищення елюату пропіонової кислоти

Отже, після проведення десорбції пропіонової кислоти у реакторі міститься пропіонова кислота, гідроксид натрію, етиловий спирт та вода.

При десорбції розчином з гідроксидом натрію може утворюватися пропіонат натрію, тому цей метаболіт слід відновити до пропіонової кислоти. Для відновлення пропіонату натрію до пропіонової кислоти та нейтралізації гідроксиду натрію слід внести 1 М розчин хлоридної кислоти [99] у кількості, еквівалентній кількості 1 М гідроксиду натрію, який було використано при десорбції цільового продукту із смоли – 40% [93]. В результаті нейтралізації гідроксиду натрію у суміші залишиться вода, натрію хлорид та власне пропіонова кислота.

Слід також прибрати з отриманої суміші натрію хлорид для подальшого концентрування розчину пропіонової кислоти.

Тому доцільним є використання методу, зазначеного в статті [94], що передбачає пропускання розчину через іонообмінну смолу полі(4-

вінілпіридину), на якій адсорбується пропіонова кислота. Суміш води та етилового спирту змивається та направляється для регенерування етанолу та його повторного використання. Після адсорбування смолу промивають деіонізованою водою та проводять десорбцію ацетоном. На виході одержують елюат, що містить пропіонову кислоту та ацетон.

Концентрування

На наступній стадії потрібно сконцентрувати елюат, для цього можна використовувати такі методи: випарювання, мікрофільтрація, діаліз, електродіаліз, зворотний осмос і ультрафільтрація. Для обрання методу концентрування розглянемо переваги та недоліки існуючих методів.

Випарювання – процес утворення парової фази, який відбувається в усій масі рідини і, головним чином, на межі між паровою бульбашкою і рідиною. Випарювання настає при температурі кипіння, за якої тиск насиченої пари рідини дорівнює зовнішньому тиску. Процес пароутворення до настання моменту кипіння називають випаровуванням. Випарювання є тепловим процесом і його використовують для зневоднення розчинів, суспензій з метою концентрації твердої фази або розчиненої речовини. Процес випарювання проводять у випарних апаратах різної конструкції. *Випарні апарати* класифікують за наступними ознаками [95]:

- періодичність дії;
- тип теплоносія;
- метод обігріву;
- розташування і виду поверхні теплообміну (компонування й конструкція поверхні нагрівання);
- розташування робочого середовища;
- режиму та кратності циркуляції розчину.

Цільові продукти мікробного синтезу в основному термолабільні та деякою мірою можуть інактивуватись при температурах вище 50...80 °С протягом 5...15 хв. Тому процеси випарювання повинні відбуватися за режимів, що забезпечують мінімальні втрати цільових продуктів від

значно швидше, ніж в «традиційних» випарниках, з меншими енерговитратами та більшим коефіцієнтом виходу. Ємності роторно-плівкового випарника виготовляються нержавіючої сталі.

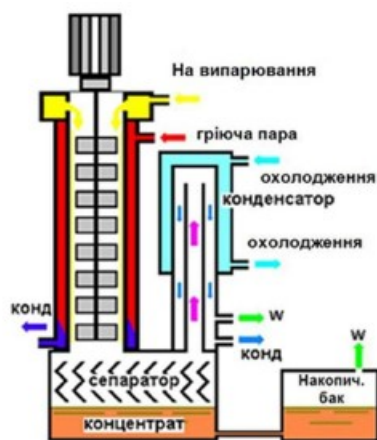


Рис. 3.2. Схема роботи роторно-плівкового випарника [95].

Для відокремлення дрібніших частинок (діаметром 2...5 мкм), а також для розділення розчинів використовують мембранні способи. До них належать *мікрофільтрація, діаліз, електродіаліз, зворотний осмос і ультрафільтрація*. Особливістю всіх цих методів є застосування напівпроникних мембран. Переваги мембранних методів розділення біологічних суспензій і розчинів наступні: відсутність температурних, механічних і хімічних дій на продукт, що переробляється; простота апаратурного оформлення, відсутність рухомих деталей; низька енергоємність процесу; можливість забезпечення герметичності і асептики процесу.

Головним робочим органом ультрафільтраційних установок є мембрани, основні вимоги до яких наступні: висока проникність і селективність; дешевизна; антимікробна і теплова стійкість; відсутність фізичної адсорбції білкових молекул на мембрані; відсутність інактивуєчої дії мембрани на ферментний комплекс; постійність своїх характеристик [95].

Однак такі мембранні способи очищення та концентрування є дорогими, адже потребують залучення значної кількості ресурсів для реалізації процесу.

Найпростішим та оптимальним способом концентрування очищеного супернатанту культуральної рідини для отримання пропіонової кислоти є вакуум-випарювання.

Пропіонова кислота має молекулярну масу 74,08 г / моль і густину 0,992 г/мл. Пропіонова кислота - це слабка кислота, рКа якої дорівнює 4,88. Температура замерзання та кипіння пропіонової кислоти становлять -20,5 °С та +141,1 °С відповідно [100]. Тому пропіонова кислота витримує такий температурний режим випарювання. Оскільки після фільтрування отримуємо очищений розчин пропіонової кислоти, спосіб вакуум-випарювання дозволить швидко видалити зайву вологу, сконцентрувавши продукт до необхідної концентрації без негативного впливу на молекулу пропіонової кислоти.

За температури 80°С у процесі випарювання відбудуться мінімальні втрати цільової органічної кислоти, водночас можна досягти необхідної концентрації вологи за короткий час випарювання.

Концентрування відбувається до кінцевої концентрації вологи 16%.

Отже, виділення пропіонової кислоти передбачатиме проведення таких основних стадій:

- 1) Відділення клітинної біомаси;
- 2) Іонообмінна сорбція;
- 3) Доочищення елюату пропіонової кислоти;
- 4) Концентрування

РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ ОТРИМАННЯ ПРОПІОНОВОЇ КИСЛОТИ

Далі зробимо розрахунок з розподілом втрат по стадіях та підбором необхідного обладнання для виділення та очищення пропіонової кислоти з отриманням концентрату.

Вихідні дані:

- об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 3000$ л;
- концентрація пропіонової кислоти у КР $C_{пк} = 125$ г/л ,
- концентрація біомаси у КР $C_{бм} = 4,1$ г/л – АСБ
- втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 15%:
- початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає $3000 \text{ л} \times 125 \text{ г/л} = 375$ кг. Враховуючи 15% втрат, що виникатимуть на етапах десорбції сумішшю 1 М NaOH та 70% етанолу, адсорбції пропіонової кислоти та концентрування, кінцева кількість цільового продукту, що *отримується з однієї ферментації*, має становити 441,1 кг.

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 4.1.

					НУХТ БТЕК 02.02.16 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях отримання пропіонової кислоти					
Розроб.		Семьонова Г.В.						Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.							72	5
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

Таблиця 4.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 15%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
Відділення клітинної біомаси						
1	Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	3000 л	-	3000 л	Збірник об'ємом 3900 л
		Біомаса	12,3 кг (3×4,1)- АСБ, з урахуванням 90% вологості 123 кг		123 кг	Центрифуга
		Супернатант	2877 л (3000-123)	-	2877 л	- (передається на іонообмінну колонку)
Іонообмінна сорбція						

Продовження табл. 4.1

2	Десорбція сумішшю 1 М NaOH та етанолу	Супернатант	2877 л	-	-	Іонообмінна колонка
		Смола	287,7 л (2877 л/10) 10 - швидкість проходження культуральної рідини крізь смолу, за 2 год	-	-	-
		Елюент	1 726,2 (287,7 л × 3 л × 2 год) швидкість десорбції 3 л елюенту на 1 л смоли за 1 год, час десорбції 2 год	-	-	Збірник 2000 л
		Елюат	2877 л	143,8 л (5%)	2 733,2 л	- (передається одразу на відновлення пропіонату)
Доочищення елюату пропіонової кислоти						

Продовження табл. 4.1

3	Відновлення пропіонату натрію до пропіонової кислоти	Елюат	2 733,2 л	-	-	- (на відновлення)
		1 М розчин хлоридної кислоти	1 093,3 л (2 733,2 × 40/100)	-	-	Збірник 1200 л
		Суміш для адсорбції пропіонової кислоти	-	-	3 826,5 л (2 733,2+1 093,3)	Збірник 4000 л
4	Адсорбція пропіонової кислоти	Суміш для адсорбції пропіонової кислоти	3 826,5 л	-	-	Іонообмінна колонка
		Смола	425,1 л (3 826,5 л/ (3 л × 3 год)) швидкість адсорбції та десорбції 3 л елюенту на 1 л смоли за 1 год, час десорбції 3 год	-	-	-
		Ацетон	1 275,3 л (425,1 × 3)	-	-	Збірник 1400 л
		Елюат	1 093,3 л	54,6 л (5%)	1 038,7 л	Збірник 1200 л

Закінчення табл. 4.1

Отримання порошку пропіонової кислоти

5	Концентрування	Елюат	1 038,7 л	-	-	Вакуум-випарна установка
		Порошок пропіонової кислоти	419,1кг	22 кг (5%)	441,1 кг	Збірник об'ємом 500 л

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

У таблиці 5.1 наведено специфікацію технологічного обладнання, зображеного на апаратурній схемі у графічній частині проекту.

Таблиця 5.1.

Специфікація ділянки виділення та очищення пропіонової кислоти

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
3-1	Збірник 3,9 м ³	1	Реактор Pfaudler-Balfour, модель XL-750 3115. Робочий об'єм 3410 л і загальний об'єм 3900 л. Розміри 1830 мм x 1180 мм. Компанія: «Perry Videx» (США) [101]
Н-2 Н-4 Н-7 Н-9 Н-12 Н-14 Н-16 Н-18 Н-20 Н-26	Насос	10	Багатоступінчатий насос Раско типу FMS із високоякісної сталі. Продуктивність 60 м ³ /год. Компанія: «Dalgakiran» (Україна) [102]
Ц-3	Центрифуга	1	Центрифуга фільтруюча марки 1/2ФГП-401К-04. Продуктивність 300-500 кг/год. Максимальна частота обертання 1600 об/хв. Компанія: «СНПО» (Україна) [103]
Д-5 Д-10 Д-24	Дозатор	3	Ковшовий ваговий дозатор ВД-1. Об'єм бункера 60-240 л. Діапазон дозування 20-2000 г. Компанія: «PackTech» (Україна) [104]
3-6	Збірник 2 м ³	1	Реактор-збірник 2 м ³ . Швидкість перемішування мішалки 15 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь 316. Зовнішній діаметр 1300 мм, загальна висота 3700 мм. Компанія: «Machineryline» (Україна) [105]
ІК-8 ІК-17	Іонообмінна колона	2	Іонообмінна колона зі смолою, продуктивність 500 л/годину. Компанія: «Wenzhou Aowei Machinery Co., Ltd» (Китай) [106]

НУХТ БТЕК 02.02.16 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.	Семьонова Г.В.				
Перевір.	Старовойтова С.О.				
Реценз.					
Н. Контр.					
Затверд.	Стабніков В.П.				
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання			Літ.	Арк.	Аркушів
				77	2
Кафедра БТМ					

Закінчення табл. 5.1

3-11 3-15 3-19 3-23	Збірник 1,2 м ³	3	Реактор об'ємом 1200 л. Матеріал – сталь AISI 316 L; фторопласт (тефлон). Обладнаний якірною мішалкою, швидкість перемішування 25-60 об/хв. Довжина 1650 мм, ширина 1500 мм, висота 2930 мм. Компанія: «Промвіт» (Україна) [107]
3-13	Збірник 4 м ³	1	Реактор об'ємом 4 м ³ . Матеріал – нержавіюча сталь. Обладнаний рамною мішалкою (60 об/хв) та паровою сорочкою. Компанія: «Червоний Жовтень» (Україна) [108]
ВВУ-21	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарна установка. Потужність 116,5 кВт. Продуктивність 60 м ³ /добу. Габарити 13000x5000x16000 мм. Компанія: «PROM-NASOS» (Україна) [109]
3-22	Збірник 500 л	1	Реактор 500 літрів. Основні розміри 1060x1679 мм. Матеріал нержавіюча харчова сталь AISI 304. Швидкість перемішування 24 об/хв. Компанія: «Wise Master/Energy Saving Solutions» (Україна) [110]
3-25	Збірник 3,2 м ³	1	Реактор з нержавіючої сталі 316 об'ємом 3200 літрів. Зовнішній діаметр 1390 мм, висота 1760 мм. Обладнаний перемішувачем. Компанія: «COMQUIMA EUROPE» (Іспанія) [111]
АД-27	Автоматичний дозатор	1	Автоматичний дозатор-укупорщик рідин Scaldopack Smartfiller. Продуктивність наповнення та укупорки 10 одиниць тари/хв, діапазон дозування 25-6000 мл. Об'єм накопичувального бункера 50 л. Компанія: «КОЗАК+» (Україна) [112]

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виділення та очищення пропіонової кислоти після культивування *Propionibacterium acidipropionici* CGMCC 1.2232 передбачає підготовку культуральної рідини та стадії виділення і очищення цільового продукту.

ДР 1. Приготування допоміжних розчинів

ДР 1.1. Приготування розчину 1 М NaOH та етанолу

У збірник 3-6 за допомогою дозатора Д-5 подають 28,8 кг кристалічного гідроксиду натрію зі складу. Подають 720 л води питної. Для повного розчинення гідроксиду натрію вмикають перемішувач при швидкості обертів 50 об/хв. За допомогою об'ємно-вагового дозатора подають 1080 л 70% етанолу зі складу, вмикають перемішувач. Отриманий розчин подають до ТП 4.1.

ДР 1.2. Приготування 1 М HCl

У збірник 3-11 за допомогою дозатора Д-10 подають 40,15 кг HCl зі складу. Подають 1100 л води питної. Для повного розчинення вмикають перемішувач при швидкості обертів 50 об/хв. Отриманий розчин подають до ТП 5.1.

ТП 2. Підготовка культуральної рідини

ТП 2.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину зберігають у збірнику 3-1 при кімнатній температурі $25 \pm 1^\circ\text{C}$, періодично вмикають перемішувач при швидкості обертів 50 об/хв. Культуральну рідину багатоступінчастим насосом Н-2 продуктивністю $60 \text{ м}^3/\text{год}$ подають до центрифуги Ц-3.

ТП 3. Відділення біомаси

ТП 3.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральну рідину (від ТП 2.1) за допомогою насоса Н-2 подають до

					НУХТ БТЕК 02.02.16 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Семьонова Г.В.			РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми		
Перевір.		Старовойтова С.О.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Аркушів
						79	3
					Кафедра БТМ		

центрифуги Ц-3. Центрифугування проводять при 12000 об/хв за кімнатної температури (25 °С) протягом 10 хв. Супернатант направляють до стадії *ТП 4.1*.

ТП 4. Іонообмінна сорбція

ТП 4.1. Десорбція сумішшю 1 М NaOH та етанолу

В іонообмінну колону ІК-8 вносять 287,7 л лужної смоли ZGA330 [93]. 2877 л супернатанту від центрифуги Ц-3 за допомогою багатоступінчатого насоса Н-4 (від *ТП 3.1*) подають на іонообмінну колону ІК-8 зі швидкістю 10 л розчину на 1 літр смоли, тривалість процесу 2 години. 1 726,2 л елюенту (розчин 1 М гідроксиду натрію та 70% етанолу у співвідношенні 40:60) подається багатоступінчатим насосом Н-7 зі збірника З-6 від *ДР 1.1*.

Пропущений крізь смолу розчин від колонки ІК-8 подається насосом Н-9 у збірник З-13 об'ємом 4 м³ до стадії відновлення пропіонату натрію до пропіонової кислоти. 70% етанол надходить на регенерування до збірника З-23 для повторного його використання.

ТП 5. Доочищення елюату пропіонової кислоти

ТП 5.1. Відновлення пропіонату натрію до пропіонової кислоти

До збірника З-13 з елюатом від *ТП 4.1* за допомогою багатоступінчатого насоса Н-12 подають 1 093,3 л 1 М розчину хлоридної кислоти зі збірника З-11 від *ДР 2.1*. Вмикають перемішуючий пристрій та перемішують протягом 10 хв при швидкості обертів 60 об/хв.

Отримана суміш зі збірника З-13 багатоступінчатим насосом Н-14 подається на стадію адсорбції пропіонової кислоти до *ТП 5.2*.

ТП 5.2. Адсорбція пропіонової кислоти

В іонообмінну колону ІК-17 вносять 425,1 л смоли полі(4-вінілпіридину) DOWEX G-26 [94]. Суміш для адсорбції пропіонової кислоти зі збірника З-13 багатоступінчатим насосом Н-14 надходить від *ТП 5.1* на іонообмінну колону ІК-17. Після адсорбування проводять десорбцію ацетоном. Ацетон для десорбції пропіонової кислоти подають на колону ІК-17 від збірника З-15 насосом Н-16.

Процес адсорбції та десорбції проходить зі швидкістю 3 л розчину на 1 л смоли за 1 год, тривалість процесу становить 3 години.

Отриманий на виході елюат, що складається з ацетону та пропіонової кислоти, багатоступінчатим насосом Н-18 надходить до збірника З-19, де зберігається до стадії концентрування.

ТП 6. Отримання порошку пропіонової кислоти

ТП 6.1. Концентрування

Елюат від ТП 4.2 за допомогою багатоступінчатого насоса Н-20 поступає на вакуум-випарну установку ВВУ-21. Випарювання відбувається протягом 1 год за температури 80 °С до концентрації вологи 16 % від початкового об'єму. Порошок пропіонової кислоти вручну вивантажується у підкатну ємність та вручну переноситься до збірника З-22 об'ємом 500 л.

ТП 7. Отримання дезінфікуючого засобу

ТП 7.1. Приготування дезінфікуючого розчину

До збірника З-25 подають 700 л води очищеної. Потім за допомогою вагового дозатора Д-24 зважують та подають 382,2 кг натрію бензоату, 352,8 кг пропіленгліколю, 441,1 кг пропіонової кислоти зі збірника З-22 (від ТП 6.1) та 44,1 кг ароматизатора. Всі компоненти подають дозовано при перемішуванні в режимі 50-100 об/хв. Для покращення розчинення пропіленгліколю до сорочки реактора подають пару, температура розчину складає 30-35°С. Орієнтовно через 1 годину після досягнення повної розчинності всіх компонентів дезінфікуючий розчин за допомогою насосу Н-26 подають на наступний етап фасування ТП 7.2.

ТП 7.2. Фасування дезінфікуючого засобу

Зі складу отримують флакони та помпові дозатори. Від ТП 7.1. одержують приготований дезінфікуючий розчин. Наповнення флаконів здійснюють на автоматичному дозаторі АФ-27 з продуктивністю 10 флаконів/хв. Після цього вручну здійснюють маркування продукції, пакування у вторинну упаковку та групову тару. Готова продукція поступає на склад.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ

1) **Опис.** Білий кристалічний або гранульований порошок з різко відчутним специфічним запахом, добре розчинний у воді [113].

2) **Ідентифікація.** Пробопідготовка: 15 г досліджуваної субстанції розводять у 100 мл води очищеної, перемішують до повного розчинення.

Пробу 10 мл фільтрують та проводять ідентифікацію методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). У визначенні використовують регульований ультрафіолетовий (TUV) детектор. Для приготування стандартного розчину ретельно відміряють 10,07 мкл стандартного матеріалу пропіонової кислоти (щільність 0,993 г/мл при 25 °С; чистота 99,5%), розчиняють в 1 мл води для приготування 10 мг/мл основного розчину. Шість робочих стандартних розчинів готують серійним розведенням із вихідного розчину з кінцевими концентраціями 10 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1000 мкг/мл та 2000 мкг/мл. Аналіз проводять на Waters Acquity Ultra Performance LC, оснащеного диспетчером бінарних розчинників і TUV детектором (Waters, Milford, MA, USA). Стаціонарною фазою виступає колонка Acquity UPLC BEH C18 (тверда фаза для визначення пропіонової кислоти – високоміцний силікагель запатентованого складу), 1,7 мкм, 2,1 мм × 50 мм (Waters). Рухома фаза для визначення пропіонової кислоти являє собою суміш 15 мМ водного фосфатного буфера рН 2,1 і ацетонітрилу. Елюювання проводять ацетонітрилом (5%) протягом 5 хвилин. Швидкість потоку становить 0,2 мл/хв, об'єм інжекції та довжина хвилі детектування – 2 мкл та 210 нм відповідно, температура колонки – 40 ± 5 °С [114].

3) **рН (ДФУ 2.2.3).** рН досліджуваного зразка визначають потенціометрично за температури 20-25 °С. Значення рН має становити не більше 3,9 [115].

					НУХТ БТЕК 02.02.16 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва субстанції для ЛЗ		
Розроб.		Семьонова Г.В.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.				82	5
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

4) Концентрація пропіонової кислоти. Концентрацію пропіонової кислоти визначають методом ВЕРХ (JASCO, Токіо, Японія) на хроматографі, оснащеним детектором RI (ERC, Кавагучі, Японія) та інтелектуальним автосамплером JASCO [55].

Детектор показника заломлення (RI), який також називають диференціальним рефрактометром, вимірює показник заломлення, коли світло проходить через комірку, що містить аналіт, у порівнянні з еталонною коміркою, яка містить лише розчинник [116].

Детектор показника заломлення RI містить оптичну систему, встановлену в корпусі з точним регулюванням температури, щоб усунути вплив змін температури навколишнього середовища [55].

Розділення сполук проводять на хроматографічній колонці Aminex HPLX-87H, з'єднаній із захисною колонкою (Biorad, Річмонд, Каліфорнія, США).

Рухома фаза – 5 мМ H_2SO_4 . Нерухома фаза – полістиролдивінілбензолна смола.

Температуру колонки підтримують на рівні $55^{\circ}C$ за допомогою хроматографічної печі (Shimadzu, Токіо, Японія). Зразки з біореактора розбавляли водою високоочищеною і підкислювали сірчаною кислотою 20% (20 мкл/мл зразка), потім фільтрують через поліпропіленовий фільтр 0,45 мкм. 50 мкл зразка вводять в рухому фазу 5 мМ H_2SO_4 зі швидкістю 0,6 мл/хв. Час утримання для пропіонової кислоти становить 17,3 [55].

5) Антимікробні властивості

Чутливість мікроорганізмів визначають методом серійних розведень у рідкому живильному середовищі. Чутливість культур до водних розчинів визначають візуально через 16-18 годин. Бактеріостатичну концентрацію встановлюють за схемою: концентрацію дезінфектантів в пробірці з відсутністю росту додають до кількості дезінфектантів в 1 мл середовища подальшої пробірки, де відмічають ріст культури і виводять середнє

арифметичне число, яке показує мінімальну концентрацію дезінфектантів затримуючу ріст культур [117].

Як тест-об'єкти використовують плитку, метал, пластик, цеглу і дерево розміром 10×10 см. Перед нанесенням тест-культур поверхні дезінфікують шляхом кип'ятіння 5 хв. Після підсихання, тест-об'єкт кладуть горизонтально і піпеткою наносять 2-х мільярдну суміш культур, що вивчаються, із розрахунку 0,5 см³ на 100 см².

Культури рівномірно розташовують по поверхні скляним шпателем, підсушують при кімнатній температурі (18-20°C) і відносній вологості повітря 50-60 %. Потім тест-об'єкти розкладають горизонтально і вертикально, піпеткою наносять водні розчини дезінфектанту у кількості 200 см³ /м². Досліджують 0,5-1,0 мг/дм³ розчини препарату. Після зрошення, поверхню залишають до повного висихання.

Контрольні тест-об'єкти зрошують стерилізованою водопровідною водою в тій же кількості. Контроль ефективності дезінфекції проводять за допомогою стерильного вологого тампона. Змиви з контрольних пластинок перед посівом розводять в 100 разів з метою рівномірного розподілення мікроорганізмів у агарі, проводять змішування поживного середовища. Висіви витримують в термостаті при 37 °С, а потім підраховують кількість колоній, які вирости на чашках Петрі. Потім визначають щільність контамінації на 100 см² і відсоток знезараження.

Результати розраховують за формулою:

$$X = a \times 100 / v,$$

де: а – кількість мікробних клітин з досліджуваних пластинок; в – кількість мікробних клітин з контрольних пластинок.

Отримані дані обробляють статистично за допомогою методу Фішера-Стьюдента з урахуванням середньоарифметичних величин і їх статистичних помилок, а також визначенням вірогідної різниці показників, які порівнюються. Для кожного досліджуваного показника визначають середнє

арифметичне (M) і похибку середнього арифметичного (m). Вірогідними вважають відмінності з рівнем значимості більше ніж 95 % ($p < 0,05$) [117].

Має бути відсутній ріст колоній на чашках Петрі.

Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.1 Приготування розчину 1 М NaOH та етанолу	Швидкість перемішування	Термометр, тахометр	Протягом усього часу перемішування	$w=50$ об/хв $C=1$ М
Кт 1.2 Приготування 1 М HCl	Швидкість перемішування	Термометр, тахометр	Протягом усього часу перемішування	$w=50$ об/хв $C=1$ М
Кт 2.1 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина, температура, швидкість перемішування	Термометр, тахометр	Під час зберігання КР	$t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ $w=50$ об/хв
Кт 3.1 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина, швидкість перемішування, температура, час	Тахометр, термометр, таймер	Протягом усього часу центрифугування	$w= 12000$ об/хв $t = 25^\circ\text{C}$ $T=10$ хв
Кт 4.1 Десорбція сумішшю 1 М NaOH та етанолу	Супернатант, елюент, швидкість та тривалість десорбції	Таймер	Встановлюють на початку процесу	$v= 10$ л розчину на 1 літр смоли $T=2$ год
Кт 5.1 Відновлення пропіонату натрію до пропіонової кислоти	Елюат, тривалість перемішування, швидкість обертів	Таймер, тахометр	Протягом усього часу перемішування	$T=10$ хв $w= 60$ об/хв
Кт 5.2 Адсорбція пропіонової кислоти	Суміш для адсорбції, елюент, швидкість та тривалість десорбції	Таймер	Встановлюють на початку процесу	$v= 3$ л розчину на 1 л смоли за 1 год $T=3$ год
Кт 6.1 Концентрування	Елюат, час, температура, вологість	Таймер, термометр	Протягом усього часу роботи	$T= 1$ год $t = 80^\circ\text{C}$ $w= 16\%$

Закінчення табл. 7.1

<p>Кт 7.1 Приготування дезінфікуючого розчину</p>	<p>Дезінфікуючий розчин, тривалість перемішування, швидкість обертів</p>	<p>Таймер, тахометр</p>	<p>Протягом усього часу перемішування</p>	<p>T=1 год w= 50-100 об/хв</p>
<p>Кт 7.2 Фасування дезінфікуючого засобу</p>	<p>Дезінфікуючий розчин, флакони, помпові дозатори</p>	<p>Автоматич- ний дозатор</p>	<p>Протягом усього часу фасування</p>	<p>N=10 флаконів/хв</p>

РОЗДІЛ 8. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ

8.1. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік

Кількість цільового продукту, що отримується з однієї ферментації, становить 441,1 кг.

Для розрахунків беремо об'єм дозування дезінфікуючого засобу 1 л. Згідно специфікації на автоматичний дозатор-укупорщик рідин Scaldorack Smartfiller [112], продуктивність наповнення та укупорки складає 10 одиниць тари/хв.

Якщо в 1 флаконі дезінфікуючого розчину обсягом 1 л міститься 15%, тобто 150 г = 0,15 кг пропіонової кислоти, то 441,1 кг кислоти міститься у:

$$0,15 \text{ кг} - 1 \text{ шт.}$$

$$441,1 \text{ кг} - X \text{ шт.}$$

$$X = 2940 \text{ шт.}$$

При продуктивності наповнювальної машини 10 одиниць тари/хв та врахуванні 8-годинного робочого дня (що дорівнює 480 хв), за 1 цикл відбувається наповнення: $N_{\text{цк}} = 10 \cdot 480 = 4800$ флаконів з дезінфікуючим засобом.

Кількість виробничих циклів на рік складає 24, тоді кількість виготовлених флаконів з пропіоновою кислотою за рік складає:

$$N_{\text{флак}} = 2940 \cdot 24 = 70\,560 \text{ шт.}$$

Тоді кількість серій на рік:

$$N_{\text{сер}} = N_{\text{флак}} / N_{\text{цк}} = 70\,560 / 4800 = 14 \text{ серій.}$$

8.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

Підготовка приміщень

Генеральне прибирання проводять перед початком виробничого

					НУХТ БТЕК 02.02.16 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання дезінфікуючого засобу	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Семьонова Г.В.					87	13
Перевір.		Старовойтова С.О.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

процесу, а щоденне – перед кожною робочою зміною (1...3 рази на добу). Після обрахування кількості необхідних прибирань розраховують приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 2,5 м. Підлогу необхідно мити та дезінфікувати кожного дня, стіни, двері та вікна не рідше одного разу на місяць. Для знезараження повітря виробничих приміщень від мікроорганізмів використовують різні бактерицидні лампи – джерела ультрафіолетового випромінювання. Кількість і потужність бактерицидних ламп необхідно підбирати із розрахунку не менше $2 \pm 0,5$ Вт потужності випромінювача на 1 м^3 об'єму приміщення при прямому опромінюванні та не менше 1 Вт/м^3 – для екранованих бактерицидних ламп. Бактерицидні випромінювачі вмикають на 1...2 год до початку роботи, коли у приміщенні немає людей. Оскільки ультрафіолетові випромінювачі утворюють у повітрі токсичні продукти (озон, окиси азоту), під час їх роботи необхідно вмикати вентиляцію. Періодичність включення стельових бактерицидних ламп – 1 год після кожного генерального прибирання [95].

Вибір дезінфікуючих засобів

На біотехнологічних виробництвах у процесі масової обробки значних об'ємів обладнання та поверхонь, при обробленні приміщень віддають перевагу дешевим і достатньо ефективним дезінфікуючим засобам. Основна мета цього процесу – зменшення кількості сторонньої мікрофлори на поверхнях приміщень, обладнання. Дезінфекція приводить, як правило, до зниження рівня мікробної контамінації на 40...60% від початкового вмісту. При виборі дезінфікуючої речовини необхідно враховувати не тільки її біоцидні властивості і спектр дії, а й можливу токсичність для організму людини.

Сучасні вимоги до дезінфікуючих засобів включають:

- широкий спектр антимікробної дії;
- бактерицидний ефект;

- розчинність у воді;
- відсутність пошкоджуючої дії на оброблені поверхні;
- низька токсичність та алергенність.

При виборі мийного та дезінфікуючого засобу, необхідно враховувати вартість засобу та витрати на одиницю оброблювання площі виробничого приміщення, поверхні обладнання. Приблизно на 1 м² поверхні витрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікуючого засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 № 502).

Для порівняння ефективності різних дезінфікуючих препаратів найширше використовується метод фенольного коефіцієнта. Метод заснований на порівнянні пригнічувальної дії фенолу і конкретного засобу на ріст визначених мікроорганізмів в чітко контрольованих умовах. Для фенолу ефективність приймається за 1, а ефективність використаного засобу характеризується фенольним коефіцієнтом. Так перекис водню має фенольний коефіцієнт 0,01; хлорамін – 130 [95].

Підготовка повітря

Повітря, що подається в чисті приміщення, мусить бути стерильним, тому першочергового значення набуває його очищення і стерилізація [117].

Для розрахунку і вибору устаткування приймаються такі вихідні дані:

- атмосферне повітря представляє собою полідисперсний аерозоль з середнім вмістом контамінуючих речовин $5 \div 100$ мг/м³ ($10^6 \div 10^8$ часток/м³).

Для технологічних розрахунків приймають початкову концентрацію забруднень на рівні 2000 часток/м³ з мінімальним розміром 0,3 мкм.

Полідисперсність повітряного аерозолю обумовлює використання багатоступеневих систем очистки.

Розмір часток 0,3 мкм є найбільш складним для затримки, тому він визнаний розрахунковим.

Всі відомі способи стерилізації повітря умовно поділяються на дві групи – видалення або знищення контамінантів.

Для стерилізації повітря, що подається в чисті приміщення, використовують методи фільтрування, і обладнання повинно задовольняти ряду принципів:

- забезпечення необхідного рівня асептики;
- економічність;
- адекватність контролю;
- технологічність обладнання;
- можливість стерилізації обладнання і комунікацій.

Належна виробнича практика орієнтована на застосування спеціальних систем очистки (стерилізації), повітря і які використовують принцип вискоелективної фільтрації, повітря що подається в приміщення за допомогою HEPA фільтрів (High Efficiency Particulate Air/Particle Absorption).

Способи стерилізації повітряних аерозолів – принцип затримання частинок в HEPA фільтрах заснований не на обмеженні здатності частинок проникати в проміжки між волокнами (коли розміри отворів фільтру менше розмірів фільтрованих частинок - “ефект сита”, а в зміні ліній повітряного потоку, коли ефекти інерції, зчеплення і дифузії є основними з точки зору затримки контамінантів.

У відповідності з європейськими стандартами EN 779, EN 1822 та ДСТУ EN 1822-1-2001 фільтрувальні елементи класифікуються на групи і класи залежно від якості фільтрування (ефективності або проникності).

Згідно з стандартом фільтрувальні елементи підрозділяються на такі групи:

Група G - фільтри грубого очищення – фільтри попередньої очистки(course dust filters);

Група F - фільтри тонкої очистки (fine dust filters);

Група H - фільтри (High Efficiency Particular Airfilters) HEPA;

Група U - фільтри (Ultra Low Penetration Air) ULPA.

Фільтрувальний елемент повинен бути вироблений з відповідних матеріалів, здатних витримати звичайне користування та вплив температури,

вологості і корозії, які імовірно трапляються. Конструкція фільтрів повинна витримувати механічні навантаження, які можуть впливати на фільтр в процесі його експлуатації [118].

Фільтрувальний матеріал не повинен під час проходження через нього потоку повітря виділяти пил або волокна, які шкідливо впливають на людину (або механізми).

На основі скловолокнистих фільтруючих матеріалів виготовляють високоефективні фільтри різних конструкцій: сепараторні з нитяними сепараторами; безсепараторні; одержувані по Molding – і GFS-технології та іш.

З точки зору конструкції фільтри представляють прямокутний корпус з деревинно-шаруватих матеріалів, фанери, чи металу, у якому герметично установлюється фільтропакет. В окремих випадках функції корпуса виконують зміцнені стінки фільтропакету.

Використання фільтрів з фільтруючими матеріалами на основі ультра – і мікротонкого скловолокна. Використання у фільтруючому матеріалі скляних волокон діаметром 0,25 – 1,0 мкм дозволяє, варіюючи співвідношення вмісту волокон різної товщини, одержувати матеріали необхідної (до 99,999995 %) ефективності, з оптимальним опором потоку повітря і що мають високі експлуатаційні характеристики, такі як: негорючість, термостійкість, високорозвинена (від 1 до 50 м²/г) поверхня волокон і, як наслідок, висока пиломісткість.

Прикладом волокнистого фільтрувального матеріалу є ФСВУ що застосовується у фільтрах різних конструкцій є шаром хаотично розташованих скляних волокон і має високу пористість, забезпечуючи тим самим високу пило місткість.

Використання в якості добавок різних специфічних матеріалів і дозволяє надати фільтруючому матеріалу спеціальні властивості:

- гідрофобність;
- бактерицидність;

- стійкість до стерилізації;
- адсорбційні властивості [118].

В фільтрах сепараторної конструкції фільтруючий матеріал покладений складками, і між сусідніми шарами вкладені гофровані сепаратори з полімерної плівки, паперу або алюмінієвої фольги, що утворюють канали для повітря. Звичайно такі фільтри мають глибину 150 мм, але для чистих приміщень із турбулентним потоком застосовують фільтри глибиною 300 мм, що мають подвоєну продуктивність.

Перевагами таких фільтрів є: висока жорсткість одержуваного фільтропакету, що дозволяє йому витримувати 10-кратні перевантаження, і якісна рівномірність укладання фільтруючого матеріалу. До недоліків можна віднести велику поверхню контуру герметизації і порівняно велику масу.

В фільтрах з нитяним сепаратором нитки, наклеєні на фільтрувальну полотнину, після складання фільтропакета, утворюють необхідний зазор між складками фільтруючого матеріалу. Така конструкція забезпечує велику щільність укладання фільтруючого матеріалу, що дозволяє знизити глибину фільтра.

При зменшенні глибини фільтра і виключенні сепараторів маса фільтра знижується на 30...35 % у порівнянні із сепараторною конструкцією з однаковими значеннями ефективності фільтрації й опору потоку повітря.

До недоліків таких фільтрів варто віднести знижену механічну міцність фільтропакета, що вимагає установки підтримуючої сітки для фільтрів, що працюють при швидкості потоку вище 0,45 м/с і гіршу, у порівнянні із сепараторними рівномірність укладання фільтруючого матеріалу. Це досягається зміною співвідношення вмісту у фільтруючому матеріалі волокон різних діаметрів, причому в багат шарових фільтруючих матеріалах величина опору повітря, що досягається, на 20...30 % нижче, ніж в одношарових за рахунок зменшення числа дефектів [118].

8.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Вибір упаковки (тари, пакувальних матеріалів і закупорювальних засобів) є складним процесом, який залежить від:

- властивостей упаковуваної форми;
- стану атмосфери і мікроклімату приміщень;
- захисних властивостей тари або пакувальних матеріалів;
- виробничих факторів;
- термінів зберігання препаратів [73].

Тара з полімерних матеріалів (полістирол блоковий, полістирол ударостійкий, поліпропілен, поліетилен низького тиску та ін.) в останні роки набуває все більшого поширення. Тара, виготовлена з пластмас, має переваги за експлуатаційними властивостями перед тарою, виготовленою з інших матеріалів (скло, папір, картон, метали). До них відносяться: довговічність, стійкість до атмосферного впливу, низька теплопровідність і проникність, хороша герметичність [73].

Нараховують близько 150 видів пластмаси. Для одержання певних властивостей до їхнього складу вводять до 20 різних добавок, більшість із яких токсичні. Типи пластику і коди для них визначені Спілкою пластикової промисловості (SPI). Коди SPI застосовують для позначення типу пакувального матеріалу. Така практика є обов'язковою в багатьох країнах [74].

1) Поліетилен терефталат, PET або ПЕТ

Донедавна його вважали одним із найбезпечніших типів пластику. Проте дослідження вчених Європи та США довели, що він шкідливий. Під дією високої температури та сонячного проміння пластик починає випаровуватися. Він розчиняється у продукті, насичуючи його шкідливими речовинами, однією з яких є бісфенол А (BPA), що виділяється з пластику при багаторазовому використанні або частому митті такої тари. BPA спричиняє розвиток раку грудей, серцеві захворювання, діабет, захворювання

печінки й порушення репродуктивної функції. Цей пластик переробляється; біла ПЕТ-пляшка – лише у Запорізькій області.

2) Поліетилен високої щільності, PEHD (HDPE)

Використовують для виготовлення пляшок та пакетів для молочних продуктів, косметичних засобів (шампуні), одноразового посуду, контейнерів для їжі, іграшок, різних ковпачків та кришок для пляшок і флаконів, міцних господарських сумок, фасувальних пакетів і ящиків. У побуті поширений у вигляді «плівки», що добре розтягується, – пакування палет із напоями, обгортка до побутової техніки, тонка самоклейна харчова плівка. Пакування з такого типу пластику стійке до масел, кислот, лугів та інших агресивних речовин. HDPE-тара має достатньо високий температурний діапазон експлуатації – від -80°C до $+110^{\circ}\text{C}$. HDPE-вироби безпечні для здоров'я людини. Цей пластик переробляється.

3) Полівінілхлорид, PVC або ПВХ

Канцерогени, що містить цей матеріал, можуть проникати в їжу. Це найбільш отруйний та найбільш небезпечний для здоров'я вид пластмас. При спалюванні полівінілхлориду утворюються високотоксичні хлорорганічні сполуки, а після десяти років служби вироби з ПВХ починають самостійно виділяти токсичні сполуки. Цей пластик не переробляється.

4) Поліетилен низької щільності, PELD (LDPE)

З нього виготовляють різні пакувальні матеріали, пакети для супермаркетів, CD- та DVD-диски. До 60-х років повністю замінив целофан. Маркування LDPE можна знайти на великих поліетиленових кульках (пакетах) тощо. Від поліетилену високого тиску відрізняється тим, що погано розтягується і при натягуванні рветься. Станом на весну 2017 року не приймався пунктами прийому вторсировини. Цей пластик переробляється.

5) Поліпропілен, PP або ПП

З нього виготовляють відра, посуд для гарячих страв, одноразові шприци, мішки для цукру, контейнери для заморожування продуктів, кришки

для пляшок, диски, пляшки для кетчупів, ємності для йогуртів, труби, бампери. Цей пластик переробляється.

б) Полістирол, PS або ПС

З нього виготовляють одноразовий посуд, контейнери для їжі, ємності для йогуртів, дитячі іграшки, теплоізоляційні плити, декоративну плитку для стелі, пакувальні таці для продуктів у супермаркетах, фасувальні коробки для яєць. Цей пластик переробляється.

7) Інше, або other

В цю групу входять інші види пластмас, найчастіше – багат шарові пакунки або пакунки із суміші кількох видів пластику. Загалом не переробляється [74].

Оскільки цільовий продукт являє собою концентрат дезінфікуючого розчину на основі пропіонової кислоти, первинне пакування має бути представлено щільним матеріалом, який не контактуватиме з концентратом та характеризуватиметься здатністю до переробки. Таким матеріалом є поліетилен високої щільності (HDPE).

Отже, концентрат дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою будемо випускати у флаконах та каністрах об'ємом 1 л, 5 л та 10 л з поліетилену високої щільності.

Для забезпечення стерильності вмісту необхідно передбачити встановлення механічного дозатора на флакони та каністри. Механічні помпові дозатори забезпечують безкрапельне точне дозування речовин та гігієнічне порціонування. Помповий дозатор дозволяє економно використовувати цільовий продукт. Завдяки можливості встановлення дози досягається точність дозування необхідної кількості рідини для подальшого її використання [75]. Помпові дозатори, що представлені на закордонному ринку, виготовлені з високоякісного пластику [75-77].

На ринку України представлено пластикові помпові дозатори різних виробників – Fiab (Італія) [78], Хімрезерв (Україна) [79], Ecolab (ЄС) [80].

З метою забезпечення стерильності дезінфектанту помповий насос має містити механізм, що запобігає зворотному всмоктуванню[80]. Таким чином, для збереження стерильності дезінфектанту та зручності використання флакони та каністри оснащують помповими дозаторами з механізмом запобігання зворотного всмоктування.

8.4. Обґрунтування вибору підготовки води

В залежності від характеру конкретного виробництва (форми готової продукції) на фармацевтичному підприємстві можуть використовуватися різні типи води [118]:

- вода питна;
- вода знесолена (демінералізована);
- вода очищена (Aqua purificata) (дистильована);
- вода високоочищена;
- вода для ін'єкцій (Aqua pro injectionibus) (апирогенна).

Якість кожного типу води регламентується відповідною нормативною документацією. Достеменною відповідь стосовно показників якості та вибору технології представлена в ДФУ Додаток 1. Монографії:

«Вода високоочищена» с. 306,

«Вода для ін'єкцій» с. 307,

«Вода очищена» с. 308. [118].

Оскільки цільовий продукт являє собою дезінфікуючий розчин, для його приготування слід підготувати воду очищену, оскільки препарат застосовується для обробки та миття поверхонь. Тому вода як розчинник цільової субстанції не має бути високоочищеною.

Для вибору обладнання та установок для підготовки води фармакопейної якості потрібен вибір способу очистки. Сучасна практика виробництва орієнтована на застосування двох основних способів водопідготовки у відповідності з якими воду очищену отримують методом дистиляції або мембранного розділення демінералізованої води в дистиляційних апаратах різних конструкцій або в баромембранних апаратах.

Вода очищена – це вода для приготування лікарських засобів, крім тих, які мають бути стерильними й апірогенними, якщо немає інших зазначень і дозволів компетентного уповноваженого органу».

Воду очищену одержують із води питної дистиляцією, іонним обміном або будь-яким іншим підходящим способом [118].

Під час виробництва і подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів. Для простежування несприятливих тенденцій установлюють підхожу попереджувальну межу і підхожу межу, що вимагає вживання заходів. У нормальних умовах підхожою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 100 життєздатних аеробних мікроорганізмів (2.6.12) в 1 мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації, використовуючи густе поживне середовище 5. Інкубацію проводять при температурі від 30 °С до 35 °С протягом 5 діб. Кількість зразка для випробування відбирають залежно від передбачуваного результату [118].

Відомі схеми очищення води, містять різний набір елементів (стадій та операцій) під узагальнену схему очистки. Умовно технологічну схему очистки можна розділити на 2 блоки:

- підготовка води до отримання готового продукту (механічна очистка, видалення органіки та хлору, часткова деіонізація – пом'якшення);
- стадії отримання готового продукту та зберігання води очищеної "in bulk" [118].

В промисловості використовують три типові рішення формування технологічних схем отримання води очищеної. Наступна схема є найбільш оптимальною:

- груба фільтрація;
- пом'якшення води;
- фільтрація через вугільний фільтр;
- фільтрація через фільтр з діаметром отворів 3 мкм;

- зворотний осмос

При цьому не потрібно великі капітальні витрати. Устаткування не вимагає частоті регенерації. Експлуатаційні витрати невисокі.

Воду очищену зберігають в закритих місткостях, виготовлених з матеріалів, що забезпечують збереження властивостей води в межах вимог чинних нормативних документів і що захищають її від контамінації. Матеріалами місткості для зберігання води очищеної можуть бути поліпропілен тефлон, нержавіюча сталь AISI 316 або інші інертні матеріали [118].

Таким чином, для приготування дезінфікуючого розчину з пропіоновою кислотою будемо проводити підготовку та зберігання води очищеної згідно вищенаведеної схеми.

8.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Як вже було згадано, з однієї ферментації отримується 441,1 кг пропіонової кислоти. Якщо в 1 л дезінфікуючого розчину міститься 15% цієї кислоти, тоді 441,1 кг кислоти міститься в такому обсязі дезрозчину:

$$\begin{aligned} 0,15 \text{ кг} & - 1 \text{ л} \\ 441,1 \text{ кг} & - X \text{ л} \\ X & = 2940 \text{ л.} \end{aligned}$$

Таку кількість дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою можна приготувати в реакторі на 3,2 м³.

Спираючись на дані, подані в патенті [59], який було взято за основу виконання даної кваліфікаційної роботи, до складу деззасобу пропонується вводити такі допоміжні речовини як натрію бензоат та пропіленгліколь у кількості 13% та 12% відповідно. Також для усунення неприємного запаху пропіонової кислоти слід до складу ввести ароматизатор.

Застосовувані коригенти запаху (КЗ) прийнято класифікувати в таким чином [118]:

1. Природні КЗ, отримані шляхом фізичних перетворень сировини рослинного й тваринного походження (ефірні масла, концентрати фруктових соків).

2. КЗ, ідентичні природним, виділені з рослинної або тваринної сировини хімічним шляхом або синтезовані, але повністю відповідають речовинам, що присутні у природних продуктах (цитраль, синтетичний ментол, ванілін).

3. Синтетичні КЗ, не ідентичні природним (етилванілін). Синтетичні КЗ, що зазвичай імітують природні запахи, у більшості випадків – це комплекси з 50 – 60 сполук.

Багато сполук у чистому вигляді мають запах, що різко відрізняється від того, котрий виходить при підмішуванні до них інших ароматичних речовин. Сумарний запах ліків може бути обумовлений синергізмом або антагонізмом між запахами всіх інгредієнтів, що входять до його складу. КЗ із квітковим, пряним запахом можуть бути використані для препаратів зовнішнього застосування. Рідкі лікарські форми часто містять значну кількість КЗ, які вводяться з метою сполучити відтінки запаху або внести відтінок свіжості.

В останні роки в ряді закордонних країн пропонуються до випробування нові коригенти запаху, переважно синтетичні, які через свою дешевизну поступово витісняють натуральні [118].

Так, у складі дезінфікуючого засобу для рук Стерилліум міститься ароматизатор «Оран РН 799867» [119], який сприяє покращенню споживчих властивостей цього засобу. Тому для вдосконалення складу нашого дезінфектанту оберемо саме даний ароматизатор, який нівелюватиме неприємний запах активної речовини - пропіонової кислоти. Ароматизатор будемо вводити у кількості 1,5%.

Після змішування всіх компонентів (вода очищена, пропіонова кислота, натрію бензоат, пропіленгліколь, ароматизатор) отриманий дезінфікуючий

розчин насосом буде подаватись до машини фасування, яка здійснюватиме розлив дезінфектанту по флаконах та каністрах.

Для цього підійде автоматичний дозатор-укупорщик рідин Scaldorack Smartfiller [112], продуктивність наповнення та укупорки складає 10 одиниць тари/хв, діапазон дозування 25-6000 мл. Об'єм накопичувального бункера становить 50 л.

Після стадій фасування продукт передають на маркування та пакування.

РОЗДІЛ 9. ОПИС ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ З ПРОПОНОВОЮ КИСЛОТОЮ ЗГІДНО АНД

ФОРМА ВИПУСКУ: рідкий концентрат у флаконах та каністрах об'ємом 1 л, 5 л, 10 л з помповим дозатором.

ОПИС: прозорий безбарвний розчин без видимих механічних часток з характерним різким запахом.

СКЛАД:

- діюча речовина: пропіонова кислота – 15%,
- допоміжні речовини: натрію бензоат, пропіленгліколь, вода очищена.

Дезінфікуючі концентрати згідно [114] можуть містити допоміжні солюбілізатори та/або регулятори рН та/або поверхнево-активні речовини. Відповідними солюбілізаторами є моно-н-гексилловий ефір діетиленгліколю (гексилкарбітол) та/або 1,2-пропандіол (пропіленгліколь), а також метилкарбітол, бутилкарбіт, моноетиленгліколь.

Гексилкарбітол або пропіленгліколь переважно використовують при слабкокислому рН у водних дезінфікуючих засобах за наявності бензоату натрію. За використання пропіленгліколя в якості солюбілізатора співвідношення бензоату натрію до пропіленгліколю становить 1:1,5 [114].

Також для усунення неприємного запаху дезінфектанту до складу вводять ароматизатори, що покращують процес його використання.

СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ: для дезінфекції та одночасного миття технологічного обладнання на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної, харчової та харчопереробної промисловості.

СПОСІБ ЗАСТОСУВАННЯ: Дезінфекцію проводять методом зрошення або методом протирання поверхонь серветкою, що насичена

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.02.16 КР ПЗ			
Розроб.		Семьонова Г.В.			РОЗДІЛ 9. Опис дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою згідно АНД	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					100	9
Реценз.						Кафедра БТМ ¹		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

достатньою кількістю засобу, поверхні виробів медичного призначення, медичного інвентарю, приміщень, предметів обладнання та устаткування зрошують засобом або протирають серветкою змоченою засобом. При обробці одночасно великих площ поверхонь у приміщенні, для оптимального успіху дезінфекції, після зрошення допускається наступне протирання чистою серветкою.

Для рівномірного розпилення засобу придатні насадка для розпилення до флаконів, механічний розпилювач. Кількість засобу, що наноситься на поверхню, не повинна перевищувати 100 мл/м².

Робочі розчини дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою готують перед використанням в спеціально виділеному посуді шляхом розведення водопровідною водою з використанням засобів індивідуального захисту. При цьому необхідно користуватись розрахунками, які наведені в таблиці 9.1.

Таблиця 9.1

Приготування робочих розчинів дезінфікуючого засобу з пропіоновою кислотою

Кількість інгредієнтів, необхідна для приготування			
1 л робочого розчину		10 л робочого розчину	
об'єм засобу, мл	об'єм води, мл	об'єм засобу, мл	об'єм води, мл
2,5	997,5	25,0	9 975,0
3,0	997,0	30,0	9 970,0
4,0	996,0	40,0	9 960,0

Робочі розчини зберігають 15 діб з моменту приготування за умови зберігання у закритих ємностях при кімнатній температурі.

ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ

Не переливати дезінфікуючий розчин для обробки рук із одного флакона в інший, оскільки це може стати причиною забруднення засобу. У випадку, коли переливанню запобігти неможливо, процедуру слід проводити з дотриманням стерильності. При випадковому проливанні засіб необхідно негайно зібрати та розвести великою кількістю води, провітрити приміщення.

Користуватися електричними приладами тільки після повного висихання засобу.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Можливі алергічні реакції, прояви подразнення шкіри при підвищеній чутливості до компонентів засобу. При випадковому потраплянні засобу в очі можливе подразнення слизової оболонки очей, потерпілому необхідно промити очі проточною водою протягом кількох хвилин та обов'язково звернутися до лікаря.

УМОВИ ТА ТЕРМІН ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати при температурі не вище 25 °С у щільно закритій упаковці. Зберігати у недоступному для дітей місці. Термін придатності – 3 роки.

Специфікація на дезінфікуючий засіб з пропіоновою кислотою

Таблиця 9.2

№	Назва показника	Допустимі межі	Метод контролю
1.	Опис	Прозорий безбарвний розчин без видимих механічних часток характерним різким запахом	Візуальний, за п. 1
2.	Густина	Від 0,90 до 1,10 г/мл	Ареометричний, ДФУ, 2.2.5, метод 2, за п.2, метод 1 Об'ємно-гравіметричний, за п.2, метод 2
3.	pH	Від 2,5 до 4,5	Потенціометричний, ДФУ 2.2.3, за п. 3
4.	Ідентифікація	Час утримання піку на хроматограмі випробуваного розчину має співпадати з часом утримання піку на хроматограмі еталонного розчину	ВЕРХ, ДФУ 2.2.29, за п. 4

5.	Концентрація пропіонової кислоти	Не менше 150 мг/1 мл	ВЕРХ, ДФУ 2.2.29, за п. 5
6.	Антимікробні властивості	Має бути відсутній ріст колоній на чашках Петрі	За п. 6
7.	Об'єм вмісту одиниці фасування	Не менше 1 л, 5 л, 10 л	Об'ємний, за п. 7, метод 1 Ваговий, за п. 7, метод 2
8.	Пакування, маркування	Флакони або каністри мають бути без зовнішніх дефектів, щільно закриті, з етикетками у відповідності із графічним макетом	Візуальний, за п. 8
9.	Зберігання	Зберігати при температурі не вище 25 °С у щільно закритій упаковці	-
10.	Термін придатності	Термін придатності 3 роки	-

Методи контролю

1. Опис

Прозорий безбарвний розчин без видимих механічних часток характерним різким запахом.

2. Густина

Визначення густини препарату (ρ_{20}) проводять при температурі $20 \pm 2^\circ\text{C}$ одним з наведених нижче методів.

Метод 1. За допомогою ареометру згідно з ДФУ, 2.2.5, метод 2.

Випробовувану рідину поміщають у циліндр і при температурі рідини 20°C обережно опускають в неї чистий сухий ареометр, на шкалі якого передбачена очікувана величина густини. Ареометр не випускають з рук, доки не стане очевидним, що він плаває; при цьому необхідно стежити, щоб ареометр не торкався стінок і дна циліндра. Відлік проводять через 3-4 хв

після занурення за поділкою на шкалі ареометра, відповідною нижньому меніску рідини (при відліку око має бути на рівні меніска).

Примітки.

1. Визначення густини сильнолетких речовин ареометром не допускається.

2. У випадку визначення густини темнозбарвлених рідин відлік проводять за верхнім меніском.

Метод 2. Зважують з точністю до другої десяткової поділки мірну колбу місткістю 50 або 100 мл, наповнюють препаратом до позначки та знову зважують. Густину препарату ρ_{20} , г/мл, визначають за формулою:

$$\rho_{20} = \frac{(m_1 - m_0)}{V},$$

m_0 - маса пустої колби, в грамах;

m_1 - маса колби з препаратом, в грамах;

V - номінальний об'єм мірної колби, мл.

Значення густини має становити від 0,90 до 1,10 г/мл.

3. рН

рН розчину вимірюють потенціометрично за ДФУ 2.2.3 при кімнатній температурі 20-25°C згідно з інструкцією до приладу.

Значення рН має становити від 2,5 до 4,5 [115].

4. Ідентифікація

Пробу 10 мл фільтрують через шприцевий фільтр з розміром пор 0,22 мкм для усунення можливих механічних часток та проводять ідентифікацію методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). У визначенні використовували регульований ультрафіолетовий (TUV) детектор [114].

Ультрафіолетовий детектор TUV — це регульований ультрафіолетовий/видимий (УФ/видимий) детектор із подвійною довжиною хвилі, який забезпечує оптимальну лінійність, роздільну здатність і чутливість для розділення UPLC®/УФ. Він має запатентовану технологію світловодної проточної кювети, низький рівень шуму (6 мкА) і підтримку

швидкості передачі даних до 80 Гц. TUV-детектор можна підключати безпосередньо до мас-спектрометрів [120].

Для приготування стандартного розчину ретельно відміряли 10,07 мкл стандартного матеріалу пропіонової кислоти (щільність 0,993 г/мл при 25 °С; чистота 99,5%), розчиняли в 1 мл води високоочищеної для приготування 10 мг/мл основного розчину. Шість робочих стандартних розчинів готували серійним розведенням із вихідного розчину з кінцевими концентраціями 10 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1000 мкг/мл та 2000 мкг/мл. Аналіз проводили на Waters Acquity Ultra Performance LC, оснащеного диспетчером бінарних розчинників і TUV детектором (Waters, Milford, MA, USA). Стаціонарною фазою виступає колонка Acquity UPLC BEH C18 (тверда фаза для визначення пропіонової кислоти– високоміцний силікагель запатентованого складу), 1,7 мкм, 2,1 мм × 50 мм (Waters). Рухома фаза для визначення пропіонової кислоти являє собою суміш 15 мМ водного фосфатного буфера рН 2,1 і ацетонітрилу. Елюювання проводили ацетонітрилом (5%) протягом 5 хвилин. Швидкість потоку становить 0,2 мл/хв, об'єм інжекції та довжина хвилі детектування – 2 мкл та 210 нм відповідно, температура колонки – 40 ± 5 °С [114].

Час утримання піку на хроматограмі випробуваного розчину має співпадати з часом утримання піку на хроматограмі еталонного розчину.

5. Концентрація пропіонової кислоти

Концентрацію пропіонової кислоти визначали методом ВЕРХ (JASCO, Токіо, Японія) на хроматографі, оснащеним детектором RI (ERC, Кавагучі, Японія) та інтелектуальним автосамплером JASCO [55].

Детектор показника заломлення (RI), який також називають диференціальним рефрактометром, вимірює показник заломлення, коли світло проходить через комірку, що містить аналіт, у порівнянні з еталонною коміркою, яка містить лише розчинник [116].

Детектор показника заломлення RI містить оптичну систему, встановлену в корпусі з точним регулюванням температури, щоб усунути вплив змін температури навколишнього середовища [55].

Розділення сполук проводили на хроматографічній колонці Aminex HPLX-87H, з'єднаній із захисною колонкою (Biorad, Річмонд, Каліфорнія, США).

Рухома фаза – 5 мМ H_2SO_4 . Нерухома фаза – полістиролдивінілбензолна смола.

Температуру колонки підтримували на рівні $55^{\circ}C$ за допомогою хроматографічної печі (Shimadzu, Токіо, Японія). Зразки з біореактора розбавляли водою високоочищеною і підкислювали сірчаною кислотою 20% (20 мкл/мл зразка), потім фільтрували через поліпропіленовий фільтр 0,45 мкм. 50 мкл зразка вводили в рухому фазу 5 мМ H_2SO_4 зі швидкістю 0,6 мл/хв. Час утримання для пропіонової кислоти становив 17,3.

Концентрація пропіонової кислоти має становити не менше 150 мг/л, що відповідає вмісту пропіонової кислоти 15% у дезінфікуючому засобі [59].

6. Антимікробні властивості

Чутливість мікроорганізмів до дезінфектанту визначають методом серійних розведень у рідкому живильному середовищі. Чутливість культур до водних розчинів визначають візуально через 16-18 годин. Бактеріостатичну концентрацію встановлюють за схемою: концентрацію дезінфектантів в пробірці з відсутністю росту додають до кількості дезінфектантів в 1 мл середовища подальшої пробірки, де відмічають ріст культури і виводять середнє арифметичне число, яке показує мінімальну концентрацію дезінфектантів затримуючу ріст культур [117].

Як тест-об'єкти використовують плитку, метал, пластик, цеглу і дерево розміром 10×10 см. Перед нанесенням тест-культур поверхні дезінфікують шляхом кип'ятіння 5 хв. Після підсихання, тест-об'єкт кладуть горизонтально

і піпеткою наносять 2-х мільярдну суміш культур, що вивчаються, із розрахунку $0,5 \text{ см}^3$ на 100 см^2 .

Культури рівномірно розташовують по поверхні скляним шпателем, підсушують при кімнатній температурі ($18-20^\circ\text{C}$) і відносній вологості повітря 50-60 %. Потім тест-об'єкти розкладають горизонтально і вертикально, піпеткою наносять водні розчини дезінфектанту у кількості $200 \text{ см}^3 / \text{м}^2$. Досліджують $0,5-1,0 \text{ мг/дм}^3$ розчини препарату. Після зрошення, поверхню залишають до повного висихання.

Контрольні тест-об'єкти зрошують стерилізованою водопровідною водою в тій же кількості. Контроль ефективності дезінфекції проводять за допомогою стерильного вологого тампона. Змиви з контрольних пластинок перед посівом розводять в 100 разів з метою рівномірного розподілення мікроорганізмів у агарі, проводять змішування поживного середовища. Висіви витримують в термостаті при 37°C , а потім підраховують кількість колоній, які вирости на чашках Петрі. Потім визначають щільність контамінації на 100 см^2 і відсоток знезараження.

Результати розраховують за формулою:

$$X = a \times 100 / v,$$

де: а – кількість мікробних клітин з досліджуваних пластинок; в – кількість мікробних клітин з контрольних пластинок.

Отримані дані обробляють статистично за допомогою методу Фішера-Стьюдента з урахуванням середньоарифметичних величин і їх статистичних помилок, а також визначенням вірогідної різниці показників, які порівнюються. Для кожного досліджуваного показника визначають середнє арифметичне (M) і похибку середнього арифметичного (m). Вірогідними вважають відмінності з рівнем значимості більше ніж 95 % ($p < 0,05$) [117].

Має бути відсутній ріст колоній на чашках Петрі.

7. Об'єм вмісту одиниці фасування

Метод 1 [121].

Метод застосовують для об'єму фасування 100 мл; 500 мл та 1 л.

Вміст однієї одиниці фасування при температурі $20 \pm 2^\circ\text{C}$ виливають у мірний циліндр достатньої місткості, але не більше ніж 2,5 номінального об'єму одиниці фасування, та фіксують об'єм препарату у циліндрі.

Метод 2 [121].

Зважують одиницю фасування (разом з етикеткою і кришкою) на вагах, найбільша межа зважування яких не перевищує масу одиниці фасування більше ніж у 10 разів. Виливають засіб у будь-який підходящий контейнер та зважують пусту одиницю фасування (разом з етикеткою і кришкою).

Розраховують об'єм фасування у літрах за формулою:

$$V = \frac{(m_1 - m_2)}{\rho_{20}}$$

m_1 – маса повної одиниці фасування, у кг;

m_2 – маса пустої одиниці фасування, у кг;

ρ_{20} – густина засобу, кг/л (дорівнює густині засобу у г/мл) при 20°C .

Об'єм вмісту одиниці фасування має бути не менше 1 л, 5 л, 10 л.

8. Пакування, маркування

Визначення зовнішнього вигляду пакування проводять візуально. Правильність закупорювання перевіряють прокручуванням ковпачка із середнім зусиллям.

Флакони або каністри мають бути без зовнішніх дефектів, щільно закриті, з етикетками у відповідності із графічним макетом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Piwowarek Kamil, Lipińska Edyta, Hać-Szymańczuk Elżbieta, Kieliszek Marek, Ścibisz Iwona. *Propionibacterium* spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017. doi:10.1007/s00253-017-8616-7.
2. Belgrano Fabricio dos Santos; Verçoza Brunno Renato Farias; Rodrigues Juliany Cola Fernandes; Hatti-Kaul Rajni; Pereira Jr Nei. EPS production by *Propionibacterium freudenreichii* facilitates its immobilization for propionic acid production. *Journal of Applied Microbiology*. 2018. doi:10.1111/jam.13895.
3. Campaniello Daniela; Bevilacqua Antonio; Sinigaglia Milena; Altieri Clelia. Screening of *Propionibacterium* spp. for potential probiotic properties. *Anaerobe*. 2015, 34: 169–173. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.06.003.
4. de Assis D. A., Machado C., Matte C., Ayub M. A. Z. High Cell Density Culture of Dairy *Propionibacterium* sp. and *Acidipropionibacterium* sp.: A Review for Food Industry Applications. *Food and bioprocess technology*. 2022, 15(4): 734–749. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02748-2>.
5. Ranaei V, Pilevar Z, Khaneghah AM, Hosseini H. Propionic Acid: Method of Production, Current State and Perspectives. *Food Technol Biotechnol*. 2020;58(2):115-127. doi:10.17113/ftb.58.02.20.6356.
6. Folliero, V., Ricciardi, M., Dell'Annunziata, F., Pironti, C., Galdiero, M., Franci, G., Motta, O., & Proto, A. (2022). Deployment of a Novel Organic Acid Compound Disinfectant against Common Foodborne Pathogens. *Toxics*, 10(12), 768. <https://doi.org/10.3390/toxics10120768>.
7. Онищенко В.О. Засіб кислотний для миття та дезинфекції доїльних апаратів методом безрозбірної циркуляційної мийки / В.О. Онищенко, Д.О. Стороженко, Н.Б. Сененко, Н.В. Бунякіна // Вчені записки Таврійського національного університету імені В.І.Вернадського. Серія: Технічні науки. – 2018. – Т. 29 (68), №1, ч.2. – С. 170-175.
8. Bai, Y., Ding, X., Zhao, Q., Sun, H., Li, T., Li, Z., Wang, H., Zhang, L., Zhang, C., & Xu, S. (2022). Development of an organic acid compound

disinfectant to control food-borne pathogens and its application in chicken slaughterhouses. *Poultry science*, 101(6), 101842. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101842>.

9. Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Kieliszek, M., & Ścibisz, I. (2018). Propionibacterium spp.-source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(2), 515–538. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8616-7>.

10. Campaniello, D., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Altieri, C. (2015). Screening of Propionibacterium spp. for potential probiotic properties. *Anaerobe*, 34, 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.06.003>.

11. M01A E Похідні пропіонової кислоти [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/atc/m01ae/>.

12. Kotvitska A. A., Kostiuk V. H. (2016). Маркетингові дослідження фармацевтичного ринку нестероїдних протизапальних лікарських засобів. *Фармацевтичний часопис*, (2), 48–53. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2016.2.6651>.

13. Диметилпропіонова Кислота, 2,2-Біс (Гідроксиметил) Пропіонова Кислота CAS 4767-03-7 [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://ua.fengchengroup.net/chemicals/featured-chemicals/dimethylpropionic-acid-2-2-bis.html> .

14. Propionic Acid Indiamart [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dir.indiamart.com/impcat/propionic-acid.html?biz=10>.

15. Ranaei, V., Pilevar, Z., Khaneghah, A. M., & Hosseini, H. (2020). Propionic Acid: Method of Production, Current State and Perspectives. *Food technology and biotechnology*, 58(2), 115–127. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6356>.

16. ЦІАНОКОБАЛАМІН [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/159/cianokobalamin> .

17. Gautier M. (2014). Propionibacterium. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 232–237. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00280-9.

18. Xie, C., Coda, R., Chamlagain, B., Varmanen, P., Piironen, V., & Katina, K. (2019). Co-fermentation of *Propionibacterium freudenreichii* and *Lactobacillus brevis* in Wheat Bran for in situ Production of Vitamin B12. *Frontiers in microbiology*, 10, 1541. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01541>.
19. Yu, Y., Zhu, X., Shen, Y., Yao, H., Wang, P., Ye, K., Wang, X., & Gu, Q. (2015). Enhancing the vitamin B12 production and growth of *Propionibacterium freudenreichii* in tofu wastewater via a light-induced vitamin B12 riboswitch. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(24), 10481–10488. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6958-6>.
20. Assis, D. A., Matte, C., Aschidamini, B., Rodrigues, E., & Záchia Ayub, M. A. (2020). Biosynthesis of vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 using liquid acid protein residue of soybean as culture medium. *Biotechnology progress*, 36(5), e3011. <https://doi.org/10.1002/btpr.3011>.
21. Hajfarajollah, H., Mokhtarani, B., Mortaheb, H., & Afaghi, A. (2015). Vitamin B12 biosynthesis over waste frying sunflower oil as a cost effective and renewable substrate. *Journal of food science and technology*, 52(6), 3273–3282. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1383-x>.
22. Kośmider, A., Białas, W., Kubiak, P., Drożdżyńska, A., & Czaczyk, K. (2012). Vitamin B12 production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*: optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Bioresource technology*, 105, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.074>.
23. Thirupathaiah, Yeruva & Chiliveri, Dr. Swarupa Rani & Marrivada, Sudhakara Reddy & Linga, Venkateswar. (2012). Effect of chemical and microbial vitamin B₁₂ analogues on production of vitamin B. *World journal of microbiology & biotechnology*, 28, 2267-71. [10.1007/s11274-012-1011-8](https://doi.org/10.1007/s11274-012-1011-8).
24. Calvillo, Á., Pellicer, T., Carnicer, M., & Planas, A. (2022). Bioprocess Strategies for Vitamin B12 Production by Microbial Fermentation and Its Market

Applications. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 9(8), 365.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering9080365>.

25. Голуб Б., Даниленко С., Рудавська Г. (2009). Вплив пропіоновокислих бактерій на динаміку біфідофлори під час ферментації молока. *Товари і ринки*, 2, 121-128.

26. Патент 111295. Склад їстівної плівки з пробіотиком / Чорна А.І., Шульга О. С., Арсеньєва Л. Ю., Кравченко О. В., Покойовець К. Ю., Голь А.О., Грегірчак Н. М. Опубл. 10.11.2016, Бюл. № 12.

27. Капрельянц Л. В., Крупицкая Л. А. (2017). Пробиотические свойства и биотехнологический потенциал пропионовокислых бактерий. *Мікробіологія і біотехнологія*, 1, 6-15.

28. Патент 89051. Спосіб одержання мультипробіотика “симбілакт пролісок” / Ширококов В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Опубл. 10.04.2014, Бюл. №7.

29. Патент 99291. Спосіб одержання мультипробіотика “симбілюкс”/ Ширококов В. П., Димент Г. С., Янковський Д. С. Опубл. 25.05.2015, Бюл. № 10.

30. Патент 83271. Спосіб виробництва лікувально-профілактичного кисломолочного продукту “лактіум” / Добжанський В.Б. Опубл. 27.08.2013, Бюл. № 16.

31. Патент 107656. Спосіб одержання бактеріальної закваски “біфідолакт” / Семенівська О. А., Науменко О. В., Король Ц.О., Потемська О. І., Даниленко С.Г. Опубл. 24.06.2016, Бюл. № 12.

32. Baral, K. S., Vajracharya, R., Lee, S. H., & Han, H. K. (2021). Advancements in the Pharmaceutical Applications of Probiotics: Dosage Forms and Formulation Technology. *International journal of nanomedicine*, 16, 7535–7556. <https://doi.org/10.2147/IJN.S337427>.

33. Пальчевська Т.А., Лисенко Ю.С., Гула Л.Д., Ражик А.В. (2020) Застосування бурштинової кислоти та натріюсукцинату у фармації. Science, society, education: topical issues and development prospects. Abstracts of the 5th

International scientific and practical conference. SPC “Sci-conf.com.ua”. Kharkiv, Ukraine.

34. Li, X., Wei, L., Wang, Z., Wang, Y., & Su, Z. (2021). Efficient co-production of propionic acid and succinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* using membrane separation coupled technology. *Engineering in life sciences*, 21(6), 429–437. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000103>.

35. Duarte, J. C., Valença, G. P., Moran, P. J., & Rodrigues, J. A. (2015). Microbial production of Propionic and Succinic acid from Sorbitol using *Propionibacterium acidipropionici*. *AMB Express*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0095-6>.

36. Чернев О. В. (2015). Вплив курсового призначення сукцинату натрію на функціональний стан та загальну фізичну працездатність організму футболістів під час навчально-тренувальних зборів. *Науковий журнал «Sciencerise» Medical Science*, 9/3, 14, 16-24.

37. Suethao, S. & Innawong, B. & Sirisansaneeyakul, Sarote & Vanichsriratana, Wirat & Parakulsuksatid, Pramuk. (2015). Optimization and the effect of pH adjustment for trehalose production by *Propionibacterium acidipropionici* DSM 20273. *Nat. Sci.* 49. 726-737.

38. Ruhal, R., Kataria, R., & Choudhury, B. (2013). Trends in bacterial trehalose metabolism and significant nodes of metabolic pathway in the direction of trehalose accumulation. *Microbial biotechnology*, 6(5), 493–502. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12029>.

39. Tien, N. T., Karaca, I., Tamboli, I. Y., & Walter, J. (2016). Trehalose Alters Subcellular Trafficking and the Metabolism of the Alzheimer-associated Amyloid Precursor Protein. *The Journal of biological chemistry*, 291(20), 10528–10540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.719286>.

40. Pawlicka-Kaczorowska, J., & Czaczyk, K. (2017). Effect of crude and pure glycerol on biomass production and trehalose accumulation by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* 1. *Acta biochimica Polonica*, 64(4), 621–629. https://doi.org/10.18388/abp.2017_1570.

41. Ruhal, R., & Choudhury, B. (2012). Improved trehalose production from biodiesel waste using parent and osmotically sensitive mutant of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* under aerobic conditions. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(8), 1153–1160. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1124-y>.
42. Walmagh, M., Zhao, R., & Desmet, T. (2015). Trehalose Analogues: Latest Insights in Properties and Biocatalytic Production. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 13729–13745. <https://doi.org/10.3390/ijms160613729>.
43. Chandrakasan, G., Rodríguez-Hernández, A. I., Del Rocío López-Cuellar, M., Palma-Rodríguez, H. M., & Chavarría-Hernández, N. (2019). Bacteriocin encapsulation for food and pharmaceutical applications: advances in the past 20 years. *Biotechnology letters*, 41(4-5), 453–469. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-02635-5>.
44. Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., & Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, 5, 241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>.
45. Brede, D. A.; Faye, T.; Johnsborg, O.; Odegard, I.; Nes, I. F.; Holo, H. (2004). Molecular and Genetic Characterization of Propionicin F, a Bacteriocin from *Propionibacterium freudenreichii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7303–7310. doi:10.1128/AEM.70.12.7303-7310.2004.
46. Faye, T.; Langsrud, T.; Nes, I. F.; Holo, H. (2000). Biochemical and Genetic Characterization of Propionicin T1, a New Bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4230–4236. doi:10.1128/AEM.66.10.4230-4236.2000.
47. Mohamed, S. E., & Tahoun, M. K. (2015). The expression of propionicin PLG-1 gene (*plg-1*) by lactic starters. *The Journal of dairy research*, 82(2), 209–214. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000011>.
48. What Are the Medical Uses of Propionic Acid? [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.thehealthboard.com/what-are-the-medical-uses-of-propionic-acid.htm>.

49. Ahmadi, N., Khosravi-Darani, K., Zarean-Shahraki, S., Mortazavian, M., Mashayekh, S.M. (2015). Fed-Batch fermentation for propionic acetic and lactic acid production. *Orient J Chem*, 31, 581–590.

50. Jiang, Ling, Cui, Huaiyan, Zhu, Liying, Hu, Yi, Xu, Xian, Li, Shuang, Huang, He. (2015). Enhanced propionic acid production from whey lactose with immobilized *Propionibacterium acidipropionici* and the role of trehalose synthesis in acid tolerance. *Green Chem*, 17(1), 250–259. doi:10.1039/c4gc01256a.

51. Ammar, E. M., Martin, J., Brabo-Catala, L., & Philippidis, G. P. (2020). Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* using sweet sorghum bagasse hydrolysate. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(22), 9619–9629. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10953-w>.

52. Wang, P., Shen, C., Li, L., Guo, J., Cong, Q., & Lu, J. (2020). Simultaneous production of propionic acid and vitamin B12 from corn stalk hydrolysates by *Propionibacterium freudenreichii* in an expanded bed adsorption bioreactor. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 50(8), 763–767. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1734942>.

53. Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Kot, A. M., Kieliszek, M., & Bonin, S. (2021). Use of *Propionibacterium freudenreichii* T82 Strain for Effective Biosynthesis of Propionic Acid and Trehalose in a Medium with Apple Pomace Extract and Potato Wastewater. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(13), 3965. <https://doi.org/10.3390/molecules26133965>.

54. Wang, Z., Jin, Y., & Yang, S. T. (2015). High cell density propionic acid fermentation with an acid tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnology and bioengineering*, 112(3), 502–511. <https://doi.org/10.1002/bit.25466>.

55. Dishisha, T., Ståhl, Å., Lundmark, S., & Hatti-Kaul, R. (2013). An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. *Bioresource technology*, 135, 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.098>.

56. Yang, H., Wang, Z., Lin, M., & Yang, S. T. (2018). Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresource technology*, 250, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.016>.

57. Ahmadi, Negin; Khosravi-Darani, Kianoush; Mortazavian, Amir Mohammad (2017). An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 28. doi:10.1016/j.ejbt.2017.04.004.

58. Beier, Ross C.; Franz, Eelco; Bono, James L.; Mandrell, Robert E.; Fratamico, Pina M.; Callaway, Todd R.; Andrews, Kathleen; Poole, Toni L.; Crippen, Tawni L.; Sheffield, Cynthia L.; Anderson, Robin C.; Nisbet, David J. (2016). Disinfectant and Antimicrobial Susceptibility Profiles of the Big Six Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Strains from Food Animals and Humans. *Journal of Food Protection*, 79(8), 1355–1370. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-600.

59. Patent EP3337320A1. Disinfectant having organic acids. Christoph LINKE, Herta DR. GERDES. 27.06.2018.

60. Марсак, І. І., Скарлош, Т. Я. (2014). Деякі аспекти застосування дезінфікуючих засобів у багатопрофільних лікувально-профілактичних закладах. *Медсестринство*, 4: 17-20.

61. DISINFECTION 101. KEY PRINCIPLES OF CLEANING AND DISINFECTION FOR ANIMAL SETTINGS [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.cfsph.iastate.edu/Disinfection/Assets/Disinfection101.pdf> .

62. Серветки для миття та дезінфекції Sani-Cloth Active 125 шт. Ecolab [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.galecotrade.com/product/servetky-dlya-myttya-ta-dezinfektsiyi-sani-cloth-125sht-ecolab/?utm_source=google&utm_medium=merchant&utm_campaign=Shopping_Free&gclid=CjwKCAjwjaWoBhAmEiwAXz8DBYTi7kTXOnYE7mhGRjBqeRN OT4oSS-0F8gxCyfxkQPfKc2SxMKPwzRoCxOUQAvD_BwE .

63. Дезінфікуючі серветки (200 шт.) Portwest IW40, Синій [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://prom.ua/ua/p1566448391-dezinfitsiruyuschie-salfetki-200.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_spa_50_sport_i_otdykh&gclid=CjwKCAjwjaWoBhAmEiwAXz8DBSHuyTemWZ1GcF5Lz62zgnICGnGMW_iGLRr9v3WBmVRspCu0gMNTzxoCw78QAvD_BwE%20\],%20Kerr%20\(%D0%A1%D0%A8%D0%90\)%20\[%20%20%20https://newdental.com.ua/ua/p1430956070-caviwipes-kavi-vajps.html?source=merchant_center&gad=1&gclid=CjwKCAjwjaWoBhAmEiwAXz8DBbRMTxBqNhxE--0N2s4Wqc6_eHO6nd8Pg2KEgGqQEW9E4SOIksPnORoC0C4QAvD_BwE](https://prom.ua/ua/p1566448391-dezinfitsiruyuschie-salfetki-200.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_spa_50_sport_i_otdykh&gclid=CjwKCAjwjaWoBhAmEiwAXz8DBSHuyTemWZ1GcF5Lz62zgnICGnGMW_iGLRr9v3WBmVRspCu0gMNTzxoCw78QAvD_BwE%20],%20Kerr%20(%D0%A1%D0%A8%D0%90)%20[%20%20%20https://newdental.com.ua/ua/p1430956070-caviwipes-kavi-vajps.html?source=merchant_center&gad=1&gclid=CjwKCAjwjaWoBhAmEiwAXz8DBbRMTxBqNhxE--0N2s4Wqc6_eHO6nd8Pg2KEgGqQEW9E4SOIksPnORoC0C4QAvD_BwE) .

64. Серветки Сані Клос® Актив [Електронний ресурс] Режим доступу: https://dezplus.com.ua/catalogue/disinfection/quick/Sani-Cloth_Active.html .

65. Chemical Disinfectants. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities (2008) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/disinfection-methods/chemical.html> .

66. ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування засобу «Квікцид» з метою дезінфекції шкіри рук та шкірних покривів, екстреної дезінфекції [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://danamedikal.com/gallery/%D0%86%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D0%9A%D0%B2%D1%96%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B4%202020%D1%81%D0%BA%D0%B0%D0%BD.pdf> .

67. АКАСПРЕЙ дез-засіб для поверхонь на основі спирту, 1000 мл [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.dzo.com.ua/tenders/catalog/products/2445-MMMM-8680097101419-999999> .

68. МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ щодо застосування дезінфекційного засобу «ЛАСЕНТ РАПІД» (ТОВ «ЛАБОРАТОРІЯ АНТИСЕПТИКИ»,

Україна) з метою дезінфекції [Електронний ресурс] Режим доступу: https://lasept.com.ua/sites/default/files/manuals/lasept_rapid_metodvkazivki_2019_0.pdf.

69. ДЕЗАКТИН МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ (ІНСТРУКЦІЯ ПО ЗАСТОСУВАННЮ) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/dezaktin-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/> .

70. ІНСТРУКЦІЯ щодо використання засобу дезінфікуючого «Бланідас 300 (Blanidas 300)» з метою дезінфекції об'єктів [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dez.ck.ua/content/files/nstrukcja-shodo-vikoristannja-zasobu-z-metou-deznfeks-obektv-86012177.pdf> .

71. ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування дезінфікуючого засобу з мийною властивістю «ЛАСЕПТ 344-М» на підприємствах птахопереробної промисловості [Електронний ресурс] Режим доступу: https://lasept.com.ua/sites/default/files/manuals/instrukciya_lasept_344-m_pticya.pdf .

72. БАЦИЛЛОЛ АФ ІНСТРУКЦІЯ ПО ЗАСТОСУВАННЮ (МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/batsillof-af-instruktsiya-po-primeneniyu-metodicheskie-ukazaniya/> .

73. Метод. вказ. для самост. роботи студентів-бакалаврів з дисципліни «Медичне і фармацевтичне товарознавство» спеціальності «Сестринська справа» / уклад.: Т. І. Єрмоленко, А. В. Александрова, О. М. Губська – Харків: ХНМУ, 2016. – 175 с.

74. Маркування пластику: що нам треба знати [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://novadoba.com.ua/238406-markuvannya-plastyku-scho-nam-treba-znaty.html> .

75. Medichem Dosage Pump for Canister [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.doccheckshop.eu/hygiene-disinfection/dosing-application-aids/application-aids/5871/medichem-dosage-pump-for-canister> .

76. Plastic canister dosing pump, white [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ampri.com/Plastic-canister-dosing-pump-white-buy-Pump-for-dosing-disinfectant-canisters-with-30-ml-stroke-suitable-for-5-or-10-litre-canisters-as-accessory./09996-DP-XL> .

77. DOSING PUMP FOR 5L CANISTER [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.jbmcamp.com/en/products/dosing-pump-for-5l-canister-14793>.

78. Багаторазовий дозатор для каністри, 5000 мл [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.medtechnika.com.ua/ua/mnogorazovyj-dozator-dlja-kanistry-5000-ml.html>.

79. Дозатор помповий 28\410 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://himrezerv.kiev.ua/ua/p1668411324-pomповyj-dozator-28410.html>.

80. Дозатор ліктвовий Дермадос [Електронний ресурс] Режим доступу: https://dezplus.com.ua/catalogue/containers-dispensers/metering_17.html .

81. Які сфери застосування виробничої стрейч плівки? [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pan-box.com.ua/yaki-sfery-zastosuvannia-vyrobnychoi-streich-plitky/> .

82. Термозбіжна плівка ПОФ [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://terra-pack.ua/products/pof-termousadochnaya-plenka/#:~:text=%D0%A2%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%BE%D0%B7%D0%B1%D1%96%D0%B6%D0%BD%D0%B0%20%D0%BF%D0%BB%D1%96%D0%B2%D0%BA%D0%B0%20%D0%9F%D0%9E%D0%A4%20\(%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D1%84%D1%96%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0\)%20%E2%80%93,%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%85%20%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%80%D1%96%D0%B2%20%D1%96%20%D1%85%D0%B0%D1%80%D1%87%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%85%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B4%D1%83%D0%BA%D1%82%D1%96%D0%B2](https://terra-pack.ua/products/pof-termousadochnaya-plenka/#:~:text=%D0%A2%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%BE%D0%B7%D0%B1%D1%96%D0%B6%D0%BD%D0%B0%20%D0%BF%D0%BB%D1%96%D0%B2%D0%BA%D0%B0%20%D0%9F%D0%9E%D0%A4%20(%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D1%84%D1%96%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0)%20%E2%80%93,%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%85%20%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%80%D1%96%D0%B2%20%D1%96%20%D1%85%D0%B0%D1%80%D1%87%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%85%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B4%D1%83%D0%BA%D1%82%D1%96%D0%B2).

83. Порівняння термозбіжних плівок ПВХ і ПОФ [Електронний ресурс]
Режим доступу: [https://skytechpolymer.com.ua/ua/sravnenie-termousadochnyh-
plyonok-pvh-i-pof.html](https://skytechpolymer.com.ua/ua/sravnenie-termousadochnyh-plyonok-pvh-i-pof.html) .

84. What Are the Medical Uses of Propionic Acid? [Електронний ресурс]
Режим доступу: [https://www.thehealthboard.com/what-are-the-medical-uses-of-
propionic-acid.htm](https://www.thehealthboard.com/what-are-the-medical-uses-of-propionic-acid.htm).

85. Jiang Ling, Cui Huaiyan, Zhu Liying, Hu Yi, Xu Xian, Li Shuang, Huang He. Enhanced propionic acid production from whey lactose with immobilized *Propionibacterium acidipropionici* and the role of trehalose synthesis in acid tolerance. *Green Chem.* 2015, 17(1): 250–259. doi:10.1039/c4gc01256a.

86. Dishisha Tarek, Ståhl Åke, Lundmark Stefan, Hatti-Kaul Rajni. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. *Bioresource Technology.* 2013, 135: 504–512. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.098.

87. Yang Hopen, Wang Zhongqiang, Lin Meng, Yang Shang-Tian. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici* : Fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresource Technology.* 2017. S096085241731979X–.doi:10.1016/j.biortech.2017.11.016.

88. Системи збирання та дезінфекції чистих приміщень [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://kbt.com.ua/easy-mop>

89. Patent WO2015036433A1. Antimicrobial composition. François Bougard, Pierre Stachura, Philippe Vanhelleputte, Hélène Loncin. 19.03.2015.

90. Фармак. Про компанію [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://farmak.ua/about/>.

91. АТ "ФАРМАК" [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.contractors.com.ua/ua/customer/481198>

92. Гуасепт [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://lysoform.ua/products/guasept/>

93. Wang, P., Wang, Y., & Su, Z. (2012). Microbial production of propionic acid with *Propionibacterium freudenreichii* using an anion exchanger-based in situ

product recovery (ISPR) process with direct and indirect contact of cells. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(4), 974–986. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9485-7>.

94. Karp, Eric & Cywar, Robin & Manker, Lorenz & Saboe, Patrick & Nimlos, Claire & Salvachúa, Davinia & Wang, Xiaoqing & Black, Brenna & Reed, Michelle & Michener, William & Rorrer, Nicholas & Beckham, Gregg. (2018). Post-Fermentation Recovery of Biobased Carboxylic Acids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 6. 10.1021/acssuschemeng.8b03703.

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

96. Загальна біотехнологія : курс лекцій для здобувачів (короткого циклу) рівня вищої освіти ОПІ «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти / О. І. Каратєєва, О.І. Юлевич. – Миколаїв : МНАУ, 2022. – 107 с.

97. Ahmadi, N., Khosravi-Darani, K., Zarean-Shahraki, S., Mortazavian, M., Mashayekh, S.M. (2015). Fed-Batch fermentation for propionic acetic and lactic acid production. *Orient J Chem*, 31, 581–590.

98. ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ Методичні рекомендації для самостійного вивчення дисципліни і виконання лабораторно-практичних робіт студентами денної форми навчання напряму підготовки 6.051401- "Біотехнологія"/ Укл.: Юлевич О.І. – Миколаїв, 2015. –157 с.

99. Propionic Acid Preparation from Protocol [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.scientificlabs.co.uk/handlers/libraryFiles.ashx?filename=Manuals_F_FLY1290_A.pdf .

100. Propionic Acid [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propionic-Acid> .

101. 3410 ЛІТРІВ, ВНУТРІШНІЙ ТИСК 4 БАРИ, КОЖУХ 5/6 БАРІВ, КОРПУС РЕАКТОРА PFAUDLER BALFOUR GLASS LINED [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://perryvidex.eu/product/3410-ltr-fv-4-bar-int-5-6-bar-jkt-no-agit-11059>

102. Відцентрові насоси для харчової і фармацевтичної промисловості [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/vidcentrovi-nasosy-dlya-harchovoyi-i-farmaceutychnoyi-promyslovosti/>

103. Центрифуги фільтруючі з пульсуючим вивантаженням осаду [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://snpo.ua/produksiya/tsentrifugi/tsentrifugi-filtruyuchi-z-pulsuyuchim-vivantazhennyam-osadu/>

104. Ваговий дозатор сипучих продуктів ВД-1 [Електронний ресурс] Режим доступу: https://pack-tech.com.ua/p936405033-vesovoj-dozator-sypuchih.html?source=merchant_center&clid=Cj0KCQjw3JanBhCPARIsAJpXTx4jAOzXV1e0BAyOmZjGxjgx4b3JcW_WkUz8c6lfBRvzLVBRtUnIy3waArQhEALw_wcB .

105. Химический реактор REACTOR ACERO INOXIDABLE 316 2000 LITROS CON AGITACION Y MEDIA [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://machineryline.ua/ru/-/prodazha/himicheskie-reaktory/REACTOR-ACERO-INOXIDABLE-316-2000-LITROS-CON-AGITACION-Y-MEDIA--23040417532718450800>

106. Resin ion exchange column to produce Anthocyanin extractor complete line [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Resin-ion-exchange-column-to-produce_60805352795.html

107. Реактор для лаков для волос РС-1200 (Исполнение Ех) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-1200-l-v-ispolnenii-ex-vzryvozashhinnoe-ispolnenie/> .

108. Реактор з нержавійки 4 м3 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p637928736-reaktor-nerzhavjki.html> .

109. 12,6Т вакуум-випарна установка концентрації спиртової барди (4-ступені) для спиртового заводу потужністю 6000 дал спирту на добу [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://prom-nasos.pro/ua/catalog/engineering/vacuum-evaporation-plants/12-6t-vakuum-viparna-ustanovka-dlya-bardi-4-stupen-dlya-spirovogo-zavodu-potuzhn-styu-6000-dal-dobu>

110. Реактор химический 500 л, фармацевтический, промышленный, 304 нж БЕЗ давления [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://prom.ua/p948372616-reaktor-himicheskij-500.html>

111. USED STAINLESS STEEL 316 3200 LITRES REACTOR WITH AGITATION AND HALF-COIL JACKET [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://comquima.com/en/products/reactors/1-000-4-999-1/used-stainless-steel-316-3200-litres-reactor-with-agitation-and-half-coil-jacket-c7694> .

112. Автоматичний дозатор-укупорщик рідин Scaldorack Smartfiller [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/smartfiller>

113. Propionic Acid White Crystalline Powder [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.echemi.com/produce/pr2104161118-propionic-acid-white-crystalline-powder-saa6528752200-saa.html>

114. Son, E., Kim, H. K., Kim, H. S., Kim, M. R., & Kim, D. S. (2017). Quantification of propionic acid from *Scutellaria baicalensis* roots. Integrative medicine research, 6(1), 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.11.003>.

115. КИСЛОТА ПРОПІОНОВА [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/7183/kislota-propionov>

116. HPLC Refractive Index Detector (HPLC RI Detector) [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.labcompare.com/Chemical-Analysis-Equipment/514-HPLC-Refractive-Index-Detector-HPLC-RI-Detector/#:~:text=A%20refractive%20index%20\(RI\)%20detector,reference%20cell%20containing%20just%20solvent.](https://www.labcompare.com/Chemical-Analysis-Equipment/514-HPLC-Refractive-Index-Detector-HPLC-RI-Detector/#:~:text=A%20refractive%20index%20(RI)%20detector,reference%20cell%20containing%20just%20solvent.)

117. Нечипоренко О. Л. Визначення бактерицидних та бактеріостатичних властивостей нового дезінфікуючого препарату "Дезсан" / О. Л. Нечипоренко, А. В. Березовський, Т. І. Фотіна // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія : Ветеринарна медицина. - 2018. - Вип. 1. - С. 85-88.

118. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів. Конспект лекцій для студентів спеціальності 133 «Галузеве машинобудування» спеціалізація «Обладнання фармацевтичних та біотехнологічних виробництв» / Уклад.: В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибецький – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 251с.

118. Лич І.В. Промислова технологія лікарських засобів [Електронний ресурс]: конспект лекцій для студ. освітнього ступеня бакалавр спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ден. та заоч. форм навч. / І.В. Лич. – К.: НУХТ, 2017. – 323 с.

119. Стерилліум розчин нашкірний каністра 5 л [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/sterillium-r-n-nashkir-kanistra-5l-p59455>

120. ACQUITY UPLC TUV Detector [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715004733rb.pdf> .

121. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». - 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. - Т. 1. - 1128 с.



US011134680B2

(12) **United States Patent**
Linke et al.

(10) **Patent No.:** **US 11,134,680 B2**
(45) **Date of Patent:** **Oct. 5, 2021**

(54) **DISINFECTANT HAVING ORGANIC ACIDS**

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

- (71) Applicant: **Bode Chemie GmbH**, Hamburg (DE)
(72) Inventors: **Christoph Linke**, Hamburg (DE);
Herta Gerdes, Hamburg (DE)
(73) Assignee: **BODE CHEMIE GMBH**, Hamburg (DE)
(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

DE	197 10 127	9/1998
EP	1 110 452	6/2001
EP	0 588 912	4/2003
WO	WO 98/53681	12/1998
WO	WO 2009/155931	12/2009
WO	WO 2012/061920	5/2012
WO	WO 2014/100204	6/2014
WO	WO 2014100204 A1 *	6/2014
WO	WO 2015/036433	3/2015

OTHER PUBLICATIONS

- (21) Appl. No.: **15/751,974**
(22) PCT Filed: **Aug. 11, 2016**
(86) PCT No.: **PCT/EP2016/069115**
§ 371 (c)(1),
(2) Date: **Feb. 12, 2018**
(87) PCT Pub. No.: **WO2017/029183**
PCT Pub. Date: **Feb. 23, 2017**

White et al. ("Honey Composition and Properties" in *Beekeeping in the United States Agricultural Handbook No. 334, 1980, pp. 1-11*).*
Mato et al. ("Significance of Nonaromatic Organic acids in Honey;" in *Journal of Food Protection, vol. 66, No. 12, 2003, pp. 2371-2376*).*

Badawy et al. ("Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* infection," in *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz., 2004, 23 (3),1011-1022*).*

Murphy et al. "Combining Organic Acid Treatment with Steam Pasteurization To Eliminate *Listeria monocytogenes* on Fully Cooked Frankfurters" in *Journal of Food Protection, vol. 69, No. 1, 2006, pp. 47-52*.*

Doyle, Food Research Institute, UW-Madison, "Literature Survey of teh Various Techniques Used in *Listeria* Interventio" pp. 1-39, Oct. 1999.*

PCT International Search Report and Written Opinion, dated Oct. 6, 2016, issued in parallel PCT International application PCT/EP2016/069115, 13 pages.

Kramer et al., *WallhauBers Praxis der Sterilisation. Desinfektion, Antiseptik und Konservierung*, 2008, cover pages, and pp. 693-715. S. Block, *Disinfection, Sterilisation and Preservation*, 4th edition, ISBN 0-8121-1364-0, 1991, cover pages, and pp. 807-810.

Murphy et al., "Combining Organic Acid Treatment with Steam Pasteurization . . ." *J. Food Protection, vol. 69, No. 1, 2006, pp. 47-52*.

* cited by examiner

- (65) **Prior Publication Data**
US 2018/0235218 A1 Aug. 23, 2018

- (30) **Foreign Application Priority Data**
Aug. 18, 2015 (DE) 10 2015 113 641.4

- (51) **Int. Cl.**
A01N 37/02 (2006.01)
A01N 37/10 (2006.01)
A01N 37/36 (2006.01)
(52) **U.S. Cl.**
CPC **A01N 37/02** (2013.01); **A01N 37/10** (2013.01); **A01N 37/36** (2013.01); **A01N 2300/00** (2013.01)

- (58) **Field of Classification Search**
CPC A01N 37/02; A01N 37/36; A01N 37/10; A01N 2300/00
See application file for complete search history.

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

8,465,766 B2	6/2013	Krug	
8,557,265 B2	10/2013	Krug	
8,999,399 B2	4/2015	Lisowsky	
9,185,908 B2	11/2015	Krug	
9,426,981 B2	8/2016	Hurtmanns	
2004/0043922 A1 *	3/2004	Naidu	A23L 3/3571 426/326
2011/0028550 A1	2/2011	Campano	
2012/0252893 A1	10/2012	Pimentel	
2013/0209629 A1 *	8/2013	Berndt Briceno	A23B 7/157 426/240
2014/0377407 A1 *	12/2014	Parenicova	A21D 8/042 426/20
2014/0378333 A1 *	12/2014	Walt	C12Q 1/6876 506/9

(57) **ABSTRACT**

The invention relates to an aqueous disinfectant for disinfecting inanimate surfaces, a concentrate for producing the application solution, and the use of the disinfectant to eliminate microorganisms. The combination of a plurality of organic acids according to the invention is, surprisingly, a synergistic composition and enables adequate germicidal action. Surprisingly, adequate microbicidal effectiveness against a broad spectrum of microorganisms can thereby be achieved in a short exposure time without further active ingredients.

22 Claims, No Drawings



US011134680B2

(12) **United States Patent**
Linke et al.

(10) **Patent No.:** **US 11,134,680 B2**
(45) **Date of Patent:** **Oct. 5, 2021**

(54) **DISINFECTANT HAVING ORGANIC ACIDS**

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

- (71) Applicant: **Bode Chemie GmbH**, Hamburg (DE)
(72) Inventors: **Christoph Linke**, Hamburg (DE);
Herta Gerdes, Hamburg (DE)
(73) Assignee: **BODE CHEMIE GMBH**, Hamburg (DE)
(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

DE	197 10 127	9/1998
EP	1 110 452	6/2001
EP	0 588 912	4/2003
WO	WO 98/53681	12/1998
WO	WO 2009/155931	12/2009
WO	WO 2012/061920	5/2012
WO	WO 2014/100204	6/2014
WO	WO 2014100204 A1 *	6/2014
WO	WO 2015/036433	3/2015

OTHER PUBLICATIONS

- (21) Appl. No.: **15/751,974**
(22) PCT Filed: **Aug. 11, 2016**
(86) PCT No.: **PCT/EP2016/069115**
§ 371 (c)(1),
(2) Date: **Feb. 12, 2018**
(87) PCT Pub. No.: **WO2017/029183**
PCT Pub. Date: **Feb. 23, 2017**
(65) **Prior Publication Data**
US 2018/0235218 A1 Aug. 23, 2018

White et al. ("Honey Composition and Properties" in Beekeeping in the United States Agricultural Handbook No. 334, 1980, pp. 1-11).
Mato et al. ("Significance of Nonaromatic Organic acids in Honey," in Journal of Food Protection, vol. 66, No. 12, 2003, pp. 2371-2376).
Badawy et al. ("Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* infection," in Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz., 2004, 23 (3),1011-1022).
Murphy et al. "Combining Organic Acid Treatment with Steam Pasteurization To Eliminate Listeria monocytogenes on Fully Cooked Frankfurters" in Journal of Food Protection, vol. 69, No. 1, 2006, pp. 47-52.
Doyle, Food Research Institute, UW-Madison, "Literature Survey of teh Various Techniques Used in Listeria Interventio" pp. 1-39, Oct. 1999.
PCT International Search Report and Written Opinion, dated Oct. 6, 2016, issued in parallel PCT International application PCT/EP2016/069115, 13 pages.
Kramer et al., WallhauBers Praxis der Sterilisation. Desinfektion, Antiseptik und Konservierung, 2008, cover pages, and pp. 693-715.
S. Block, Disinfection, Sterilisation and Preservation, 4th edition, ISBN 0-8121-1364-0, 1991, cover pages, and pp. 807-810.
Murphy et al., "Combining Organic Acid Treatment with Steam Pasteurization . . ." J. Food Protection, vol. 69, No. 1, 2006, pp. 47-52.

- (30) **Foreign Application Priority Data**
Aug. 18, 2015 (DE) 10 2015 113 641.4
(51) **Int. Cl.**
A01N 37/02 (2006.01)
A01N 37/10 (2006.01)
A01N 37/36 (2006.01)
(52) **U.S. Cl.**
CPC **A01N 37/02** (2013.01); **A01N 37/10** (2013.01); **A01N 37/36** (2013.01); **A01N 2300/00** (2013.01)
(58) **Field of Classification Search**
CPC A01N 37/02; A01N 37/36; A01N 37/10; A01N 2300/00
See application file for complete search history.

* cited by examiner

Primary Examiner — Blessing M Fubara
(74) Attorney, Agent, or Firm — Greenblum & Bernstein, P.L.C.

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

8,465,766 B2	6/2013	Krug
8,557,265 B2	10/2013	Krug
8,999,399 B2	4/2015	Lisowsky
9,185,908 B2	11/2015	Krug
9,426,981 B2	8/2016	Hurtmanns
2004/0043922 A1 *	3/2004	Naidu A23L 3/3571 426/326
2011/0028550 A1	2/2011	Campano
2012/0252893 A1	10/2012	Pimentel
2013/0209629 A1 *	8/2013	Berndt Briceno A23B 7/157 426/240
2014/0377407 A1 *	12/2014	Parenticova A21D 8/042 426/20
2014/0378333 A1 *	12/2014	Walt C12Q 1/6876 506/9

(57) **ABSTRACT**

The invention relates to an aqueous disinfectant for disinfecting inanimate surfaces, a concentrate for producing the application solution, and the use of the disinfectant to eliminate microorganisms. The combination of a plurality of organic acids according to the invention is, surprisingly, a synergistic composition and enables adequate germicidal action. Surprisingly, adequate microbicidal effectiveness against a broad spectrum of microorganisms can thereby be achieved in a short exposure time without further active ingredients.

22 Claims, No Drawings

acid, propionic acid, tartaric acid, benzoic acid or mixtures thereof. It is also possible to use the sodium and potassium salts of the acids in order to buffer the pH of the solution. Preference is given here to sodium acetate and sodium benzoate. Particularly preferably, the disinfectant according to the invention contains a combination selected from acetic acid, propionic acid, lactic acid, tartaric acid and sodium benzoate and, more particularly, no sorbic acid and no C6-C12 fatty acids are present.

Unless specified otherwise, all the concentrations specified for the organic acids are based in each case on 100% acid. Preferably, according to the invention, the preparation of the disinfectant compositions uses commercially available 90% lactic acid, 99% propionic acid, 99% (+)-tartaric acid, 99% sodium benzoate and 100% acetic acid.

Instead of the free acid, the salt of an organic acid can also be added to the disinfectant composition. This has the advantage that the pH can be regulated without further pH regulators. Moreover, there is the option of adding a strong acid, for example hydrochloric acid or sulfuric acid, to produce the free acid from a salt.

In the disinfectant according to the invention, the individual components, if present, are preferably present in the following amounts.

Lactic acid 0.05-3% by weight, preferably 0.5-1.5% by weight

Tartaric acid 0.1-2% by weight, 0.5-1% by weight

Acetic acid 0.1-5% by weight, 0.5-3% by weight

Propionic acid 0.1-5% by weight, 0.5-3% by weight

Sodium benzoate 0.1-2% by weight, 0.1-1% by weight

Sodium acetate 0.1-5% by weight, 0.2-1% by weight

Propylene glycol 0.1-3% by weight, 0.2-1% by weight

Hexyl carbitol 0.1-3% by weight, 0.2-1% by weight

The disinfectant according to the invention is preferably present as a ready-to-use, aqueous solution for disinfection (application solution). The application solution is prepared by dilution of a disinfectant concentrate according to the invention with water. In this case, the disinfectant according to the invention contains preferably 0.1 to 10% by weight, particularly preferably 0.5 to 8.0% by weight, further particularly preferably 2.0 to 6.0% by weight, of the concentrate and water.

In one embodiment, the disinfectant according to the invention consists of

0.1-10% by weight of at least two organic acids selected from acetic acid, propionic acid, lactic acid and tartaric acid or a combination of these,

0.1-10% by weight of sodium benzoate, auxiliaries, for example surfactants, solubilizers and water

wherein the components add up to 100% by weight.

According to the invention, the object is further achieved by a disinfectant concentrate for the preparation of the disinfectant according to the invention for the disinfection of inanimate surfaces, containing

0.1-85% by weight of at least three organic acids or the salts thereof selected from the group consisting of acetic acid, propionic acid, tartaric acid, benzoic acid and lactic acid,

a solvent, preferably water, and

optionally solubilizers selected from glycols, glycol ethers or a mixture thereof,

wherein the specified amounts are based in each case on the total amount of the concentrate.

In the disinfectant concentrate according to the invention, the amount of each individual organic acid is preferably not more than 50% by weight and the total amount of acids is not more than 85% by weight.

In one embodiment, the disinfectant concentrate according to the invention consists of

0.1-15% lactic acid,

0.1-50% by weight of acetic acid,

0.1-50% by weight of propionic acid,

wherein the sum of acetic acid and propionic acid is between 15% by weight and 60% by weight,

0-25% by weight of sodium benzoate,

0-6% by weight of tartaric acid,

0-15% by weight of sodium acetate

optionally solvent and

optionally auxiliaries (disinfection additives) selected from: pH regulators, surfactants, solubilizers, corrosion inhibitors, dyes, fragrances, complexing agents, wherein the components add up to 100% by weight and the total amount of acids is at least 21% by weight.

In a further preferred embodiment, the disinfectant concentrate according to the invention consists of

21-85% by weight of at least three organic acids selected from

0.1-50% by weight of acetic acid,

0.1-50% by weight of propionic acid,

0.1-6% by weight of tartaric acid,

0.1-30% by weight of lactic acid and

0.1-15% by weight of sodium benzoate, —2-20% by

weight of solubilizer selected from hexyl carbitol, propylene glycol, methyl carbitol, butyl carbitol, monoethylene glycol or a combination of these and water,

wherein the components add up to 100% by weight.

In a further embodiment, the disinfectant concentrate according to the invention consists of

15-45% by weight of at least two organic acids selected from acetic acid, propionic acid, lactic acid or a combination of these,

6-13% by weight of sodium benzoate

auxiliaries, such as, for example, solubilizers and pH regulators

water,

wherein the components add up to 100% by weight.

Preferably, the disinfectant according to the invention contains as antimicrobial active ingredient the following combinations of organic acids, wherein no further organic acids are present:

Combination A: propionic acid, lactic acid, sodium benzoate

Combination B: propionic acid, lactic acid, acetic acid

Combination C: propionic acid, acetic acid, sodium benzoate

Combination D: acetic acid, lactic acid, sodium benzoate

Combination E: propionic acid, lactic acid, acetic acid, sodium benzoate

Combination F: tartaric acid, propionic acid, acetic acid, lactic acid, sodium benzoate.

Particularly preferred embodiments of the concentrate according to the invention are the following compositions:

Concentrates	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Lactic acid	15	—	—	—	1
Tartaric acid	—	—	6	—	—
Acetic acid	15	15	15	30	5
Propionic acid	15	15	15	30	15

5

-continued

Concentrates	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Sodium benzoate	6	13	—	6	13
Sodium acetate	—	—	—	—	—
Propylene glycol	10	12	10	10	10
Hexyl carbitol	10	14	10	10	10
Demineralized water	29	31	44	13.5	46
Linear alcohol ethoxylate*	—	—	—	0.5	—

*Marlipal 1618/25, nonionic surfactant manufactured by Sasol Germany GmbH

The disinfectant according to the invention preferably has a pH of 1.0 to 7.0, particularly preferably ≥ 2.0 – ≤ 6.0 . The pH can be adjusted by addition of low amounts of pH regulators, such as strong bases or strong acids, for example sulfuric acid, potassium hydroxide, sodium sulfite. Preferably, the use of a pH regulator is dispensed with.

The disinfectant concentrates according to the invention can contain, as auxiliaries, solubilizers and/or pH regulators and/or surfactants. Suitable solubilizers are, for example, diethylene glycol mono-n-hexyl ether (hexyl carbitol) and/or 1,2-propanediol (propylene glycol), as well as methyl carbitol, butyl carbitol, monoethylene glycol. Further auxiliaries, which are less preferred according to the invention, are corrosion inhibitors, foam regulators, dispersants, dyes, perfume or mixtures thereof.

Hexyl carbitol and/or propylene glycol are preferably used at a weakly acidic pH in aqueous disinfectants containing sodium benzoate. The quantity ratio of sodium benzoate to hexyl carbitol is preferably between 4:1 and 1:4, particularly preferably 3:1. If propylene glycol is used, the quantity ratio of sodium benzoate to propylene glycol is between 4:1 and 1:4, particularly preferably 1:1.5. Particularly preferably, the combination of hexyl carbitol with propylene glycol in the presence of sodium benzoate is in a preferred ratio of sodium benzoate:hexyl carbitol:propylene glycol=3/1/5 or 3/5/5. Further solubilizers which can be used at pH<7.0 are: methyl carbitol, butyl carbitol, monoethylene glycol and combinations of these.

Preferably, the disinfectants according to the invention and the disinfectant concentrates according to the invention contain, as solubilizers, glycols selected from propylene glycol and monoethylene glycol and/or glycol ethers selected from methyl carbitol, butyl carbitol and hexyl carbitol, particularly preferably a combination of propylene glycol and hexyl carbitol.

Preferably, the disinfectants according to the invention and the disinfectant concentrates according to the invention contain, as sole antimicrobial active ingredient, organic acids and no further antimicrobial active ingredients. Particularly preferably, the disinfectants according to the invention contain no quaternary ammonium compounds, no aldehydes, no guanidines, no active chlorine, no amines, no oxygen-releasing agents, no monohydric alcohols, no aromatic alcohols, no metal ions and no combinations of these antimicrobial active ingredients.

Surprisingly, it is possible using the disinfectant according to the invention to already achieve, just through addition of organic acids without further antimicrobial active ingredients, a sufficient microbicidal efficacy against a broad spectrum of microorganisms after two minutes, five minutes or 15 minutes. Moreover, the combination of multiple organic acids that is in accordance with the invention represents, surprisingly, a synergistic composition owing to differently combined mechanisms of action and allows a sufficient, pathogen-killing action.

6

The list of organic acids suitable as active ingredients of disinfection compositions comprises:

formic acid, ascorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid, acetic acid, fumaric acid, glycolic acid, lactic acid, mandelic acid, phenylacetic acid, propionic acid, salicylic acid, tartaric acid, zinc stearic acid, citric acid, present in each case as free acid, salt and in any combination, preferably acetic acid, lactic acid, propionic acid, tartaric acid, sodium benzoate/benzoic acid or mixtures thereof.

Preferably, the disinfectant concentrates according to the invention contain organic acids having 2 to 8 carbon atoms, preferably 3 to 7 carbon atoms.

In one embodiment, the disinfectants according to the invention and the disinfectant concentrates according to the invention additionally contain nonionic surfactants, cationic surfactants, amphoteric surfactants, or a combination of these, and preferably no anionic surfactants.

There are many compounds which belong to the group of organic acids and which can differ in structure and mode of action. One way of characterizing organic acids is the degree of dissociation in the aqueous medium. The dissociation constant of an organic acid (K_a) decreases with increasing chain length; the acid dissociates more weakly.

Organic acids can have an antimicrobial action owing to their acid function and their structure. Thus, a long-chain fatty acid can, owing to its hydrophilic and hydrophobic moiety, also have an antimicrobial character as surface-active substance, comparable to surfactants, whereas a short-chain acid can act through the lowering of pH. The acidity can be deduced from the pKa value. The pKa corresponds to the negative common logarithm of the acid constant K_a and provides information about the equilibrium position of an acid which reacts with water. The pKa therefore serves as a measure of the strength of an acid, with a small value meaning a strong acid.

Preferably, the disinfectant according to the invention and the disinfectant concentrate according to the invention comprise, as antimicrobial active ingredient (active component), exclusively organic acids having a pKa between 2 and 6, preferably having a pKa between 3 and 5.

The organic acids preferred according to the invention have the following pKa values (at 20° C.)

pKa tartaric acid: 3.04

pKa lactic acid: 3.87

pKa benzoic acid: 4.17

pKa acetic acid: 4.76

pKa propionic acid: 4.88.

Surprisingly, the organic acids in combination can be used effectively according to the invention against microorganisms, since the following mechanisms of action apparently accumulate synergistically:

(1) Action due to lowering of the pH through dissociation of the organic acid. $R-COOH+H_2O \rightarrow R-COO^-+H_3O^+$.

Reason: Each microorganism has its cardinal conditions; if there is a change to these—for example the pH—the growth rate decreases (up to inhibition).

(2) Action due to attachment of the acid anion to the cell membrane of the microorganism. $R-COO^- \rightarrow$ cell wall/phospholipid membrane.

Reason: Disruption of cell proliferation and equilibrium concentration between intracellular and extracellular space. According to one assumption, the long-chain fatty-acid anions are positioned between the phospholipid molecules and are, from a certain concentration, statistically sufficiently close to one another for them, owing to their COO^- groups, to

push apart the membrane molecules and to thus effectively contribute to the perforation of the cell membrane.

(3) Intracellular action: The undissociated acid (R—COOH) can, owing to an absent hydration shell, pass through the cell wall of a microorganism more easily than the corresponding anion. In the interior of the organism, a relatively high pH prevails, resulting in the acid activity being released—comparable to (1)—and this leads to the denaturation of important proteins and further unspecific reactions within the organism.

(4) Some aromatic carboxylic acids can act as depolarizers via their redox potential, by, for example, being able to inhibit ion channels of the cells and to thus lead to a charge reversal.

During the preparation of the concentrates according to the invention, a further unexpected effect was found. In the presence of a relatively strong acid, sodium benzoate does not exhibit any solubility in an aqueous, glycol-containing solution. It is found that, surprisingly, sodium benzoate in the presence of relatively weak acids can, even in the presence of a relatively strong acid and low pH values, be dissolved without any problems to form a colorless and clear composition. This is surprising, since the presence of a relatively strong acid leads to a protonation of the benzoate, resulting in the presence of the poorly water-soluble benzoic acid. The presence of at least one relatively weak acid is sufficient for bringing sodium benzoate into a stable, aqueous, colorless solution.

In a preferred embodiment, the application solution consists of

- a) 0.45-10% by weight of at least one organic acid selected from acetic acid, propionic acid or a combination of these,
 - b) 0.1-1% by weight selected from sodium benzoate or sodium acetate or a combination of these,
 - c) 0-2% by weight of solubilizer selected from hexyl carbitol and propylene glycol or a combination of these and
 - d) water,
- wherein at least 3 acids and/or the salts thereof (a) and (b) are present.

In a further preferred embodiment, the application solution consists of

- a) 0.45-10% by weight of at least one organic acid selected from acetic acid, propionic acid or a combination of these,
- b) 0.1-1% by weight selected from sodium benzoate or sodium acetate or a combination of these,
- c) 0.1-1% by weight of lactic acid,
- d) 0-2% by weight of solubilizer selected from hexyl carbitol and propylene glycol or a combination of these and
- e) water,

wherein the sum of

$$\frac{(a)}{10} + (c) < 1.0.$$

In a preferred embodiment, the application solution consists of

- a) 0.45-10% by weight of at least one organic acid selected from acetic acid, propionic acid or a combination of these,

- b) 0.1-1% by weight selected from sodium benzoate or sodium acetate or a combination of these,
- c) 0.1-1% by weight of tartaric acid,
- d) 0-2% by weight of solubilizer selected from hexyl carbitol and propylene glycol or a combination of these and
- e) water,

wherein the sum of (a)+(c) is <1.0.

In a preferred embodiment, the application solution consists of

- a) 0.45-10% by weight of at least one organic acid selected from acetic acid, propionic acid or a combination of these,
- b) 0.1-1% by weight selected from sodium benzoate or sodium acetate or a combination of these,
- c) optionally 0.1-1% by weight of lactic acid,
- d) optionally 0.1-1% by weight of tartaric acid,
- e) 0-2% by weight of solubilizer selected from hexyl carbitol and propylene glycol or a combination of these and
- f) water,

wherein the sum of

$$\frac{(a)}{10} + (c) + (d) < 1.0.$$

Preferably, the application solution of the disinfectant according to the invention contains organic acids in a concentration of 0.1-10% by weight, particularly preferably 0.3-5.0% by weight.

More particularly, the sum of propionic acid, acetic acid, lactic acid and tartaric acid in the application solution is below 10% by weight.

Particularly preferably, the organic acids in the application solution mathematically meet the following conditions (data in % by weight):

$$\frac{\text{Acetic acid and/or propionic acid}}{10} + \frac{\text{Tartaric acid + lactic acid}}{1} \leq 1.0$$

$$\frac{\text{Acetic acid and/or propionic acid}}{10} + \frac{\text{Lactic acid}}{1} \leq 1.0$$

$$\frac{\text{Acetic acid and/or propionic acid}}{10} + \frac{\text{Tartaric acid}}{10} \leq 1.0$$

$$\frac{\text{Tartaric acid + lactic acid}}{1} \leq 1.0$$

Surprisingly, the disinfectants according to the invention and the concentrates according to the invention exhibit, with their combinations of organic acids, an antimicrobial efficacy which goes far beyond an inhibition of growth, and can be used for preparing effective disinfectants which already exhibit after a few minutes a complete reduction of bacteria, yeasts and even mycobacteria (reduction by at least 4 logs against yeasts and mycobacteria, at least 5 logs of bacteria).

The disinfectant concentrates according to the invention and the disinfectants according to the invention are preferably used for the disinfection of inanimate surfaces, especially for the reduction (killing) of yeasts, especially of *Candida albicans*, and/or reduction (killing) of bacteria, especially of *Staphylococcus aureus*. Preferably, the disinfectant concentrate or the disinfectant is used to bring about at least a log 4 reduction with respect to *Candida albicans* within 2 minutes in accordance with the "Standardmethoden

der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren" [Standard methods of the German Society for Hygiene and Microbiology for testing chemical disinfection methods] (version of 1 Sep. 2001) in the quantitative suspension test. Further preferably, the disinfectant or the concentrate is used to bring about at least a log 5 reduction with respect to *Staphylococcus aureus* within 2 minutes in accordance with the "Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren" [Standard methods of the German Society for Hygiene and Microbiology for testing chemical disinfection methods] (version of 1 Sep. 2001) in the quantitative suspension test. Further preferably, the disinfectant or the concentrate is used to bring about at least a log 4 reduction with respect to *Mycobacterium terrae* within 15 minutes, preferably within 10 minutes, further preferably within 5 minutes, particularly preferably within 2 minutes, in accordance with the "Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren" [Standard methods of the German Society for Hygiene and Microbiology for testing chemical disinfection methods] (version of 1 Sep. 2001) in the quantitative suspension test.

Particularly preferably, the disinfectant or the concentrate is used to bring about at least a log 4 reduction with respect to *Candida albicans* within 2 minutes and at least a log 5 reduction with respect to *Staphylococcus aureus* within 2 minutes and at least a log 4 reduction with respect to *Mycobacterium terrae* within 15 minutes, preferably within 10 minutes, further preferably within 5 minutes, particularly preferably within 2 minutes, in accordance in each case with the "Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren" [Standard methods of the German Society for Hygiene and Microbiology for testing chemical disinfection methods] (version of 1 Sep. 2001) in the quantitative suspension test.

Particularly preferably, the disinfectant according to the invention or the disinfectant concentrate according to the invention is used for the reduction of the microorganisms *S. aureus* and *C. albicans*. The test for antimicrobial efficacy is done especially at low organic load, i.e., in the presence of 0.03% albumin, but can also be done under high organic load, i.e., in the presence of 0.3% albumin and 0.3% sheep erythrocytes, the pathogen reduction necessary in accordance with the DGHM or EN standard also being achieved at high load.

The disinfectant concentrate according to the invention and the disinfectant according to the invention have the advantage that they are suitable not only for the reduction of the stated test pathogens *M. terrae*, *C. albicans* and *S. aureus*, but also simultaneously reduce other microorganisms, such as *M. avium*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *E. hirae*. It is therefore possible to reduce a multitude of different pathogens at the same time using just one disinfectant.

The disinfectants according to the invention and the disinfectant concentrates according to the invention can be used in combination with a substrate (e.g., ready-to-use cloth).

Moreover, the liquid disinfectant can be used in the form of a presoaked, appropriate support material for wipe disinfection, the support material being formed from a synthetic plastic from the group consisting of polyester, polyamide, polyurethane, polyethylene, polypropylene, polytetrafluoroethylene (PTFE), preferably polyester.

The support material is, for example, a cloth, a sponge or another application aid. The disinfectant used according to the invention is preferably applied in the form of a foam, of a liquid or in the form of a disinfectant-impregnated cloth,

sponge or other application aid. Here, the disinfectant can be brought directly to the surface to be treated, without further dilutions.

EXAMPLES

Preparation of the Concentrates and Application Dilutions

Concentrates having the compositions specified in Tables 1 and 2 were prepared. The first preparation step involved initially charging the water (if applicable) and the solubilizer in a suitable vessel. In the next step, the organic acids were added. It was found that combinations of liquid acids can be added together without any solubility problems. When using solid acids or the salts thereof, such as, for example, benzoic acid, sodium benzoate, sodium acetate and tartaric acid, there was in some cases a temporary turbidity of the solution in combinations with the liquid acids. Moreover, there was in some cases low heat generation in the case of combination of acid and salts, and it is for this reason that a slow addition is advantageous. In the last step, surfactants were additionally added, if applicable. Thereafter, the composition was stirred until a colorless, clear solution representing the concentrate was formed. From the concentrates, application solutions were prepared by dilution with water of standardized hardness (WSH). These were tested for antimicrobial efficacy. The concentrations of the application solution are specified in Tables 4 to 9 for the various measurement series.

A particular phenomenon is found in the preparation of the disinfectant concentrates according to the invention: in the presence of a relatively strong acid, sodium benzoate and/or benzoic acid exhibit no solubility in aqueous solution Comparative Example A. It is found that, surprisingly, sodium benzoate and/or benzoic acid in the presence of at least one relatively weak acid can, even at low pH values, be dissolved in aqueous solution without any major problems to form a colorless and clear composition. Examples B, C and E show that the presence of at least one relatively weak acid is sufficient to bring sodium benzoate and/or benzoic acid into a stable, aqueous, colorless solution, even in the presence of a relatively strong acid.

TABLE 1

Recipes of concentrates A to E in % by weight; A, D: comparative examples; B, C, E: according to the invention

	A (compar- ison)		D (compar- ison)		
	B	C	B	C	E
Lactic acid (90%)	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Tartaric acid (100%)	—	—	—	—	—
Acetic acid (100%)	—	—	15.00	—	15.00
Propionic acid	—	15.00	—	—	—
Sodium benzoate	6.0	6.0	6.0	—	—
Benzoic acid	—	—	—	6.0	6.0
Propylene glycol	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Hexyl carbitol	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Deminerallized water	59.0	44.0	44.0	59.0	44.0
	Insoluble, two phases	Soluble, colorless, clear	Soluble, colorless, clear	Insoluble, two phases	Soluble, colorless, clear

11

Recipes

TABLE 2 a

Recipes of inventive concentrates 1 to 6 in % by weight, Marlupal ® 1618/25: linear alcohol ethoxylate, manufacturer Sasol Germany						
Example	1	2	3	4	5	6
Lactic acid (90%)	15.0	12.0	30.0	1.0	1.4	15.0
Tartaric acid (100%)	—	—	—	1.4	2.0	—
Acetic acid (100%)	44.0	42.0	44.0	9.5	5.0	—
Propionic acid	15.0	—	—	9.5	5.0	15.0
Sodium benzoate	6.0	6.0	6.0	0.3	0.4	6.0
Propylene glycol	10.0	10.0	10.0	0.4	0.4	10.0
Hexyl carbitol	10.0	10.0	10.0	0.4	0.4	10.0
Deminerlized water	—	20.0	—	77.1	85.0	44.0
Marlipal ® 1618/25	—	—	—	0.4	0.4	—
pH regulators	—	—	—	—	—	—
pH	2.63	3.10	2.50	2.20	2.23	3.57

TABLE 2 b

Recipes of inventive concentrates 7 to 12 in % by weight, Dehydrol ® 04 DEO: fatty alcohol C8 with approx. 4 mol EO, manufacturer BASF						
Example	7	8	9	10	11	12
Lactic acid (90%)	15.0	15.0	10.0	—	—	15
Tartaric acid (100%)	—	—	—	—	—	—
Acetic acid (100%)	15.0	40.0	—	15	30	40
Propionic acid	15.0	15.0	40.0	15	30	15
Sodium benzoate	6.0	6.0	6.0	6	6	6
Propylene glycol	10.0	10.0	6.0	10	10	10
Hexyl carbitol	10.0	10.0	6.0	10	10	10
Deminerlized water	29.0	—	32.0	44	14	—
Dehydrol ® 04 DEO	—	4.0	—	—	—	4
pH regulators	—	—	—	—	—	KOH (50%)
pH	3.34	2.64	3.52	3.96	3.43	5.06

TABLE 2 c

Recipes of inventive concentrates 13 to 18 in % by weight, Marlipal ® 1618/25: linear alcohol ethoxylate, manufacturer Sasol Germany Dehydrol ® 04 DEO: fatty alcohol C8 with approx. 4 mol EO, manufacturer BASF						
Example	13	14	15	16	17	18
Lactic acid (90%)	—	15	15	—	1	—
Tartaric acid (100%)	6	—	—	—	—	—
Acetic acid (100%)	15	40	15	15	5	30
Sodium acetate	—	—	—	—	—	—
Propionic acid	15	15	15	15	15	30
Sodium benzoate	—	—	—	13	13	6
Propylene glycol	10	10	10	12	10	10
Hexyl carbitol	10	10	10	14	10	10
Deminerlized water	44	6	35	31	46	13.5
Marlipal 1618/25	—	—	—	—	—	0.5
Dehydrol ® 04 DEO	—	4	—	—	—	—
pH regulators	—	KOH (50%)	KOH (50%)	—	—	—
pH	2.12	2.25	2.31	4.41	4.61	3.43

12

TABLE 3a

Recipes of noninventive concentrates V1 to V5 in % by weight, Dehydrol ® 04 DEO: fatty alcohol C8 with approx. 4 mol EO, manufacturer BASF Lutensol ® ON 110: nonionic surfactant with branched C10 alcohol, manufacturer BASF					
Example	V1	V2	V3	V4	V5
Lactic acid (90%)	15	—	9.7	—	—
Tartaric acid (100%)	—	—	—	48.5	—
Acetic acid (100%)	—	—	—	—	—
Propionic acid	—	15	—	—	97.0
Sodium benzoate	6	6	—	—	—
Propylene glycol	10	10	1.0	1.0	1.0
Hexyl carbitol	10	10	1.0	1.0	1.0
Deminerlized water	44	59	87.3	48.5	—
Dehydrol 04 DEO	—	—	1.0	1.0	1.0
Lutensol ON 110	15	—	—	—	—
pH regulators	—	—	—	—	—
pH	3.75	4.55	1.83	0.62	1.90

TABLE 3b

Recipes of noninventive concentrates V1 to V5 in % by weight, Dehydrol ® 04 DEO: fatty alcohol C8 with approx. 4 mol EO, manufacturer BASF					
Example	V6	V7	V8	V9	V10
Lactic acid (90%)	—	6.0	—	—	—
Tartaric acid (100%)	—	—	—	—	—
Acetic acid (100%)	97.0	—	—	15	—
Sodium acetate	—	—	—	—	—
Propionic acid	—	—	—	15	15
Sodium benzoate	1.0	—	—	—	13
Propylene glycol	1.0	15	15	10	10
Hexyl carbitol	—	15	15	10	10
Deminerlized water	1.0	34	40	50	52
Dehydrol 04 DEO	—	30	30	—	—
pH regulators	—	—	—	—	—
pH	0.69	3.05	2.94	2.02	5.05

Testing for Antimicrobial Efficacy

The disinfectant according to the invention or the disinfectant concentrate according to the invention brings about at least a log 4 reduction with respect to *C. albicans* in accordance with the "Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren" [Standard methods of the German Society for Hygiene and Microbiology for testing chemical disinfection methods] (version of 1 Sep. 2001) in the quantitative suspension test. The disinfectant concentrate according to the invention or the application solution according to the invention brings about at least a log 4 reduction with respect to *C. albicans* and a log 5 reduction with respect to *S. aureus* in less than 60 minutes in accordance with the "Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren" [Standard methods of the German Society for Hygiene and Microbiology for testing chemical disinfection methods] (version of 1 Sep. 2001) in the quantitative suspension test.

Besides the DGHM tests, there is also the option of testing in accordance with European Standard (EN) 13624 "Chemical disinfectants and antiseptics—Quantitative suspension test for the evaluation of yeasticidal activity of chemical disinfectants in the medical area—Test method and requirements (phase 2, step 1)"; in this case, the procedure and evaluation is nearly identical to the DGHM tests.

The following tables each show the log reduction with respect to various test pathogens at various organic loads.

Low organic load corresponds to the presence of 0.03% albumin; high organic load corresponds to the presence of 0.3% albumin and 0.3% sheep erythrocytes.

Candida albicans

TABLE 4a

Reduction factors of x % application solutions with respect to <i>Candida albicans</i> , at various organic loads						
Example	%	15 min	30 min	45 min	60 min	Organic load
1	2	—	<1.92	<1.93	<1.93	Low
	3	<1.93	4.46	>6.41	—	—
2	3	<1.79	<1.85	<1.63	—	High
	4	<1.79	2.26	>6.11	—	—
	5	2.98	>6.33	>6.11	—	—
3	2	—	<1.92	<1.93	<1.93	Low
	3	<1.93	2.47	4.03	—	—
4	20	<1.76	<1.78	—	<1.82	Low
	40	5.94	>6.26	—	>6.30	—
5	20	<1.76	<1.78	—	<1.82	Low
	40	<1.76	2.26	—	>6.30	—
6	3	<1.93	3.21	5.44	—	Low
	4	>6.41	>6.42	>6.44	—	—
	5	>6.41	>6.42	>6.44	—	—
7	3	4.44	>6.42	>6.44	—	Low
	4	>6.41	>6.42	>6.44	—	—
	5	>6.41	>6.42	>6.44	—	—
8	3	3.43	>6.42	>6.44	—	Low
	4	>6.41	>6.42	>6.44	—	—
V1	3	<1.93	<1.94	<1.96	—	Low
	4	<1.93	<1.94	2.04	—	—
	5	<1.93	3.11	4.63	—	—
V2	3	<1.93	<1.94	<1.96	—	Low
	4	2.28	4.28	5.96	—	—
	5	>6.41	>6.42	>6.44	—	—
9	3	<1.93	<1.94	2.98	—	Low
	4	>6.41	>6.42	>6.44	—	—
	5	>6.41	>6.42	>6.44	—	—
V3	5	<1.61	<1.59	—	<1.56	Low
	10	<1.61	<1.59	—	<1.56	—
V4	5	<1.61	<1.59	—	<1.56	Low
	10	<1.61	<1.59	—	<1.56	—
V5	5	<1.61	2.31	—	5.74	Low
	10	>6.09	>6.07	—	>6.04	—
V6	5	<1.61	<1.59	—	<1.56	Low
	10	5.01	>6.07	—	>6.04	—
V7	2	<1.78	<1.84	—	—	High
	3	<1.78	<1.84	—	—	—
V8	2	<1.78	<1.84	—	—	High
	3	<1.78	<1.84	—	—	—
10	3	<1.90	<1.89	<1.90	—	Low
	4	<1.90	2.65	4.84	—	—
	5	>6.38	>6.37	>6.38	—	—
11	3	<1.90	<1.89	<1.90	—	Low
	4	>6.38	>6.37	>6.38	—	—
	5	>6.38	>6.37	>6.38	—	—
V9	3	<1.90	<1.89	<1.90	—	Low
	4	<1.90	<1.89	<1.90	—	—
	5	<1.90	<1.89	<1.90	—	—
15	3	<1.72	<1.70	<1.75	—	Low
	4	<1.72	<1.70	<1.75	—	—
	5	<1.72	<1.70	<1.75	—	—
V10	3	<1.72	<1.70	<1.75	—	Low
	4	<1.72	<1.70	2.10	—	—
	5	>5.20	>5.18	>5.23	—	—

Candida albicans

TABLE 4b

Reduction factors of x % application solutions with respect to <i>Candida albicans</i> , at low organic load						
—	%	2 min	5 min	15 min	—	Organic load
16	5.5	4.36	4.36	5.25	—	Low
	4	<1.94	<1.94	2.20	—	Low
17	5	3.85	5.52	>6.39	—	—
	6	>6.42	>6.42	>6.42	—	—

Staphylococcus aureus

TABLE 5

Reduction factors of x % application solutions with respect to <i>Staphylococcus aureus</i> , at various organic loads						
—	%	15 min	30 min	45 min	60 min	Organic load
1	2	—	>7.21	>7.23	>7.22	Low
	3	>7.21	>7.13	>7.22	—	—
2	1	<1.68	2.61	1.05	—	High
	3	>7.16	>7.15	>7.16	—	—
	5	>7.16	>7.15	>7.16	—	—
3	2	>7.21	>7.23	—	>7.22	Low
	3	>7.18	>7.21	—	>7.23	—
	5	<1.63	<1.68	—	<1.70	Low
4	5	<1.63	>7.16	—	>7.18	—
	20	5.47	>7.16	—	>7.18	—
	40	>7.11	>7.16	—	>7.18	—
5	5	<1.63	<1.68	—	<1.70	Low
	20	4.64	5.27	—	>7.18	—
	40	6.33	>7.16	—	>7.18	—
6	3	>7.32	>7.42	>7.32	—	Low
	4	>7.32	>7.42	>7.32	—	—
	5	>7.32	>7.42	>7.32	—	—
7	3	>7.32	>7.42	>7.32	—	Low
	4	>7.32	>7.42	>7.32	—	—
	5	>7.32	>7.42	>7.32	—	—
8	3	>7.32	>7.42	>7.32	—	Low
	4	>7.32	>7.42	>7.32	—	—
	5	>7.32	>7.42	>7.32	—	—
V1	3	3.03	5.14	6.42	—	Low
	4	5.81	>7.42	>7.32	—	—
	5	>7.32	>7.42	>7.32	—	—
V2	3	<1.84	<1.94	<1.84	—	Low
	4	<1.84	<1.94	<1.84	—	—
	5	<1.84	<1.94	<1.84	—	—
9	3	5.02	6.10	>7.32	—	Low
	4	>7.32	>7.42	>7.32	—	—
	5	>7.32	>7.42	>7.32	—	—
V3	5	<1.26	<1.32	—	<1.21	Low
	10	1.90	3.15	—	4.53	—
	5	>6.74	>6.80	—	>6.69	Low
V4	5	>6.74	>6.80	—	>6.69	—
	10	>6.74	>6.80	—	>6.69	—
	5	6.36	>6.80	—	>6.69	Low
V5	10	>6.74	>6.80	—	>6.69	—
	5	5.17	>6.80	—	>6.69	Low
	10	>6.74	>6.80	—	>6.69	—
V6	5	>6.74	>6.80	—	>6.69	—
	10	>6.74	>6.80	—	>6.69	—
V7	2	<1.65	<1.65	—	—	High
	3	<1.65	<1.65	—	—	—
V8	2	<1.65	<1.65	—	—	High
	3	<1.65	<1.65	—	—	—
	10	3	<1.73	3.87	>7.25	—
10	4	>7.21	>7.22	>7.25	—	—
	5	>7.21	>7.22	>7.25	—	—
	5	>7.21	>7.22	>7.25	—	—
11	3	5.73	6.74	>7.25	—	Low
	4	>7.21	>7.22	>7.25	—	—
	5	>7.21	>7.22	>7.25	—	—
V9	3	<1.73	<1.74	<1.77	—	Low
	4	<1.73	<1.74	3.54	—	—
	5	2.52	4.71	>7.25	—	—
13	3	<1.74	<1.76	<1.77	—	Low
	4	<2.18	5.71	>7.25	—	—
	5	>7.22	>7.24	>7.25	—	—

15

TABLE 5-continued

Reduction factors of x % application solutions with respect to <i>Staphylococcus aureus</i> , at various organic loads						
	%	15 min	30 min	45 min	60 min	Organic load
15	3	<1.58	<1.50	<1.61	—	Low
	4	5.16	>6.98	>7.09	—	
	5	>7.06	>6.98	>7.09	—	
V10	3	<1.58	1.78	3.19	—	Low
	4	4.15	>6.98	>7.09	—	
	5	>7.06	>6.98	>7.09	—	
14	3	4.05	4.77	—	—	Low
	4	7.03	>7.29	>7.29	—	

Staphylococcus aureus

TABLE 6

Reduction factors of x % application solutions with respect to <i>Staphylococcus aureus</i> , at various organic loads						
	%	2 min	5 min	15 min	30 min	Organic load
9	4	—	>6.09	—	—	Low
	5	—	>6.09	—	—	
16	5.5	5.05	5.49	5.75	—	Low

Mycobacterium terrae

TABLE 7

Reduction factors of x % application solutions with respect to <i>Mycobacterium terrae</i> , at various organic loads						
	%	15 min	30 min	45 min	60 min	Organic load
1	2	<2.66	<2.58	<2.69	—	Low
	3	6.19	>7.06	>7.17	—	
	4	>7.14	>7.06	>7.17	—	
8	2	3.11	6.28	>7.17	—	Low
	3	>7.14	>7.06	>7.17	—	
9	4	>7.14	>7.06	>7.17	—	Low
	2	<2.66	<2.58	<2.69	—	
	3	<2.66	<2.58	<2.69	—	
V7	2	<1.70	<1.86	—	—	High
	3	<1.70	<1.86	—	—	
	2	<1.55	<1.40	—	—	
V8	3	<1.55	<1.40	—	—	High
	3	<1.55	<1.40	—	—	
12	3	>5.18	—	—	—	Low
	3	4.95	>6.26	>6.18	—	
14	3	>6.18	>6.26	>6.18	—	Low
	3	<1.71	<1.57	<1.65	—	
15	3	2.00	4.30	>6.13	—	Low
	3	<1.71	<1.57	3.04	—	
V10	3	>6.19	>6.05	>6.13	—	Low
	5	>6.19	>6.05	>6.13	—	

Pseudomonas aeruginosa

TABLE 8

Reduction factors of x % application solutions with respect to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , at various organic loads						
	%	15 min	30 min	45 min	60 min	Organic load
1	2	—	>7.01	>7.05	>7.06	Low
	3	>7.01	>7.05	>7.06	—	
3	2	—	>7.01	>7.05	>7.06	Low
	3	>7.01	>7.05	>7.06	—	

16

TABLE 8-continued

Reduction factors of x % application solutions with respect to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , at various organic loads						
	%	15 min	30 min	45 min	60 min	Organic load
V7	1	5.51	5.49	—	—	High
	2	>7.53	>7.49	—	—	
V8	1	<2.05	<2.01	—	—	High
	2	<2.05	<2.01	—	—	

Escherichia coli

TABLE 9

Reduction factors of x % application solutions with respect to <i>Escherichia coli</i> , at various organic loads						
	%	15 min	30 min	45 min	60 min	Organic load
1	3	>7.24	>7.16	>7.19	—	Low
	4	>7.24	>7.16	>7.19	—	
V7	1	4.57	5.26	—	—	High
	2	>7.53	>7.49	—	—	
V8	1	<1.84	<1.84	—	—	High
	2	<1.84	<1.84	—	—	

Description of the Results:

The data of Comparative Examples V7 and V8 show that the addition of 6% lactic acid to a concentrate used as 1% application dilution, contains accordingly 0.06% lactic acid, have a sufficient efficacy with respect to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*—even under high organic load. However, it is found that there is no discernible efficacy with respect to *Candida albicans*, *Mycobacterium terrae* and *Staphylococcus aureus* at this concentration. It is evident that *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and *Mycobacterium terrae* are the limiting pathogens here.

A 5% test solution of Comparative Example V5 contains, in application dilution, nearly 4.85% propionic acid and exhibits yeastcidity after an exposure time of 60 minutes. Moreover, it exhibits a sufficient efficacy with respect to *Staphylococcus aureus* in the case of an exposure time of 15 minutes. The composition contains, as active substance, only propionic acid; in order to achieve better wetting of the microorganisms, a low amount of solubilizer and nonionic surfactant is added. On the basis of the data from Comparative Example V7 and V8, it can be ruled out that the solubilizer and the surfactant cause the antimicrobial effect.

According to the literature [S. Block; Disinfection, Sterilisation, and Preservation; 4th edition; ISBN 0-8121-1364-0; pages 807 ff.], propionic acid exhibits no efficacy against yeast—this is supposedly more likely to be counterproductive, since a multitude of yeasts metabolize propionic acid as nutrient. Moreover, there is supposedly poor efficacy against bacteria, with the exception of *Bacillus mesentericus*. Analogous thereto is V6, an acetic acid composition which comprises in test concentration nearly 4.85% acetic acid, and also a low amount of nonionic surfactant and solubilizer. Although a sufficient efficacy is found against *Staphylococcus aureus* after 15 minutes, this amount of acetic acid does not indicate efficacy with respect to *Candida albicans*.

Comparative Example V2 is a combination of 6% sodium benzoate and 15% propionic acid, which exhibits, as 4% application dilution, yeastcidal efficacy after 30 minutes. To obtain a better solubility in water, there is a low amount of solubilizer in the composition. It is not evident to a person

skilled in the art that a 0.24% solution of sodium benzoate exhibits a sufficient yeasticidal efficacy in just 30 minutes. According to the literature (Wallhäußer et. al; Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung [Practical sterilization, disinfection, antiseptics and preservation]; ISBN 978-3-13-141121-1; pages 700 ff.), an application solution of 0.12% sodium benzoate acts microbially in 72 hours with respect to *C. albicans* (MMC>5 log, 1200 µg/ml). It can be considered out of the question that a doubling of the concentration from 0.12% to 0.24% leads to a reduction in the exposure time from 72 h to 30 min (0.7% of the exposure time). Moreover, according to the above-cited literature, propionic acid shows no efficacy on *Candida albicans*. Thus, a synergism with respect to *Candida albicans* that comes about through use of the two carboxylic acids sodium benzoate and propionic acid must be involved. However, under the selected test conditions, this recipe does not provide evidence of any efficacy with respect to *Staphylococcus aureus*.

The comparison of Comparative Example V2 with Example 6 shows that the addition of 15% lactic acid to the concentrate, corresponding in the case of a 3% solution to a concentration of 0.45%, brings about a significant improvement in yeasticity, as well as an efficacy with respect to *Staphylococcus aureus*. This confirms the presumption of inerasable synergism, since Comparative Examples V7 and V8 do not make it evident that lactic acid contributes to an efficacy with respect to *S. aureus* or *C. albicans*. This increase in efficacy is surprising, since Comparative Example V3 shows that an application solution containing 0.97% lactic acid has no efficacy on *Candida albicans* and insufficient efficacy with respect to *S. aureus*. Moreover, this assumption is confirmed by the comparison of V9 with Example 15. Here, it is likewise found that the addition of 0.6% lactic acid in application solution to a composition containing an identical amount of propionic acid and acetic acid brings about a significant increase in efficacy on *Staphylococcus aureus*.

The comparison of Comparative Example V2 with Example 10 shows that the addition of 15% acetic acid to sodium benzoate and propionic acid also brings about a significant increase in efficacy on *S. aureus*.

The comparison of Example 10 with Example 11 shows that further addition of acetic acid and propionic acid can, moreover, increase even further the efficacy against *S. aureus*: Example 10 shows, in the case of 3% application, insufficient reduction of *S. aureus* within 30 minutes, whereas Example 11 exhibits a reduction factor of RF>7 after just 15 min.

The comparison of Comparative Example V2 with Comparative Example V10 shows what effect an increase in the content of sodium benzoate has. Although the sodium benzoate concentration in Comparative Example 10 is more than twice as high as in Comparative Example V2, there is no improvement in the efficacy on *Candida albicans*; on the contrary, there is a deterioration. This supports the presumption of the synergistic composition due to the presence of at least three carboxylic acids. What is interesting about Comparative Example V2 and Comparative Example 10 is the pH of the composition. This is above the pKa value of benzoic acid of 4.22. Therefore, it is possible to infer the efficacy of sodium benzoate and not of benzoic acid.

Moreover, this becomes clear through the antimicrobial data of Example 8 and Example 12, since what was performed here was merely a pH correction and both recipes exhibit the maximum reduction factor against *Mycobacterium terrae* at 3% and an exposure time of 15 minutes. The

difference between the two reduction factors, RF>7 in relation to RF>5, arises from different screenings, in which the maximal possible reduction factors differed.

Recipe 12 corresponds in terms of the composition to recipe 8, but was titrated with KOH (50%) to an elevated pH of >5.0 in order to determine the influence of pH on antimicrobial efficacy. Here, the consumption of KOH (50%) was 12.0 g. Since the large amount of pH regulator resulted in an increase in the total amount of the composition from 100 g to 112 g and this consequently leads to a reduction in the proportion of the acids, the application concentration was increased in order to have the same amount of active organic acids in the respective test solutions.

Composition 8, which has a native pH of 2.64, corresponds to a composition containing 100 g and was tested as 3% test solution. The pH-altered recipe 12 corresponds to 112 g and was consequently tested as 3.36% composition. In order to be able to show a better comparability between the recipes and efficacies, the converted data were, for recipe 12, stated as 100 g of concentrate and accordingly 3% test concentrations.

Recipe 14 involved a native pH of 0.86; recipe 15 involved a native pH of 1.57. In order to minimize any influence on efficacy by deviating pH values, the pH values were adjusted here by addition of KOH(50%) to pH 2.25 and pH 2.31, respectively. In the case of recipe 14, the necessary amount of for this pH was 1 g of KOH(50%); in the case of recipe 15, this was just 0.8 g. The corresponding amount of demineralized water was substituted in order to continue to have 100 g of recipes. In order to be able to present a better comparability in the overview, the recipe overview lists, however, the amount as water, with a pH regulator being noted.

The results of Example 3 and Example 1 show that substitution of 15% lactic acid with 15% propionic acid can achieve a significant increase in efficacy on *Candida albicans*. What is crucial here is that, as a result of this substitution, altogether four acids are used and no longer just three, though instead in higher amounts. This is also confirmed by Examples 6 and 7.

The addition of 15% acetic acid significantly increases efficacy again, as shown by the comparison of the efficacy data of the *Candida albicans* screening. This increase in efficacy is unexpected for a person skilled in the art and confirms the synergism, since Comparative Example V6, a significantly higher concentration of acetic acid in application solution, exhibits no efficacy with respect to *Candida albicans* even at a relatively long exposure time.

The comparison of Example 14 and Example 8 demonstrates that the efficacy synergism with four acids leads to an even better pathogen reduction than three acids. What is involved here is a comparable composition differing only in a proportion of 6% sodium benzoate or 6% water. Recipe 8, which is based on four acids as active ingredients, achieves the maximum reduction (RF>7) on *Mycobacterium terrae* and *Staphylococcus aureus* within an exposure time of 15 minutes at 3% application concentration. By contrast, recipe 14 exhibits at this low concentration "merely" a reduction factor of 4.95 on *Mycobacterium terrae* and insufficient efficacy on *Staphylococcus aureus* (RF<5.0).

A comparison of recipe 7 with recipe 15 with efficacy data on *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* confirms the finding presented above.

Thus, the difference between the two recipes is merely the 6% benzoate and the resulting reduction factors of recipe 7 containing acetic acid, propionic acid, lactic acid and

sodium benzoate are significantly better than those of recipe 15 containing acetic acid, propionic acid and lactic acid.

Although the acetic acid in Example 1 is, in comparison with Example 7, increased from 15% to 44%, the absence of the 15% propionic acid appears to have the greater negative influence on the efficacy with respect to *Candida albicans*. Moreover, the propionic acid brings about a positive influence on solubility, as already described under "Preparation of the concentrates and application dilutions".

The results of Example 1, 8 and 9 show that, moreover, the combinations of the acids used can achieve a sufficient efficacy against *Mycobacterium terrae*.

Comparative Example V9 merely contains 15% propionic acid and acetic acid and exhibits, only as 5% solution, a sufficient efficacy with respect to *S. aureus* after 45 minutes and, up to 5%, no efficacy on *Candida albicans* 45 minutes. Recipe 13 corresponds to the composition of Comparative Example V9; however, 6% water was replaced here by tartaric acid. The direct comparison of Example 13 with V9 on *Staphylococcus aureus* shows an increase in efficacy due to addition of tartaric acid to the existing combination.

The recipe of V9 containing the two acids acetic acid and propionic acid can, however, also be compared well with Comparative Example V2: recipe V2, consisting of 15% propionic acid and 6% sodium benzoate, exhibits absolutely no efficacy with respect to *S. aureus* at 5% concentration and exposure time of 45 minutes, but a sufficient efficacy with respect to *Candida albicans* from 4% and 30 minutes. If, then, these recipes, V9 and V2, are combined to form 15% propionic acid, 15% acetic acid and 6% sodium benzoate, corresponding to Example 10, a significant increase in efficacy with respect to *S. aureus* is surprisingly found, according to which just a 3% application dilution after an exposure time of 45 minutes, or a 4% application dilution after 15 minutes, leads to a reduction factor of RF>7.0. This improvement is highly unexpected on the basis of the individual results.

In this connection, it is also surprising that an increase in the content of sodium benzoate from 6% to 13% in the presence of 15% propionic acid leads to a distinct increase in efficacy with respect to *Staphylococcus aureus*.

Example 9, which already achieves a maximum pathogen reduction on *Staphylococcus aureus* after an exposure time of 5 minutes, demonstrates that increasing the test concentrations can also achieve distinctly faster exposure times. Furthermore, recipe 16, consisting of 15% acetic acid and 15% propionic acid and 13% sodium benzoate, shows that a 5.5% application concentration can already achieve, after an exposure time of 2 minutes, sufficient efficacy with respect to *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. Moreover, this recipe shows that, as a result of the use of the corresponding acid salts, a good regulation of pH can be used and the antimicrobial efficacy nevertheless remains unchanged.

CONCLUSION

It was possible to show that synergic compositions containing organic acids are possible, with the best antimicrobial efficacies being obtained in the case of compositions containing at least three components.

On the basis of the cited literature, it was not evident to a person skilled in the art that it is possible using the stated acids and concentrations to prepare comprehensively and sufficiently effective disinfectants. What is particularly surprising here is the efficacy against the pathogens which are

in many cases limiting in disinfectants: *Mycobacterium terrae*, *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*.

The invention claimed is:

1. An anti-bacterial and/or anti-yeast disinfectant for the disinfection of bacteria and/or yeast on inanimate surfaces, which disinfectant consists of:

0.1-10% by weight of acetic acid, propionic acid, tartaric acid, and sodium benzoate,

water, and

optionally solubilizers selected from glycols, glycol ethers or a mixture thereof,

wherein the specified amounts are based in each case on the total amount of the disinfectant, and

wherein the disinfectant is effective as an anti-bacterial disinfectant against at least one bacteria and/or is effective as an anti-yeast disinfectant against at least one yeast.

2. The disinfectant of claim 1, which has a pH of 1.0 to 7.0.

3. The disinfectant of claim 2, which has a pH of 2.0 to 6.0.

4. An anti-bacterial and/or anti-yeast disinfectant for the disinfection of bacteria and/or yeast on inanimate surfaces, which disinfectant consists of:

(a) 0.1-10% by weight of at least one organic acid selected from acetic acid, propionic acid, or a combination of these,

(b) 0.01-1% by weight of lactic acid,

(c) 0.01-10% by weight of sodium benzoate,

(d) 0-2% by weight of solubilizer selected from hexyl carbitol, propylene glycol, methyl carbitol, butyl carbitol, monoethylene glycol, or a combination of these, and

(e) water,

wherein the components add up to 100% by weight and wherein the sum of (a)+(b) is $\leq 1\%$ by weight when (b) $\neq 0$ or the sum of (a)+(b) is $> 0.1\%$ by weight.

5. The disinfectant of claim 4, wherein the solubilizer is hexyl carbitol and/or propylene glycol.

6. The disinfectant of claim 1, which is an aqueous application solution containing 0.1 to 10% by weight of a disinfectant concentrate and water.

7. The disinfectant of claim 6, wherein the disinfectant is an aqueous application solution containing 0.5 to 8.0% by weight of a disinfectant concentrate and water.

8. The disinfectant of claim 6, wherein the disinfectant is an aqueous application solution containing 2.0 to 6.0% by weight of a disinfectant concentrate and water.

9. A disinfectant concentrate for the preparation of a disinfectant of claim 1, characterized in that the amount of each individual organic acid in the concentrate is not more than 50% by weight, and the total amount of acids is not more than 85% by weight.

10. A disinfectant concentrate, which consists of:

0.1-15% by weight of lactic acid,

0.1-50% by weight of acetic acid, and

0.1-50% by weight of propionic acid,

wherein the sum of acetic acid and propionic acid is between 15% by weight and 60% by weight,

optionally 0.1-25% by weight of sodium benzoate,

optionally 0.1-6% by weight of tartaric acid,

optionally 0.1-15% by weight of sodium acetate,

optionally solvent, and

optionally auxiliaries selected from: pH regulators, corrosion inhibitors, solubilizers, surfactants, dyes, fragrances, and complexing agents,

21

wherein the components of the concentrate add up to 100% by weight and the total amount of acids is at least 21% by weight.

11. A disinfectant concentrate which consists of:
21-85% by weight of at least three organic acids selected
from (a) 0.1-50% by weight of acetic acid, (b) 0.1-50%
by weight of propionic acid, (c) 0.1-6% by weight of
tartaric acid, (d) 0.1-30% by weight of lactic acid, and
(e) 0.1-15% by weight of salt of benzoic acid,
2-20% by weight of solubilizer comprising hexyl carbitol,
propylene glycol, methyl carbitol, butyl carbitol, mono-
ethylene glycol or a combination of these, and
water,

wherein the components add up to 100% by weight.
12. A support material, which has been presoaked with a
disinfectant of claim 1.

13. The support material of claim 12, which support
material is cloth.

14. The disinfectant of claim 1, wherein at least one
bacteria is mycobacteria.

15. The disinfectant of claim 1, wherein the disinfectant
is effective as an anti-bacterial disinfectant against a myco-
bacteria, and against at least one of *Staphylococcus aureus*,
Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, or *Enterococ-
cus hirae*.

16. The disinfectant of claim 15, wherein the disinfectant
is further effective as an anti-yeast disinfectant against at
least one yeast.

17. The disinfectant of claim 1, which is anti-mycobac-
terial for the disinfection of mycobacteria on inanimate
surfaces.

18. An anti-bacterial and/or anti-yeast disinfectant for the
disinfection of bacteria and/or yeast on inanimate surfaces,
which disinfectant consists of

0.1-10% by weight of at least two organic acids selected
from acetic acid, propionic acid, lactic acid and tartaric
acid or a combination of these,

0.1-10% by weight of sodium benzoate,
auxiliaries, and
water,

wherein the components add up to 100% by weight,
wherein the specified amounts are based in each case on
the total amount of the disinfectant, and
wherein the disinfectant is effective as an anti-bacterial
disinfectant against at least one bacteria and/or is
effective as an anti-yeast disinfectant against at least
one yeast.

19. A method for disinfecting inanimate surfaces by
killing microbials selected from the group consisting of
Staphylococcus aureus, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacte-
rium avium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,
Enterococcus hirae, and *Candida albicans*, comprising:
applying to an inanimate surface a disinfectant or a
disinfectant concentrate, and
allowing the disinfectant or disinfectant concentrate a
minimum of 15 minutes to kill the microbials and effect

22

at least a log 4 reduction of the presence of living
microbials, as measured in accordance with the "Stan-
dardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer
Desinfektionsverfahren," which is translated as Stan-
dard methods of the German Society for Hygiene and
Microbiology for testing chemical disinfection meth-
ods, in the quantitative suspension test,

wherein the disinfectant consists of:

0.1-10% by weight of at least two organic acids
selected from acetic acid, propionic acid, lactic acid
and tartaric acid or a combination of these,

0.1-10% by weight of sodium benzoate,
water, and

optionally solubilizers selected from glycols, glycol
ethers, or a mixture thereof,

wherein the specified amounts are based in each case on
the total amount of the disinfectant,

wherein the disinfectant is effective as an anti-bacterial
and/or anti-yeast disinfectant, and

wherein the disinfectant concentrate is the disinfectant
characterized in that the amount of each individual
organic acid in the concentrate is not more than 50% by
weight, and the total amount of acids is not more than
85% by weight.

20. The method of claim 19 to disinfect yeast on inani-
mate surfaces, characterized in that the disinfectant or the
disinfectant concentrate brings about at least a log 4 reduc-
tion with respect to *Candida albicans* within 2 minutes in
accordance with the "Standardmethoden der DGHM zur
Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren," which is
translated as Standard methods of the German Society for
Hygiene and Microbiology for testing chemical disinfection
methods in the quantitative suspension test.

21. The method of claim 19 to disinfect the bacteria
Staphylococcus aureus on inanimate surfaces, characterized
in that the disinfectant or the disinfectant concentrate brings
about at least a log 5 reduction with respect to *Staphylo-
coccus aureus* within 2 minutes in accordance with the
"Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer
Desinfektionsverfahren," which is translated as Standard
methods of the German Society for Hygiene and Microbi-
ology for testing chemical disinfection methods, in the
quantitative suspension test.

22. The method of claim 19 to disinfect *Mycobacterium
terrae* on inanimate surfaces, characterized in that the dis-
infectant or the disinfectant concentrate brings about at least
a log 4 reduction with respect to *Mycobacterium terrae*
within 15 minutes in accordance with the "Standardmeth-
oden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsver-
fahren," which is translated as Standard methods of the
German Society for Hygiene and Microbiology for testing
chemical disinfection methods, in the quantitative suspen-
sion test.

* * * * *

Article

Post-fermentation recovery of bio-based carboxylic acids

Eric M. Karp, Robin M Cywar, Lorenz P Manker, Patrick O Saboe, Claire T. Nimlos, Davinia Salvachua, Xiaoqing Wang, Brenna A. Black, Michelle L. Reed, William E. Michener, Nicholas Andrew Rorrer, and Gregg T Beckham

ACS Sustainable Chem. Eng., Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acsuschemeng.8b03703 • Publication Date (Web): 16 Oct 2018

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on October 18, 2018

Just Accepted

"Just Accepted" manuscripts have been peer-reviewed and accepted for publication. They are posted online prior to technical editing, formatting for publication and author proofing. The American Chemical Society provides "Just Accepted" as a service to the research community to expedite the dissemination of scientific material as soon as possible after acceptance. "Just Accepted" manuscripts appear in full in PDF format accompanied by an HTML abstract. "Just Accepted" manuscripts have been fully peer reviewed, but should not be considered the official version of record. They are citable by the Digital Object Identifier (DOI®). "Just Accepted" is an optional service offered to authors. Therefore, the "Just Accepted" Web site may not include all articles that will be published in the journal. After a manuscript is technically edited and formatted, it will be removed from the "Just Accepted" Web site and published as an ASAP article. Note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which could affect content, and all legal disclaimers and ethical guidelines that apply to the journal pertain. ACS cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these "Just Accepted" manuscripts.

Post-fermentation recovery of bio-based carboxylic acids

Eric M. Karp^{*†}, Robin M. Cywar^{†§}, Lorenz P. Manker[†], Patrick O. Saboe[†], Claire T. Nimlos^{†§}, Davinia Salvachúa[†], Xiaoqing Wang^{†§}, Brenna A. Black[†], Michelle L. Reed[†], William E. Michener[†], Nicholas A. Rorrer[†], and Gregg T. Beckham[†]

* Corresponding author: eric.karp@nrel.gov

[†] National Bioenergy Center, National Renewable Energy Laboratory, Golden CO 80401 USA

[§] Present address

R.M.C.: Department of Chemistry
Colorado State University, Fort Collins, CO, 80523

C.T.N.: Department of Chemical Engineering
Purdue University, West Lafayette, IN, 47907

Keywords: biochemicals, separations, carboxylic acid recovery, fermentation product recovery

Abstract: Carboxylic acids are common products produced from the bioconversion of renewable feedstocks. In these processes the separation of the acid product from fermentation broth is the most energy and cost intensive unit operation. Thus, the development of robust, scalable separations approaches that can be applied to a variety of carboxylates is of critical importance to the development of processes that utilize carboxylic acids as platform chemicals. Here we report a batch separations method that includes cell and particulate removal, cation exchange, activated carbon treatment, dewatering with a polymer resin, and product recovery. This method is demonstrated on two unique fermentation broths both derived from corn stover hydrolysate to separate neat succinic and propionic acid. For succinic acid, a crystallization yield of 91% with a product purity of 99.93% was achieved. To our knowledge this is the highest reported crystallization yield and purity for the recovery of succinic acid. Additionally, the method requires approximately 50% less energy compared to standard evaporative crystallization approaches. For propionic acid, neat liquid product was obtained with a distillation yield of 80% and purity of 98%. These excellent results achieved in terms of yield and purity for succinic and propionic acid, two acids with widely different physical properties, from chemically complex hydrolysate broth demonstrates the effective and robust nature of this approach.

INTRODUCTION

Carboxylic acids are common chemicals that can be produced biologically from a variety of renewable feedstocks such as carbohydrates, glycerol, and waste gases. The relative ease of carboxylate production from microbes has generated much interest in using them as a platform to create a variety of renewable chemicals and fuels.¹⁻³ Recently, this approach has yielded successful demonstrations of producing renewable fuels and commodity chemicals.¹⁻⁶ Furthermore, the promising trajectory of metabolic engineering and continued advances in large-scale bioprocess development have improved the economic outlook of these processes and allowed industrial operations to be developed for the production of targets such as succinic and lactic acid. However, among the unit operations employed, the major cost driver is in the separation of the acid from dilute fermentation broth, accounting for approximately 20-40% of the product cost.⁷ The typical method for carboxylic acid recovery is dependent on the target acid produced. However the sequence of steps involved generally includes some combination of (1) filtration (2) color removal (3) salt breaking, (4) evaporative dewatering, and (5) neat product recovery (chromatography, distillation, crystallization,

etc.).⁸ Given the large proportion of production cost associated with separations, it is important that scalable, cost-effective methods are developed for the recovery of carboxylic acids from fermentation broth and to that end modifications and alternative approaches to the typical sequence described above have been the subject of several publications.⁹⁻¹¹

In this manuscript we report a modified sequence of five steps, shown in Figure 1, for the recovery of neat carboxylic acids from fermentation broth that, to our knowledge, achieve the highest reported crystallization yields for succinic acid and also produces good results for the recovery of propionic acid. These steps include (1) broth centrifugation and filtration (for cell, particulate, and protein removal), (2) cation exchange (salt removal and acidification), (3) activated carbon treatment (color removal), (4) non-thermal dewatering using a poly(4-vinylpyridine) (PVP) resin, and (5) a final product recovery step, which is chosen based on the physical properties of the targeted acid. The key findings are that the order of operations is critical to increasing the overall broth to product yield. Specifically, cation exchange should be performed first to lower the amount of activated carbon required. This reduces waste and increases overall yield by decreasing product loss to due adsorption on the carbon.

The second key finding is that non-thermal dewatering in lieu of evaporative dewatering is more energy efficient and its selectivity towards acids results in a highly pure product.

We demonstrate this approach on two common acids produced from the fermentation of sugars: succinic acid and propionic acid. These acids form an excellent, comparative case study because they have significantly different physical properties, and the strains used to produce them are heterofermentative, meaning that minor acids are also present. Namely, succinic acid is a solid C₄ di-acid at standard conditions with a solubility in water of ~100 g/L, while propionic acid is a liquid C₃ mono-acid at standard conditions that is completely miscible in water. Due to the differences in physical properties of these target acids, the final recovery step is different for each case.

For succinic acid, we employ a cold crystallization in methanol achieving a crystallization yield of 91% and colorless crystals with a purity of 99.93%. To our knowledge, these are the highest reported crystallization yields and purities for the recovery of succinic acid from fermentation broth.

For propionic acid, a spinning band distillation system was used to recover propionic acid from the PVP elution

solvent (acetone). Recovered propionic acid was obtained at a distillation yield of 80% and a purity of 98%.

Additionally, the separations methods that we report here are the result of recovering these acids from corn stover hydrolysate fermentations, which are inherently more difficult broths to handle given the increased chemical complexity of hydrolysates compared to fermentations conducted with clean sugars. The demonstrated success of this approach on hydrolysate-based fermentation broths indicates the robust nature of this process and suggests that this method could likely achieve improved results for fermentations with refined substrates (glucose, sucrose, etc.). These results also highlight the utility of these methods as important tools for researchers operating at the bench scale and can be used to enable research into downstream catalytic conversion of these acids into value-added chemicals and fuels, as this field is growing rapidly. Lastly, we provide a discussion on how these methods can be scaled for industrial applications.

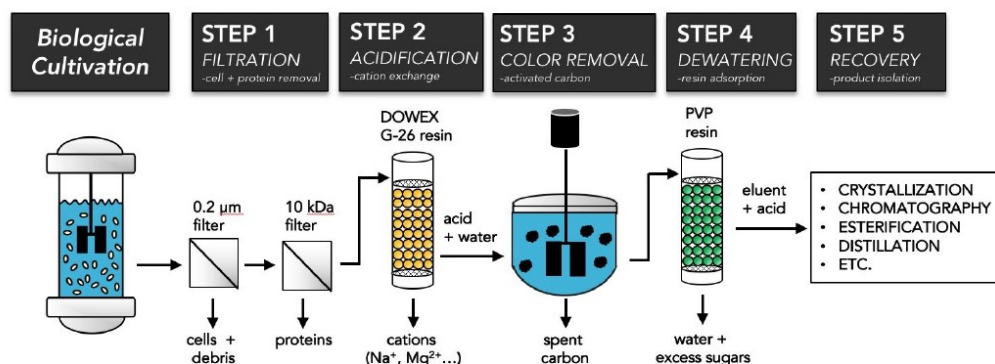


Fig. 1: Illustration of the five-step method for recovering carboxylic acids from fermentation broth. In step 1, broth is subjected to centrifugation and filtration, first with a 0.2 µm filter then a 10 kDa filter to remove debris, cells, and protein. In step 2, the broth is subjected to cation exchange to remove the cation from the salt and generate the free acid. In step 3, color-inducing compounds are further removed through treatment with activated carbon. In step 4, water and excess sugars are removed via adsorption of the free acids to a PVP resin. Finally, in step 5, the target acid is recovered in neat form by elution from the PVP resin with a polar solvent (e.g. methanol, acetone, etc.) and recovered via a method tailored to the physical properties of the acid. Exemplary methods include crystallization, chromatography, esterification, and distillation.

EXPERIMENTAL

Production of C₅-rich hydrolysate for succinic acid production. The production of xylose-rich hydrolysate was previously described by Salvachúa *et al.*¹² In brief, corn stover was knife-milled and deacetylated with 0.4% (w/w) NaOH. After deacetylation, the spent caustic liquor was drained from the vessel and the solids were rinsed with water and subjected to a dilute acid pretreatment with H₂SO₄ (8 g H₂SO₄/kg biomass). Pretreated, deacetylated solids were pressed to obtain the C₅-hydrolysate. The

hydrolysate was neutralized with NaOH (10 N) and filter sterilized for further succinic acid fermentations.

Production of C₅/C₆-hydrolysate for propionic acid production. The preparation of C₅-C₆-hydrolysate was previously described by Wang *et al.*¹³ In brief, corn stover was hammer-milled and deacetylated using a dilute NaOH solution (0.4% w/w). Following deacetylation, remaining solids were rinsed with water and then mixed with dilute H₂SO₄ solution to achieve a 0.8% (w/w) acid concentration for dilute acid pretreatment. After pretreatment, the slurry stream was neutralized and enzymatically

hydrolyzed using Novozymes Cellic[®] CTec2. The soluble sugar stream was separated from lignin solids, neutralized with NaOH (10 N), and filter sterilized for further propionic acid fermentations. The composition of each hydrolysate is shown in Table 1 below.

Component	Hydrolysate composition (g/L)	
	C5-rich	C6/C5
Glucose	13.60	89.10
Xylose	99.00	56.70
Arabinose	6.60	7.80
Acetic acid	15.60	1.80
Furfural	3.80	0.90
HMF	1.76	0.14

Table 1 Composition of C5-rich and C5/C6 corn stover hydrolysates.

Microorganism and fermentation conditions to produce succinic acid. *Actinobacillus succinogenes* 130Z (ATCC 55618) was revived from glycerol stocks by inoculating 1 mL in 100 mL sterile capped bottles containing 50 mL of Tryptic soy broth (TSB). Cells were incubated for ~16 h at 37°C and 200 rpm and then transferred into 0.5-L working volume BioStat-Q Plus fermentors with 300 mL of TSB and 4% xylose at an initial OD₆₀₀ of 0.05 (seed culture). The pH was controlled at 6.8 via supplementation of 4 N NaOH, the temperature at 37°C, and the agitation at 300 rpm. CO₂ was sparged at 0.03 vvm to ensure anaerobic fermentation and enhance succinate yields.⁴ After ~15 h of fermentation, cells were inoculated in 9 different fermenters (0.5-L working volume BioStat-Q Plus) with 300 mL of media at an initial OD of 0.1. The fermentation media contained 6 g/L yeast extract, 10 g/L corn steep liquor (the latter prepared as previously described by Salvachúa *et al.*)¹², 0.3 g/L Na₂HPO₄, 1.4 g/L NaH₂PO₄, 1.5 g/L K₂HPO₄, 1.4 g/L sodium acetate, 1 g/L NaCl, 0.2 g/L MgCl₂·6H₂O, and 0.2 g/L CaCl₂·2H₂O, and diluted C5-hydrolysate to yield an initial sugar concentration of 55 g/L of sugars. Fermentations were controlled at the same conditions than the seed culture. Succinate titer (g/L) variability among the nine biological replicates was ±2.6%.

Microorganism and fermentation conditions to produce propionic acid. *P. acidipropionici* ATCC 4875 was revived from glycerol stocks by inoculating 1 mL into a 100 mL sealed serum bottle containing 25 mL seed medium. Seed media consisted of 40 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 5 g/L tryptic soy broth, 0.48 g/L K₂HPO₄, 0.98 g/L KH₂PO₄, and 0.05 g/L MnSO₄. After incubating the cells at 30 °C for 48 h and 200 rpm, 15 mL cell culture was transferred into a 250 mL serum bottle containing 100 mL fresh seed medium for 40 h, at 30 °C, and 200 rpm. Cell pellets were then collected through centrifugation at 6,000 x g for 10 min at 4 °C. Cell pellets were re-suspended and inoculated into a 10 L bioreactor (New Brunswick BioFlo[®]/CelliGen[®] 310 bioreactor, Eppendorf) containing 9.5 L fermentation medium at an initial OD₆₀₀ of 0.6. The fermentation medium contained 13.9 g/L yeast extract, 0.48 g/L K₂HPO₄, 0.98 g/L KH₂PO₄, 0.05 g/L MnSO₄, and diluted C6/C5 corn stover hydrolysate to yield an initial sugar concentration of 125 g/L (75.3 g/L glucose, 44.3 g/L xylose, and 6.5 g/L arabinose). The fermentation was conducted at 30°C with constant agitation at 400 rpm. The pH was controlled at 6.0 by the addition of 4 N NaOH. Anaerobic conditions were maintained by sparging 0.1 vvm N₂ in the medium during the fermentation process.

Cell particulate and protein removal. 10 L of each broth was centrifuged at 12,000 g for 30 minutes in 1 L centrifuge bottles (ThermoFisher Scientific, Waltham MA). After 30 minutes a thick

cell cake was formed and the liquid broth was decanted off of the cake and vacuum filtered through a PTFE filter with a pore size of 0.2 μm (ThermoFisher Scientific Nalgene, Waltham MA). The filter-sterilized broth was then filtered through a hollow fiber cartridge filter with a 10 kDa pore size (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Westborough MA) to remove proteins. After each filtration the total mass of liquid was measured, and a 0.5 mL sample was taken for analysis (see analytical methods below). The mass and measured concentration from each step was used to determine the yield of acid after each separation step.

Cation exchange. DOWEX G-26 resin (Sigma-Aldrich, lot #MKEX1809V) was cleaned and pretreated by adding 600 g of dry resin to a large beaker, which was covered with 10 wt.% sulfuric acid and stirred for 1 hr. The resin and sulfuric acid solution was then slurried into a 1 L glass column with a glass fit at the base of the column. 6 bed volumes (BV) of ultra high purity (UHP) water were added and gravity drained rapidly through the resin bed using a stopcock at the bottom of the column. The pH of the effluent water was tested using pH paper and additional water was rinsed through the column, if necessary, until the pH of the effluent water was neutral. 200 mL of the wet resin was then removed from the column and added to a large beaker and 1 L of filtered fermentation broth was added to the beaker and stirred with the resin for 1 hr. This batch exchange is necessary to release CO₂ gas from the broth before it is passed through the column.

The pre-exchanged broth and resin was then poured on top of the resin column and drained through at a rate of ~50 mL/min. As the broth drained through the column additional water was added on top of the broth to ensure that the column did not run dry. The black colored broth was collected as it eluted from the column. Collection of the broth stopped when the black color of the eluent disappeared.

The resin was regenerated by first rinsing the resin in the column rapidly with 2 bed volumes of water. Next, 2 BV 10 wt.% sulfuric acid was passed through the column at a rate of 40 mL/min. The sulfuric acid was rinsed out of the column first with 1 BV of water at a rate of 25 mL/min followed by rapidly rinsing the column with 6 bed volumes of water. The effluent water was confirmed to be of neutral pH indicating the sulfuric acid had been fully removed from the column.

Activated carbon treatment. For the data shown in Figure 2 (A) - (E), 1, 3, 5, 7 wt.% activated carbon (Sigma-Aldrich, lot #MKBS9039V) was added to 20 mL samples of broth that had been ion exchanged and broth that had not been ion exchanged. The mixtures were then stirred vigorously for 4 hours. The carbon was removed via vacuum filtration through a 0.2 μm PTFE filter. The treated 20 mL samples were analyzed for color inducing impurities as a function of carbon loading via the analytical methods described below. From these results, the optimal carbon loadings was determined and the entire 10 L of remaining broth was ion exchanged and treated with 3 wt.% activated carbon for 4 hours.

Dewatering with poly(4-vinylpyridine) resin. The loading capacity of the target acids, succinic and propionic acid, on the PVP resin were determined by generating breakthrough curves (Figures 3A and S4 A). For these experiments, 5 grams (~6 mL wetted volume) of dry resin (Sigma-Aldrich Reillex 425, lot #MKBR9896) was stirred in 200-proof ethanol for 20 minutes. The ethanol was vacuum filtered off and the resin slurried into a 25 mL burette in UHP water with a quartz wool plug at the base of the column. The column was allowed to settle and then rinsed with 10 BV of UHP water. 5-6 BV of cation exchanged and activated carbon treated broth was added on top of the resin and drained through at a rate of 3 BV/hr (0.4 mL/min), a rate suggested by Kawabata *et al.*¹⁹ Effluent samples were taken at intervals between 0.3 - 0.6 BV and analyzed for acid concentrations as described in the analytical methods below. The breakthrough point was determined as the

hydrolyzed using Novozymes Cellic[®] CTec2. The soluble sugar stream was separated from lignin solids, neutralized with NaOH (10 N), and filter sterilized for further propionic acid fermentations. The composition of each hydrolysate is shown in Table 1 below.

Component	Hydrolysate composition (g/L)	
	C5-rich	C6/C5
Glucose	13.60	89.10
Xylose	99.00	56.70
Arabinose	6.60	7.80
Acetic acid	15.60	1.80
Furfural	3.80	0.90
HMF	1.76	0.14

Table 1 Composition of C5-rich and C5/C6 corn stover hydrolysates.

Microorganism and fermentation conditions to produce succinic acid. *Actinobacillus succinogenes* 130Z (ATCC 55618) was revived from glycerol stocks by inoculating 1 mL in 100 mL sterile capped bottles containing 50 mL of Tryptic soy broth (TSB). Cells were incubated for ~16 h at 37°C and 200 rpm and then transferred into 0.5-L working volume BioStat-Q Plus fermentors with 300 mL of TSB and 4% xylose at an initial OD₆₀₀ of 0.05 (seed culture). The pH was controlled at 6.8 via supplementation of 4 N NaOH, the temperature at 37°C, and the agitation at 300 rpm. CO₂ was sparged at 0.03 vvm to ensure anaerobic fermentation and enhance succinate yields.⁴ After ~15 h of fermentation, cells were inoculated in 9 different fermenters (0.5-L working volume BioStat-Q Plus) with 300 mL of media at an initial OD of 0.1. The fermentation media contained 6 g/L yeast extract, 10 g/L corn steep liquor (the latter prepared as previously described by Salvachúa *et al.*)¹², 0.3 g/L Na₂HPO₄, 1.4 g/L NaH₂PO₄, 1.5 g/L K₂HPO₄, 1.4 g/L sodium acetate, 1 g/L NaCl, 0.2 g/L MgCl₂·6H₂O, and 0.2 g/L CaCl₂·2H₂O, and diluted C5-hydrolysate to yield an initial sugar concentration of 55 g/L of sugars. Fermentations were controlled at the same conditions than the seed culture. Succinate titer (g/L) variability among the nine biological replicates was ±2.6%.

Microorganism and fermentation conditions to produce propionic acid. *P. acidipropionici* ATCC 4875 was revived from glycerol stocks by inoculating 1 mL into a 100 mL sealed serum bottle containing 25 mL seed medium. Seed media consisted of 40 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 5 g/L tryptic soy broth, 0.48 g/L K₂HPO₄, 0.98 g/L KH₂PO₄, and 0.05 g/L MnSO₄. After incubating the cells at 30 °C for 48 h and 200 rpm, 15 mL cell culture was transferred into a 250 mL serum bottle containing 100 mL fresh seed medium for 40 h, at 30 °C, and 200 rpm. Cell pellets were then collected through centrifugation at 6,000 x g for 10 min at 4 °C. Cell pellets were re-suspended and inoculated into a 10 L bioreactor (New Brunswick BioFlo[®]/CelliGen[®] 310 bioreactor, Eppendorf) containing 9.5 L fermentation medium at an initial OD₆₀₀ of 0.6. The fermentation medium contained 13.9 g/L yeast extract, 0.48 g/L K₂HPO₄, 0.98 g/L KH₂PO₄, 0.05 g/L MnSO₄, and diluted C6/C5 corn stover hydrolysate to yield an initial sugar concentration of 125 g/L (75.3 g/L glucose, 44.3 g/L xylose, and 6.5 g/L arabinose). The fermentation was conducted at 30°C with constant agitation at 400 rpm. The pH was controlled at 6.0 by the addition of 4 N NaOH. Anaerobic conditions were maintained by sparging 0.1 vvm N₂ in the medium during the fermentation process.

Cell particulate and protein removal. 10 L of each broth was centrifuged at 12,000 g for 30 minutes in 1 L centrifuge bottles (ThermoFisher Scientific, Waltham MA). After 30 minutes a thick

cell cake was formed and the liquid broth was decanted off of the cake and vacuum filtered through a PTFE filter with a pore size of 0.2 μm (ThermoFisher Scientific Nalgene, Waltham MA). The filter-sterilized broth was then filtered through a hollow fiber cartridge filter with a 10 kDa pore size (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Westborough MA) to remove proteins. After each filtration the total mass of liquid was measured, and a 0.5 mL sample was taken for analysis (see analytical methods below). The mass and measured concentration from each step was used to determine the yield of acid after each separation step.

Cation exchange. DOWEX G-26 resin (Sigma-Aldrich, lot #MKEX1809V) was cleaned and pretreated by adding 600 g of dry resin to a large beaker, which was covered with 10 wt.% sulfuric acid and stirred for 1 hr. The resin and sulfuric acid solution was then slurried into a 1 L glass column with a glass fit at the base of the column. 6 bed volumes (BV) of ultra high purity (UHP) water were added and gravity drained rapidly through the resin bed using a stopcock at the bottom of the column. The pH of the effluent water was tested using pH paper and additional water was rinsed through the column, if necessary, until the pH of the effluent water was neutral. 200 mL of the wet resin was then removed from the column and added to a large beaker and 1 L of filtered fermentation broth was added to the beaker and stirred with the resin for 1 hr. This batch exchange is necessary to release CO₂ gas from the broth before it is passed through the column.

The pre-exchanged broth and resin was then poured on top of the resin column and drained through at a rate of ~50 mL/min. As the broth drained through the column additional water was added on top of the broth to ensure that the column did not run dry. The black colored broth was collected as it eluted from the column. Collection of the broth stopped when the black color of the eluent disappeared.

The resin was regenerated by first rinsing the resin in the column rapidly with 2 bed volumes of water. Next, 2 BV 10 wt.% sulfuric acid was passed through the column at a rate of 40 mL/min. The sulfuric acid was rinsed out of the column first with 1 BV of water at a rate of 25 mL/min followed by rapidly rinsing the column with 6 bed volumes of water. The effluent water was confirmed to be of neutral pH indicating the sulfuric acid had been fully removed from the column.

Activated carbon treatment. For the data shown in Figure 2 (A) - (E), 1, 3, 5, 7 wt.% activated carbon (Sigma-Aldrich, lot #MKBS9039V) was added to 20 mL samples of broth that had been ion exchanged and broth that had not been ion exchanged. The mixtures were then stirred vigorously for 4 hours. The carbon was removed via vacuum filtration through a 0.2 μm PTFE filter. The treated 20 mL samples were analyzed for color inducing impurities as a function of carbon loading via the analytical methods described below. From these results, the optimal carbon loadings was determined and the entire 10 L of remaining broth was ion exchanged and treated with 3 wt.% activated carbon for 4 hours.

Dewatering with poly(4-vinylpyridine) resin. The loading capacity of the target acids, succinic and propionic acid, on the PVP resin were determined by generating breakthrough curves (Figures 3A and S4 A). For these experiments, 5 grams (~6 mL wetted volume) of dry resin (Sigma-Aldrich Reillex 425, lot #MKBR9896) was stirred in 200-proof ethanol for 20 minutes. The ethanol was vacuum filtered off and the resin slurried into a 25 mL burette in UHP water with a quartz wool plug at the base of the column. The column was allowed to settle and then rinsed with 10 BV of UHP water. 5-6 BV of cation exchanged and activated carbon treated broth was added on top of the resin and drained through at a rate of 3 BV/hr (0.4 mL/min), a rate suggested by Kawabata *et al.*¹⁹ Effluent samples were taken at intervals between 0.3 - 0.6 BV and analyzed for acid concentrations as described in the analytical methods below. The breakthrough point was determined as the

hydrolyzed using Novozymes Cellic[®] CTec2. The soluble sugar stream was separated from lignin solids, neutralized with NaOH (10 N), and filter sterilized for further propionic acid fermentations. The composition of each hydrolysate is shown in Table 1 below.

Component	Hydrolysate composition (g/L)	
	C5-rich	C6/C5
Glucose	13.60	89.10
Xylose	99.00	56.70
Arabinose	6.60	7.80
Acetic acid	15.60	1.80
Furfural	3.80	0.90
HMF	1.76	0.14

Table 1 Composition of C5-rich and C5/C6 corn stover hydrolysates.

Microorganism and fermentation conditions to produce succinic acid. *Actinobacillus succinogenes* 130Z (ATCC 55618) was revived from glycerol stocks by inoculating 1 mL in 100 mL sterile capped bottles containing 50 mL of Tryptic soy broth (TSB). Cells were incubated for ~16 h at 37°C and 200 rpm and then transferred into 0.5-L working volume BioStat-Q Plus fermentors with 300 mL of TSB and 4% xylose at an initial OD₆₀₀ of 0.05 (seed culture). The pH was controlled at 6.8 via supplementation of 4 N NaOH, the temperature at 37°C, and the agitation at 300 rpm. CO₂ was sparged at 0.03 vvm to ensure anaerobic fermentation and enhance succinate yields.⁴ After ~15 h of fermentation, cells were inoculated in 9 different fermenters (0.5-L working volume BioStat-Q Plus) with 300 mL of media at an initial OD of 0.1. The fermentation media contained 6 g/L yeast extract, 10 g/L corn steep liquor (the latter prepared as previously described by Salvachúa *et al.*)¹², 0.3 g/L Na₂HPO₄, 1.4 g/L NaH₂PO₄, 1.5 g/L K₂HPO₄, 1.4 g/L sodium acetate, 1 g/L NaCl, 0.2 g/L MgCl₂·6H₂O, and 0.2 g/L CaCl₂·2H₂O, and diluted C5-hydrolysate to yield an initial sugar concentration of 55 g/L of sugars. Fermentations were controlled at the same conditions than the seed culture. Succinate titer (g/L) variability among the nine biological replicates was ±2.6%.

Microorganism and fermentation conditions to produce propionic acid. *P. acidipropionici* ATCC 4875 was revived from glycerol stocks by inoculating 1 mL into a 100 mL sealed serum bottle containing 25 mL seed medium. Seed media consisted of 40 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 5 g/L tryptic soy broth, 0.48 g/L K₂HPO₄, 0.98 g/L KH₂PO₄, and 0.05 g/L MnSO₄. After incubating the cells at 30 °C for 48 h and 200 rpm, 15 mL cell culture was transferred into a 250 mL serum bottle containing 100 mL fresh seed medium for 40 h, at 30 °C, and 200 rpm. Cell pellets were then collected through centrifugation at 6,000 x g for 10 min at 4 °C. Cell pellets were re-suspended and inoculated into a 10 L bioreactor (New Brunswick BioFlo[®]/CelliGen[®] 310 bioreactor, Eppendorf) containing 9.5 L fermentation medium at an initial OD₆₀₀ of 0.6. The fermentation medium contained 13.9 g/L yeast extract, 0.48 g/L K₂HPO₄, 0.98 g/L KH₂PO₄, 0.05 g/L MnSO₄, and diluted C6/C5 corn stover hydrolysate to yield an initial sugar concentration of 125 g/L (75.3 g/L glucose, 44.3 g/L xylose, and 6.5 g/L arabinose). The fermentation was conducted at 30°C with constant agitation at 400 rpm. The pH was controlled at 6.0 by the addition of 4 N NaOH. Anaerobic conditions were maintained by sparging 0.1 vvm N₂ in the medium during the fermentation process.

Cell particulate and protein removal. 10 L of each broth was centrifuged at 12,000 g for 30 minutes in 1 L centrifuge bottles (ThermoFisher Scientific, Waltham MA). After 30 minutes a thick

cell cake was formed and the liquid broth was decanted off of the cake and vacuum filtered through a PTFE filter with a pore size of 0.2 μm (ThermoFisher Scientific Nalgene, Waltham MA). The filter-sterilized broth was then filtered through a hollow fiber cartridge filter with a 10 kDa pore size (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Westborough MA) to remove proteins. After each filtration the total mass of liquid was measured, and a 0.5 mL sample was taken for analysis (see analytical methods below). The mass and measured concentration from each step was used to determine the yield of acid after each separation step.

Cation exchange. DOWEX G-26 resin (Sigma-Aldrich, lot #MKEX1809V) was cleaned and pretreated by adding 600 g of dry resin to a large beaker, which was covered with 10 wt.% sulfuric acid and stirred for 1 hr. The resin and sulfuric acid solution was then slurried into a 1 L glass column with a glass fit at the base of the column. 6 bed volumes (BV) of ultra high purity (UHP) water were added and gravity drained rapidly through the resin bed using a stopcock at the bottom of the column. The pH of the effluent water was tested using pH paper and additional water was rinsed through the column, if necessary, until the pH of the effluent water was neutral. 200 mL of the wet resin was then removed from the column and added to a large beaker and 1 L of filtered fermentation broth was added to the beaker and stirred with the resin for 1 hr. This batch exchange is necessary to release CO₂ gas from the broth before it is passed through the column.

The pre-exchanged broth and resin was then poured on top of the resin column and drained through at a rate of ~50 mL/min. As the broth drained through the column additional water was added on top of the broth to ensure that the column did not run dry. The black colored broth was collected as it eluted from the column. Collection of the broth stopped when the black color of the eluent disappeared.

The resin was regenerated by first rinsing the resin in the column rapidly with 2 bed volumes of water. Next, 2 BV 10 wt.% sulfuric acid was passed through the column at a rate of 40 mL/min. The sulfuric acid was rinsed out of the column first with 1 BV of water at a rate of 25 mL/min followed by rapidly rinsing the column with 6 bed volumes of water. The effluent water was confirmed to be of neutral pH indicating the sulfuric acid had been fully removed from the column.

Activated carbon treatment. For the data shown in Figure 2 (A) - (E), 1, 3, 5, 7 wt.% activated carbon (Sigma-Aldrich, lot #MKBS9039V) was added to 20 mL samples of broth that had been ion exchanged and broth that had not been ion exchanged. The mixtures were then stirred vigorously for 4 hours. The carbon was removed via vacuum filtration through a 0.2 μm PTFE filter. The treated 20 mL samples were analyzed for color inducing impurities as a function of carbon loading via the analytical methods described below. From these results, the optimal carbon loadings was determined and the entire 10 L of remaining broth was ion exchanged and treated with 3 wt.% activated carbon for 4 hours.

Dewatering with poly(4-vinylpyridine) resin. The loading capacity of the target acids, succinic and propionic acid, on the PVP resin were determined by generating breakthrough curves (Figures 3A and S4 A). For these experiments, 5 grams (~6 mL wetted volume) of dry resin (Sigma-Aldrich Reillex 425, lot #MKBR9896) was stirred in 200-proof ethanol for 20 minutes. The ethanol was vacuum filtered off and the resin slurried into a 25 mL burette in UHP water with a quartz wool plug at the base of the column. The column was allowed to settle and then rinsed with 10 BV of UHP water. 5-6 BV of cation exchanged and activated carbon treated broth was added on top of the resin and drained through at a rate of 3 BV/hr (0.4 mL/min), a rate suggested by Kawabata *et al.*¹⁹ Effluent samples were taken at intervals between 0.3 - 0.6 BV and analyzed for acid concentrations as described in the analytical methods below. The breakthrough point was determined as the

In Figure 2A, UV absorbance measurements at 280 nm are shown for broth that has been treated with increasing activated carbon loadings alone and for broth that has been cation exchanged first and then treated with increasing activated carbon loadings. The UV measurement at 280 nm tracks the relative amount of aromatic components present in the broth which contribute to the color. From Figure 2A, it is clear that the broth that is cation exchanged first before activated carbon treatment exhibits a significantly lower absorbance at 280 nm across all activated carbon loadings. Even at 1 wt.% activated carbon loading, the cation exchanged broth exhibits an absorbance of 0.65 a.u. while the broth that has not been cation exchanged exhibits an absorbance of 6.8., approximately a 10-fold decrease in absorbance intensity at 280 nm is achieved by cation exchanging the succinic acid broth before activated carbon treatment.

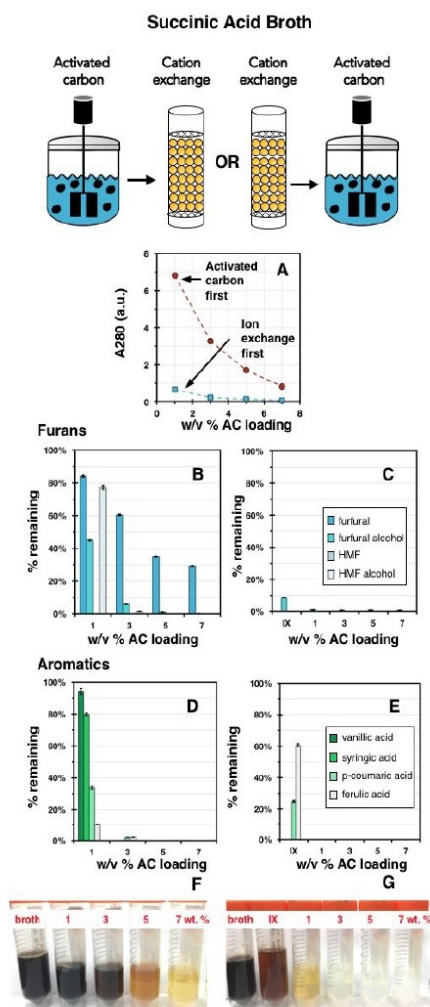


Figure 2: The color removal effect of treating succinic acid fermentation broth with activated carbon compared to first cation exchanging the broth then treating with activated carbon. (A) UV-Vis measurement of fermentation broth treated with the two procedures above. (B), (C) The percentage of furans remaining in the broth, relative to the results in Table 2, following activated carbon treatment (B) and following IX first before activated carbon treatment (C). (D), (E) The percentage of aromatic compounds following activated carbon treatment at various loadings (D) and following IX first before activated carbon treatment (E). (F) & (G) display an image the color differences in the broths treated through both methods.

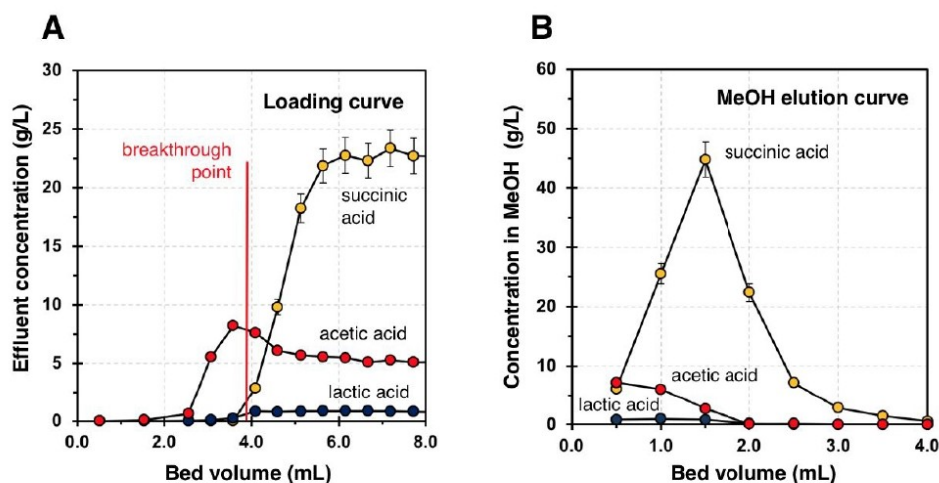


Fig. 3: (A) Loading curve for succinic acid broth passed through a 6 mL wetted bed volume of PVP resin (5 g dry bed mass of PVP). Here the broth drained through the column was analyzed for the concentrations of major acidic components (acetic acid, lactic acid, and succinic acid). The broth was collected in fractions and concentrations of each sample reported as bed volumes on the x-axis. (B) Elution curve of the major acidic components desorbed from the resin using methanol.

Crystallization of succinic acid. Table 3 below summarizes reported crystallization yields and purities from previous studies and our work. The separation approach that is reported in this work is distinct from the approaches summarized in Table 3 because succinic acid is eluted from the PVP resin using methanol. Thus, the crystallization of succinic acid occurs in a methanol solvent rather than water. The benefit of using methanol as a crystallization solvent is two-fold: (1) methanol can be cooled to temperatures lower than that of water before freezing, allowing succinic acid crystals to be driven out of solution in very high yields, and (2) methanol requires less energy to evaporate than water, thus, improving the energy efficiency of an evaporative crystallization operation.

Accordingly, 1.5 L of wet methanol eluent from the PVP resin containing ~22 g/L of succinic acid in methanol and ~10 wt.% water was evaporated to its saturation point where small crystals began to form on the flask (~180 g/L)⁹. The flask was then warmed slightly (~25–30°C) to fully solubilize the succinic acid. Succinic acid was then recovered through crystallization by submerging the flask in a -40°C cold bath of acetonitrile and dry ice for 4 hours.

The crystals were recovered via vacuum filtration and dried for 12 hours in a vacuum oven (Figure S5). On a dry mass basis, this crystallization procedure achieved a 91% yield of succinic acid from the methanol solution and the purity was determined via differential scanning calorimetry (DSC) to be 99.93%. To our knowledge, these are the highest crystallization yields and purities obtained compared to other reported crystallization methods (Table 3).

In addition to the high yields and purities, this approach is more energy efficient than a crystallization operation that occurs in water. In the above procedure, 1.32 L of methanol was evaporated to generate the crystallization solution. Using the heat capacity and latent heat of vaporization of methanol this requires 1,321 kJ of energy. In comparison, if the aqueous acidified solution from Step 3 (Figure 1) was evaporatively crystallized, it would require ~2,592 kJ of energy. Thus, the non-thermal dewatering step accomplished using the PVP resin allow for high yields and purities on a single pass crystallization and requires ~50% less energy compared to crystallization in the aqueous solution from Step 3 (Figure 1).

Table 3: Succinic acid crystallization methods reported in the literature compared to the method reported in this work. Here, activated carbon loadings used are listed along with crystallization yields and purities achieved. A brief description of the process used in each reference is also given for comparison.

Substrate	A.C.* loading (w/v%)	Crystallization yield	Purity	Method	Reference
Hydrolysate	3.0%	91%	99.93%	Filtration > cation EX > AC > PVP > crystallization	This work

1						
2						
3						
4	Glucose	12.5%	89.5%	99.0%	Filtration > AC > cation EX > crystallization	9
5	Glucose	N/A	86.53%	99.18%	H ₂ SO ₄ acidification > Microfiltration > Nanofiltration > crystallization	10
6						
7	Glucose	10.0%	85.4%	96.7%	Salting out extraction > filtration > AC > vacuum distillation > crystallization	11
8						
9	Glucose	N/A	77.0%	99.9%	Filtration > electro dialysis > crystallization	20
10						
11	Glucose	N/A	73.1%	99.8%	Liquid-liquid extraction of byproduct acids > HCl acidification > crystallization	21
12						
13	Glucose	20.0%	70.0%	90.0%	Filtration > AC > calcium succinate precipitation > ion exchange > crystallization	22
14						
15	Hydrolysate	12.5%	45.0%	28.0%	Filtration > AC > HCl acidification > crystallization	23
16						
17						
18	*AC = activated carbon					

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Lastly, it is critically important that the activated carbon loading used for color removal is held to a minimum to maintain a high overall broth to product yield. As discussed above, at an activated carbon treatment of 7 w/v% approximately 31% of the succinic acid product is lost to adsorption on the carbon (Figure S2). In the succinic acid recovery procedure demonstrated here, a 3 w/v% activated carbon treatment was used, losing 11% of the initial product to adsorption on the carbon. Couple this loss with the 91% crystallization yield in methanol, demonstrated above, and the overall broth to product yield for succinic acid recovery from our procedure is 81%. Reports in the literature for succinic acid recovery generally do not list an overall broth-to-product yield, but rather report a crystallization yield only (Table 3), making it difficult to compare overall yields. The exception is Reference ²¹, which reports an overall broth to product yield of 65%. Interestingly, Reference ²¹ also finds a succinic acid recovery of 97.53% during a 10 w/v% treatment of activated carbon. This is drastically higher than the < 70% recovery predicted from the results of this work shown in Figure S2A. The much higher recovery of succinic acid during activated carbon treatment found in Reference ²¹ is likely due to the activated carbon treatment occurring in the organic extractant (acetone and ammonium sulfate) instead of water. In this solution, the affinity for succinic acid to the carbon appears much lower than when activated carbon treatment occurs in water. In all other studies reported in Table 3 activated carbon treatment occurs in aqueous solutions. Thus, using the reported activated carbon loadings listed in those studies (Table 3) the lowest activated carbon loading used appears to be 10 w/v%. Even at this loading, in water, well over 31% of the succinic acid product would be lost to carbon adsorption (Figure S2A) and, accordingly one can expect overall broth-to-product yields from those previous studies in Table 3 to be much less than 70%. Thus, the results of this study and those in

Table 3 highlight the importance in the order of operations for maintaining high broth to product yields. Namely, the use of cation exchange first before activated carbon treatment in order to lower the amount of activated carbon needed for color removal.

Recovery of propionic acid through distillation. 4 L of cation exchanged and activated carbon-treated propionic acid broth was loaded onto PVP resin and eluted off with acetone as described above. Acetone was removed from the eluent via rotoevaporation which left an 844 g solution composed of 14% propionic acid, 4% acetic acid, 6% acetone, and 77% water. The propionic acid was recovered with a 91% yield from this PVP desorption step. The significant amount of water remaining is the result of incomplete dewatering.²⁴ It is likely that water trapped in the pores of the resin was released into the acetone during elution. Complete removal of the water is necessary before distillation to avoid azeotrope formation with the propionic acid²⁵ that would ultimately prevent recovery of pure propionic acid. Thus, to remove the remaining water, an extraction using 1.4 L of dichloromethane (DCM) was performed. After extraction, the DCM phase was decanted and evaporated leaving a 105 g solution containing 75% propionic acid, 9% acetic acid, 9% water, and 8% unidentified (likely acetone, see below). To remove the remaining water, 10 g of drying salts (Na₂SO₄) were added to the solution and removed via vacuum filtration. These incomplete dewatering during PVP elution is an unfortunate reality when using batch column chromatography at these bench scales. The further drying steps described above likely would not be needed with continuous processing equipment discussed below. The dried solution was then distilled using a spinning band system with 30 theoretical stages.

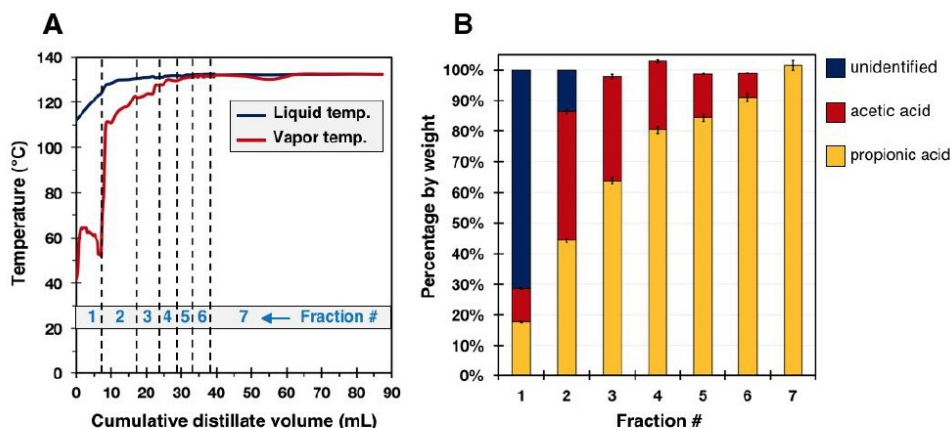


Fig. 4: (A) Vapor and liquid temperature as a function of the cumulative distillate volume collected during distillation of the dried 87 mL propionic acid eluent. The fractions collected are labeled numerically towards to bottom of the graph. The volume of each fraction is denoted between the dashed vertical lines. (B) Percent composition of each fraction determined by liquid chromatography (LC).

The vapor and liquid temperature traces during distillation are displayed in Figure 4A as a function of the cumulative distillate volume collected and dashed lines in Fig. 4A represent the fractions collected. Fig. 4B displays the percent composition of the collected fractions. In fraction 1, approximately 70% of the mass of fraction #1 is unidentified. However, this is likely acetone given that the average vapor temperature of fraction 1 is 58°C which is close to the boiling point of acetone (56°C). Subsequent fractions 2 through 6 contain a mixture of acetic acid and propionic acid, which is expected from a batch distillation process. Fraction 7 contains pure propionic acid. After distillation, fractions 4 through 7 were combined resulting in a 98% pure propionic acid solution with a propionic acid distillation yield of 80%.

The overall broth-to-product yield from this procedure is 59%. Specifically, 94% of the original propionic acid was recovered during the activated carbon treatment, 90% was recovered during the PVP adsorption and elution process, 87% was recovered after the extraction and drying steps, and 80% was recovered from the dewatered solution during the distillation operation.

In the literature, the method that is often reported for propionic/acetic acid separation from fermentation broth is liquid-liquid extraction of the two acids into an organic phase containing a high molecular weight amine (e.g. trioctylamine) solved in a hydrophobic alcohol (e.g. oleyl alcohol).²⁶ The carboxylic acids are extracted into the organic phase through the formation of an ion pair with the amine.²⁷ After extraction, acetic and propionic acid can be recovered by thermally breaking the ion-pair in the organic phase via distillation. However, distillation of the organic phase yields a mixture of propionic acid, acetic acid, and some co-extracted water.²⁸ The subsequent separation of these two compounds to recover neat propionic acid is a

difficult separation to achieve and in the instances reported in the literature propionic acid is not recovered as a neat product. Thus, the yield and purity have not, to our knowledge, been reported before and this prevents comparison to the yields and purities that we report in this manuscript.

DISCUSSION

The procedure described above yields excellent bench-scale recovery yields and purity for the target carboxylic acids from fermentation broth, including with non-target minor acids from heterofermentative carboxylate mixtures, and highlights the importance of the order of operations for achieving high broth to product yields. Here we further provide a discussion of how to scale and improve these methods to continuous operations for industrial scale application. In general, the five-step procedure outlined in Fig. 1 remains the same, however specialized equipment is needed to complete each operation at scale.⁸

The first step where cell and particulates are removed is commonly achieved using tangential flow filtration with ceramic membranes²⁹ or by using rotating disc ceramic membranes³⁰ with pore sizes below 0.2 μm . Rotating systems increase broth throughput by decreasing filter fouling potential compared to the commonly used static filters used at the bench scale. Furthermore, ceramic membranes have several operational advantages. For example, ceramic membranes are more hydrophilic than polymer membranes, leading to less irreversible fouling, the excellent chemical resistance of ceramic membranes enables low pH operation, and the use of harsher cleaning methods to restore the initial flux of the membrane. These advantages lead to a longer membrane lifetime and less downtime.³¹

1
2
3 The second step, is the acidification of the broth to a pH
4 below the pKa of the target carboxylic acid. Recent work
5 has shown this step is the most costly operation in the
6 downstream separation of bio-acids.³² As such, some
7 industrial bio-acid processes are trending towards
8 development of microbes that operate in low pH
9 environments (e.g., for lactic acid³³ and succinic acid³⁴).
10 In these low pH fermentations, the salt breaking step is not
11 needed in the downstream recovery operations. However,
12 most fermentations and most laboratory level
13 fermentations still occur at a pH above the pKa of the target
14 acid and a salt breaking step is required.^{35, 36} In the instance
15 when a salt breaking step is required at scale, cation
16 exchange is performed in continuous countercurrent cation
17 exchange system.³⁷

18 Color removal via activated carbon in step three, is a
19 problematic step to implement at the industrial scale. As
20 discussed above, the use of activated carbon results in
21 significant product loss from adsorption. To that end, in
22 this work we demonstrated the importance of cation
23 exchange first before activated carbon treatment to utilize
24 the color removal capacity of the resin and allow lower
25 loadings of activated carbon to be used. Here physical
26 adsorption of the color body to the hydrophobic polymer
27 backbone of the resin is likely the mechanism for color
28 removal.³⁸ During regeneration of the resin with 10 wt.%
29 sulfuric acid the color bodies are washed off. In this work,
30 the same 600 g of resin was regenerated twenty times to
31 process the total 20 L of fermentation broth. We observed
32 no loss in performance throughout these regeneration
33 cycles.

34 Still, the 3 w/v% loading of activated carbon used in this
35 study resulted in a 11% loss of succinic acid and a 6% loss of
36 propionic acid during workup of the respective broths. This
37 renders the use of activated carbon as a color removal
38 option difficult to justify for industrial production.
39 Therefore, alternative decoloring methods that do not
40 result in product loss must be considered. Some alternative
41 methods include the use of anion exchange resins³⁹ as a
42 decoloring step before cation exchange, the pH swing
43 precipitation followed by bleaching described by Fruchey⁴⁰
44 could also be higher yielding than activated carbon, and the
45 use of ultra and nanofiltration⁴¹ also appears promising.
46 Studies are clearly needed in this area that focus on the
47 yield and effectiveness of alternative decoloring methods
48 compared to activated carbon.

49 Regarding the fourth step, dewatering using PVP
50 adsorption and elution (Step 4, Fig. 1) can be automated for
51 large scale processing using a Simulated Moving Bed
52 (SMB).⁴² However, modifications must be made to achieve
53 complete dewatering before elution occurs. For example, a
54 wash step of the resin bed using a hydrophobic liquid (e.g.
55 petroleum ether) could be used before the alcohol elution
56 to flush water out of the void volume in the resin bed. The
57 benefits of complete dewatering using an SMB with an
58 incorporated wash step to remove water are substantial. In
59 the case of this work, if complete dewatering was achieved
60 with PVP for the propionic acid broth the subsequent DCM

extraction and drying salts would not be required. This
would result in the overall broth to product yield increasing
from 59% to 70%. Furthermore, recent work has shown
that the methanol eluent can be recovered from a SMB
operation using < 1% of the heating value of the carboxylic
acid.⁴³

Beyond post cultivation separations operations, In-Situ
Product Recovery (ISPR) schemes may offer the next
generation technology to significantly lower separations
costs and time, while increasing fermentation titers,
productivities and yields.⁴⁴⁻⁵² These separation technologies
are a form of process intensification wherein the
extracellular product is separated *in situ* as it is produced
in the fermentation broth. This ameliorates end product
inhibition to the culture allowing for greater productivities
and titers in smaller fermentation volumes compared to a
batch process. However, these methods are more complex
to integrate at the bench scale, but their benefits highlight
the importance of process intensification by combining
separations operations directly with the bioprocess. As
separations technology continues to advance ISPR will
likely see more use in lieu of multi-step post cultivation
operations for the production of bioproducts.

CONCLUSION

In this work, a method for separation of carboxylic acids
from fermentation broth is detailed that contains a
sequence of five steps. This method was applied to separate
succinic acid and propionic acid from their respective
broths. Overall broth to product yields were 81% for
succinic acid and 59% for propionic acid and the
importance of cation exchange first before activated carbon
treatment is detailed as a means to lower the required
amount of activated carbon needed and limit yield losses to
carbon adsorption. For succinic acid, a single pass
crystallization yield of 91% with a product purity of 99.93%
was achieved. To our knowledge these are the highest
yields and purities reported for the separation of succinic
acid from fermentation broth. For propionic acid,
distillation yields were 80% resulting in a product purity of
98%. The simplicity of this method presents itself well as a
method for researchers to recover carboxylic acids from
fermentation broths for bench-scale laboratory testing.
However, clear opportunities exist for development of
alternative decoloring methods to activated carbon that are
higher yielding and for improving the dewatering efficiency
of PVP columns.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting information

Contains additional figures and tables referenced in the
above text.

AUTHOR INFORMATION

corresponding Author

*E-mail: eric.karp@nrel.gov

Tel: 303-384-7997

Present Addresses

§ R.M.C.: Department of Chemistry
Colorado State University, Fort Collins, CO, 80523

C.T.N.: Department of Chemical Engineering
Purdue University, West Lafayette, IN, 47907

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

his work was authored by Alliance for Sustainable Energy, LLC, the manager and operator of the National Renewable Energy Laboratory for the U.S. Department of Energy (DOE) under Contract No. DE-AC36-08GO28308. The research reported in this paper was sponsored by the U.S. Department of Energy (DOE) Energy Efficiency and Renewable Energy (EERE) Bioenergy Technologies Office (BETO). The work was partially supported under the BETO Bioprocessing Separations Consortium via Contract No. DE-AC36-08GO28308 with the National Renewable Energy Laboratory. The succinic acid fermentation experiments were funded by DOE-EERE-BETO via Contract No. DE-AC36-08GO28308. Work on propionic acid was funded via the Renewable Carbon Fiber Consortium project under grant number DE-FOA-0000996. We also thank Steve Deutch for helpful discussions regarding ion exchange. The views expressed in the article do not necessarily represent the views of the DOE or the U.S. Government. The U.S. Government retains and the publisher, by accepting the article for publication, acknowledges that the U.S. Government retains a nonexclusive, paid-up, irrevocable, worldwide license to publish or reproduce the published form of this work, or allow others to do so, for U.S. Government purposes.

REFERENCES

- Karp, E. M.; Eaton, T. R.; Sánchez i Nogué, V.; Vorotnikov, V.; Bidy, M. J.; Tan, E. C. D.; Brandner, D. G.; Cywar, R. M.; Liu, R.; Manker, L. P.; Michener, W. E.; Gilhespy, M.; Skoufa, Z.; Watson, M. J.; Fruchey, O. S.; Vardon, D. R.; Gill, R. T.; Bratis, A. D.; Beckham, G. T., Renewable acrylonitrile production. *Science* **2017**, *358* (6368), 1307, DOI 10.1126/science.aan1059
- Nikolau, B. J.; Perera, M. A. D. N.; Brachova, L.; Shanks, B., Platform biochemicals for a biorenewable chemical industry. *The Plant Journal* **2008**, *54* (4), 536-545, DOI 10.1111/j.1365-3113X.2008.03484.x
- Schwartz, T. J.; O'Neill, B. J.; Shanks, B. H.; Dumesic, J. A., Bridging the Chemical and Biological Catalysis Gap: Challenges and Outlooks for Producing Sustainable Chemicals. *ACS Catal.* **2014**, *4* (6), 2060-2069, DOI 10.1021/cs500364y
- Schwartz, T. J.; Shanks, B. H.; Dumesic, J. A., Coupling chemical and biological catalysis: a flexible paradigm for producing biobased chemicals. *Current Opinion in Biotechnology* **2016**, *38*, 54-62, DOI 10.1016/j.copbio.2015.12.017
- Shanks, B. H., Unleashing Biocatalysis/Chemical Catalysis Synergies for Efficient Biomass Conversion. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2* (8), 533-535, DOI 10.1021/cb7001522
- Vennestrøm, P. N. R.; Christensen, C. H.; Pedersen, S.; Grunwaldt, J.-D.; Woodley, J. M., Next-Generation Catalysis for Renewables: Combining Enzymatic with Inorganic Heterogeneous Catalysis for Bulk Chemical Production. *ChemCatChem* **2010**, *2* (3), 249-258, DOI 10.1002/cctc.200900248
- Straathof, A. J. J., 2.57 - The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes A2 - Moo-Young, Murray. In *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press: Burlington, 2011; pp 811-814.
- López-Garzón, C. S.; Straathof, A. J. J., Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnology Advances* **2014**, *32* (5), 873-904, DOI 10.1016/j.biotechadv.2014.04.002
- Lin, S. K. C.; Du, C.; Blaga, A. C.; Camarut, M.; Webb, C.; Stevens, C. V.; Soetaert, W., Novel resin-based vacuum distillation-crystallisation method for recovery of succinic acid crystals from fermentation broths. *Green Chem.* **2010**, *12* (4), 666-671, DOI 10.1039/B913021G



Back extraction of propionic acid from loaded organic phase

Amit Keshav^a, Kailas L. Wasewar^{b,*}

^a Department of Chemical Engineering, National Institute of Technology (NIT) Raipur, Chhattisgarh 492010, India

^b Department of Chemical Engineering, Visvesvaraya National Institute of Technology (VNIT), Nagpur 440010, Maharashtra, India

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2009

Received in revised form

21 December 2009

Accepted 13 January 2010

Available online 20 January 2010

Keywords:

Propionic acid
Reactive extraction
Back extraction
Tri-*n*-octyl amine
Trimethyl amine
Kinetics

ABSTRACT

Study of back extraction and hence regeneration of the acid from the loaded organic phase is essential for the design of a complete reactive extraction process. In this paper, the backextraction of propionic acid from the loaded organic phase (tri-*n*-octylamine (TOA)+diluent) was studied using different techniques, like, temperature and diluent swing, using NaOH or trimethyl amine. It was found that temperature swing regeneration could result in recovery as high as 88% of acid in two stages from organic phase, TOA+MIBK. However, from TOA+alcohols, the recovery by this technique was average. Diluent swing is not successful in efficiently recovering acid from the organic phases employed. NaOH, in stoichiometric ratio, could completely recover the acid, but in the form of sodium propionate. The 100% acid recovery was accomplished using trimethylamine (TMA), when used in stoichiometric ratio slightly higher than (1:1). Along with the complete recovery acid can be easily separated from TMA as the base is volatile. Kinetics of backextraction of propionic acid using TMA was also studied and it was found to be fast.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Propionic acid is widely used in processes, such as, in the production of cellulose plastics; in the manufacture of ester solvents, perfume bases; in food industries to suppress the growth of mould and rope in breads and cakes; for the manufacture of arthritic drugs, herbicides, plasticizers and as mould preventives in silage and hay (Playne, 1985). Isolation of propionic acid from dilute waste streams and fermentation broths is an economic problem. The high solubility in water, renders traditional solvents such as alcohols, ethers, esters and inert diluents (hexane, *n*-heptane) etc., to be successfully employed for acid extraction. The conventional method (calcium hydroxide precipitation), includes addition of calcium hydroxide to form calcium salt of propionic acid, to which sulphuric acid is added to liberate free propionic acid (King and Tamada, 1990). This method of recovery is expensive and unfriendly to environment, as it consumes a lot of lime and sulfuric acid, and also generates calcium sulphate sludge as solid waste.

Reactive extraction, using organophosphorous compounds, tertiary and quaternary amine etc., is a successful technique for the recovery of acid from dilute aqueous solutions. Out of the above extractants, tertiary amines have proved to be most successful in recovery of carboxylic acids from dilute solutions

(Keshav et al., 2008a–f; Uslu and İnci, 2007; Wasewar and Pangarkar, 2006).

Various aspects of reactive extraction, such as, influence of type of extractant, acid concentrations, nature of the acid and diluent, effect of extraction temperature, water co-extraction and non idealities in both phases, were studied in literature. For the complete design of reactive extraction process, it is essential to study both the forward and backward steps. Extensive work on the extraction of propionic acid using reactive extraction technique was done by the authors; yet, very few literature and effort have been made on the backextraction of propionic acid from the loaded organic phases obtained in the first step.

Gu et al. (1998) studied reactive extraction of propionic acid using Alamine 304-1 in 2-octanol, 1-dodecanol and Witcohol 85 NF as diluents at various amine concentrations (0–100%) and found extraction to be maximum at the amine concentration between 20% and 40%. Regeneration of acid from loaded organic phase by distillation was also studied. For the understanding of equilibrium characteristics and to search an efficient recovery system for reactive extraction of propionic acid, tri-*n*-butyl phosphate (TBP) in eight different diluents (1-dodecanol, benzene, toluene, heptane, hexane, butyl acetate, petroleum ether, and paraffin liquid) (Keshav et al., 2008b), tri-*n*-octylphosphine oxide (TOPO) in hexane (Keshav et al., 2008c), tri-*n*-octyl amine (TOA) in different diluents (*n*-heptane, petroleum ether, ethyl acetate and oleyl alcohol) (Keshav et al., 2008d), TBP, TOA and Aliquat 336 in 1-octanol (Keshav et al., 2008a), TBP, TOA and Aliquat 336 and their mixed binary solutions in sunflower oil (Keshav et al., 2008e), Aliquat 336 in oleyl alcohol (Keshav et al., 2008f), were employed. Equilibrium parameters, such as, distribution coefficients, loading ratio, degree

* Corresponding author. Tel.: +91 712 2801561.

E-mail addresses: amitkeshav2000@yahoo.co.in (A. Keshav), k_wasewar@rediffmail.com (K.L. Wasewar).

of extraction and equilibrium complexation constants were obtained. All these studies confirm that TOA is a better extractant and in particular, with methyl-iso-butylketone (MIBK) and in alcohols as diluents, the efficiency of the TOA, as an extractant, has been markedly improved.

Results of authors work suggest that tri-*n*-octylamine is the best extractant in the forward step of reactive extraction, i.e., the recovery of acid from aqueous phase. Regeneration of acid from the loaded organic phase involves reversal of the reaction, to recover the acid as a product phase and the acid free extractant for recycle. The acid can be back extracted from loaded organic phase using various regeneration techniques. In present paper, techniques such as, using NaOH or trimethyl amine (TMA) and by temperature and diluent swing were used for the regeneration of acid from the loaded organic phase. Comparison among the various methods was made and it was found that TMA is the best backextractant for regeneration of the acid. In order to prove that the process is successful on the commercial scale, kinetics of the process was also studied and it was found that the kinetics is fast enough.

2. Theory

There are various methods available for the regeneration of the carboxylic acid from the loaded organic phase.

- (a) *Using NaOH*: In this method of backextraction, the loaded organic phase was contacted with sodium hydroxide solution. This method was suggested by Yabannavar and Wang (1991a) who employed it for the back extraction of lactic acid from a loaded organic phase (lactic acid+Alamine 336+oleyl alcohol).
- (b) *Using HCl*: This method was also suggested by Yabannavar and Wang (1991b). Concentrated HCl was used to essentially displace the lactic acid from the loaded organic phase (lactic acid+Alamine 336+oleyl alcohol). It was possible to regenerate the solvent by distilling diluent in the dispersed organic phase.
- (c) *Temperature-swing regeneration*: In this scheme, the extraction has been carried out at relatively low temperature, producing an acid-loaded organic extract and an aqueous raffinate waste stream containing the unwanted feed components (Tamada and King, 1990). During regeneration, the extract was contacted with a fresh aqueous stream at a higher temperature to produce an acid-laden aqueous product stream and an acid-free organic phase. The concentration of the acid achievable in this stream depends on the amount of change in the extraction equilibrium between temperatures and can be higher than that in the original aqueous feed stream (Tamada and King, 1990).
- (d) *Using trimethyl amine (TMA)*: Poole and King (1991) investigated the regeneration of lactic acid extracted in the organic phase using a stronger volatile amine in aqueous phase. The most obvious water-soluble, volatile base is ammonia. However, ammonia and both primary and secondary amines form amides when they are heated in mixtures with carboxylic acids (Mitchell and Reid, 1931; Poole and King, 1991; Streitwieser and Heathcock, 1976). The amides are sufficiently stable so it is difficult to reverse the process and recover the amine.
- (e) *Diluent swing regeneration*: This is based on a shift of the equilibrium distribution of acid from the aqueous phase to the organic phase between forward and back extraction, caused by a change in composition of the diluent with which the extractant is mixed. This diluent composition swing facilitates back extraction of acid into an aqueous product phase. The composition of the acid-laden organic phase leaving the extractor is altered, by either removal of the diluent or addition of another diluent, to produce a solvent system that

promotes distribution of the acid to the aqueous phase. The altered organic phase is contacted with a fresh aqueous stream in the regenerator to produce the acid-laden aqueous product and the acid-free solvent for recycle to the extractor (Tamada and King, 1989). Adjustment of the diluent composition can also occur before this solvent reenters the extractor.

3. Materials and methods

3.1. Materials

TOA (C₂₄H₅₁N) (98%, ACROS, India), a tertiary amine was used as extractant. Propionic acid (CH₃CH₂COOH; 99% purity; molar mass 74.08; density 992 kg/m³; Himedia, India) and diluents: MIBK, 1-decanol, and 2-octanol were employed for the study. Double distilled water was used to prepare the solutions of various concentrations of propionic acid. Sodium hydroxide (Ranbaxy India Ltd.), trimethyl amine (TMA; C₃H₉N, molar mass 59.11, assay 30% in water) and diluents hexane, petroleum ether and toluene were used as back-extraction reagents. Mobile phase for HPLC was composed of ammonium dihydrogen phosphate (RFCL India Ltd.) solution in millipore water (RFCL India Ltd.). Orthophosphoric acid (Ranbaxy India Ltd.) was used for pH adjustment of mobile phase of HPLC.

3.2. Methods

Back extraction by temperature swing involved shaking of equal volumes (20 ml) of loaded organic phase and water phases for 12 h at 363 K in a water bath, followed by settling of the mixture for at least 2 h at a same temperature. In diluent swing, the loaded organic phase was first contacted with another diluent and then with water for 12 h at 305 K. The aqueous phases, after the settling period of 2 h, were titrated with NaOH solution to determine the acid transferred. Backextraction by NaOH and TMA were carried out by equilibrating known volumes (50 ml each) of aqueous phase (different concentrations of TMA) and propionic acid loaded organic phase of known concentration in a temperature-controlled shaker bath (305 K) for 24 h. The two phases were allowed to settle for 24 h in a separating vessel for complete phase separation. Aqueous phase acid concentration was determined by a high-pressure liquid chromatography (HPLC) system (Waters 1523) consisting of a binary pump, refractive index detector (Waters 2414) and dual λ absorbance detector (Waters 2487). The sample was eluted by 0.1 kmol/m³ aqueous ammonium dihydrogen phosphate solution adjusted to pH 2.2 by an aqueous phosphoric acid solution ending at a rate of 0.0021/min in a reverse phase C-18 column (4 mm i.d. \times 150 mm in length). Propionic acid was detected at 236 nm. The acid content in the organic phase was determined by a mass balance. Few experiments were carried out in duplicate and consistency was found within $\pm 2\%$.

Kinetics experiments were carried out in 0.06516 m internal diameter glass stirred cell with an effective interfacial area of 0.003333 m². The vessel was equipped with a stainless steel dual four flat blade stirrer (diameter=0.048 m). Known volumes of loaded organic solvent and TMA (aqueous phase) (100 ml each) were taken and regeneration was carried out for a definite period at $T=305$ K. Samples of aqueous phase were taken out at different time intervals for analysis till it reaches equilibrium. It was found that the equilibrium is established within 30 min. Aqueous phase acid concentration was determined by HPLC. The acid content in the organic phase was determined by mass balance. Few experiments were repeated to check the consistency in the results. The variation was found within $\pm 2\%$.

of extraction and equilibrium complexation constants were obtained. All these studies confirm that TOA is a better extractant and in particular, with methyl-iso-butylketone (MIBK) and in alcohols as diluents, the efficiency of the TOA, as an extractant, has been markedly improved.

Results of authors work suggest that tri-n-octylamine is the best extractant in the forward step of reactive extraction, i.e., the recovery of acid from aqueous phase. Regeneration of acid from the loaded organic phase involves reversal of the reaction, to recover the acid as a product phase and the acid free extractant for recycle. The acid can be back extracted from loaded organic phase using various regeneration techniques. In present paper, techniques such as, using NaOH or trimethyl amine (TMA) and by temperature and diluent swing were used for the regeneration of acid from the loaded organic phase. Comparison among the various methods was made and it was found that TMA is the best backextractant for regeneration of the acid. In order to prove that the process is successful on the commercial scale, kinetics of the process was also studied and it was found that the kinetics is fast enough.

2. Theory

There are various methods available for the regeneration of the carboxylic acid from the loaded organic phase.

- (a) *Using NaOH*: In this method of backextraction, the loaded organic phase was contacted with sodium hydroxide solution. This method was suggested by Yabannavar and Wang (1991a) who employed it for the back extraction of lactic acid from a loaded organic phase (lactic acid+Alamine 336+oleyl alcohol).
- (b) *Using HCl*: This method was also suggested by Yabannavar and Wang (1991b). Concentrated HCl was used to essentially displace the lactic acid from the loaded organic phase (lactic acid+Alamine 336+oleyl alcohol). It was possible to regenerate the solvent by distilling diluent in the dispersed organic phase.
- (c) *Temperature-swing regeneration*: In this scheme, the extraction has been carried out at relatively low temperature, producing an acid-loaded organic extract and an aqueous raffinate waste stream containing the unwanted feed components (Tamada and King, 1990). During regeneration, the extract was contacted with a fresh aqueous stream at a higher temperature to produce an acid-laden aqueous product stream and an acid-free organic phase. The concentration of the acid achievable in this stream depends on the amount of change in the extraction equilibrium between temperatures and can be higher than that in the original aqueous feed stream (Tamada and King, 1990).
- (d) *Using trimethyl amine (TMA)*: Poole and King (1991) investigated the regeneration of lactic acid extracted in the organic phase using a stronger volatile amine in aqueous phase. The most obvious water-soluble, volatile base is ammonia. However, ammonia and both primary and secondary amines form amides when they are heated in mixtures with carboxylic acids (Mitchell and Reid, 1931; Poole and King, 1991; Streitwieser and Heathcock, 1976). The amides are sufficiently stable so it is difficult to reverse the process and recover the amine.
- (e) *Diluent swing regeneration*: This is based on a shift of the equilibrium distribution of acid from the aqueous phase to the organic phase between forward and back extraction, caused by a change in composition of the diluent with which the extractant is mixed. This diluent composition swing facilitates back extraction of acid into an aqueous product phase. The composition of the acid-laden organic phase leaving the extractor is altered, by either removal of the diluent or addition of another diluent, to produce a solvent system that

promotes distribution of the acid to the aqueous phase. The altered organic phase is contacted with a fresh aqueous stream in the regenerator to produce the acid-laden aqueous product and the acid-free solvent for recycle to the extractor (Tamada and King, 1989). Adjustment of the diluent composition can also occur before this solvent reenters the extractor.

3. Materials and methods

3.1. Materials

TOA (C₂₄H₅₁N) (98%, ACROS, India), a tertiary amine was used as extractant. Propionic acid (CH₃CH₂COOH; 99% purity; molar mass 74.08; density 992 kg/m³; Himedia, India) and diluents: MIBK, 1-decanol, and 2-octanol were employed for the study. Double distilled water was used to prepare the solutions of various concentrations of propionic acid. Sodium hydroxide (Ranbaxy India Ltd.), trimethyl amine (TMA; C₃H₉N, molar mass 59.11, assay 30% in water) and diluents hexane, petroleum ether and toluene were used as back-extraction reagents. Mobile phase for HPLC was composed of ammonium dihydrogen phosphate (RFCL India Ltd.) solution in millipore water (RFCL India Ltd.). Orthophosphoric acid (Ranbaxy India Ltd.) was used for pH adjustment of mobile phase of HPLC.

3.2. Methods

Back extraction by temperature swing involved shaking of equal volumes (20 ml) of loaded organic phase and water phases for 12 h at 363 K in a water bath, followed by settling of the mixture for at least 2 h at a same temperature. In diluent swing, the loaded organic phase was first contacted with another diluent and then with water for 12 h at 305 K. The aqueous phases, after the settling period of 2 h, were titrated with NaOH solution to determine the acid transferred. Backextraction by NaOH and TMA were carried out by equilibrating known volumes (50 ml each) of aqueous phase (different concentrations of TMA) and propionic acid loaded organic phase of known concentration in a temperature-controlled shaker bath (305 K) for 24 h. The two phases were allowed to settle for 24 h in a separating vessel for complete phase separation. Aqueous phase acid concentration was determined by a high-pressure liquid chromatography (HPLC) system (Waters 1523) consisting of a binary pump, refractive index detector (Waters 2414) and dual λ absorbance detector (Waters 2487). The sample was eluted by 0.1 kmol/m³ aqueous ammonium dihydrogen phosphate solution adjusted to pH 2.2 by an aqueous phosphoric acid solution ending at a rate of 0.0021/min in a reverse phase C-18 column (4 mm i.d. \times 150 mm in length). Propionic acid was detected at 236 nm. The acid content in the organic phase was determined by a mass balance. Few experiments were carried out in duplicate and consistency was found within $\pm 2\%$.

Kinetics experiments were carried out in 0.06516 m internal diameter glass stirred cell with an effective interfacial area of 0.003333 m². The vessel was equipped with a stainless steel dual four flat blade stirrer (diameter=0.048 m). Known volumes of loaded organic solvent and TMA (aqueous phase) (100 ml each) were taken and regeneration was carried out for a definite period at T=305 K. Samples of aqueous phase were taken out at different time intervals for analysis till it reaches equilibrium. It was found that the equilibrium is established within 30 min. Aqueous phase acid concentration was determined by HPLC. The acid content in the organic phase was determined by mass balance. Few experiments were repeated to check the consistency in the results. The variation was found within $\pm 2\%$.

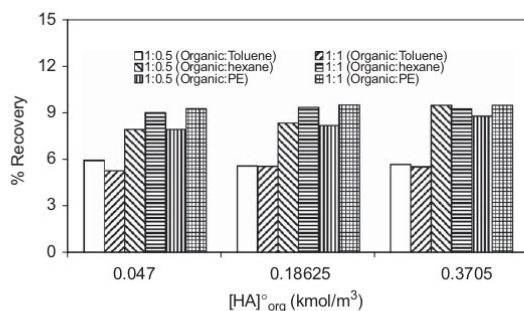


Fig. 4. Recovery of propionic acid from loaded organic phase of TOA+2-octanol by diluent swing regeneration scheme: □ 1:0.5 (Organic:Toluene); ▨ 1:1 (Organic:Toluene); ▩ 1:0.5 (Organic:hexane); ▧ 1:1 (Organic:hexane); ▦ 1:0.5 (Organic:PE); ▤ 1:1 (Organic:PE).

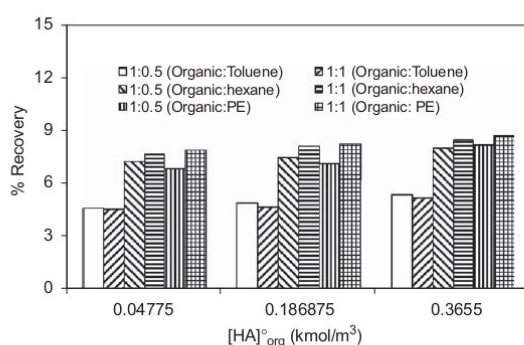


Fig. 5. Recovery of propionic acid from loaded organic phase of TOA+1-decanol by diluent swing regeneration scheme: □ 1:0.5 (Organic:Toluene); ▨ 1:1 (Organic:Toluene); ▩ 1:0.5 (Organic:hexane); ▧ 1:1 (Organic:hexane); ▦ 1:0.5 (Organic:PE); ▤ 1:1 (Organic:PE).

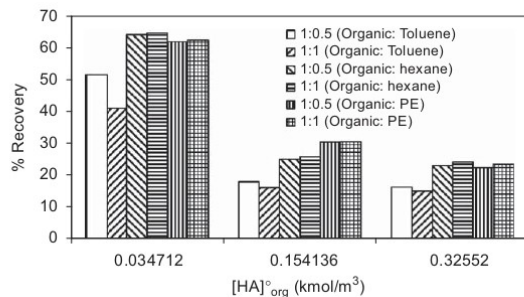


Fig. 6. Recovery of propionic acid from loaded organic phase of TOA+MIBK by diluent swing regeneration scheme: □ 1:0.5 (Organic:Toluene); ▨ 1:1 (Organic:Toluene); ▩ 1:0.5 (Organic:hexane); ▧ 1:1 (Organic:hexane); ▦ 1:0.5 (Organic:PE); ▤ 1:1 (Organic:PE).

regeneration scheme. Here, again, the regeneration scheme was better for system TOA+MIBK, however, the results were lower than the temperature swing regeneration scheme. Further, this process has the disadvantage of diluting the extract stream and requiring distillation of large amounts of solvent (after the regeneration) to obtain the same shift in the active/inert diluent ratio. Another

conclusion that was made in regeneration of acid from loaded organic phase of TOA+MIBK was that at lower acid concentrations, the regeneration was higher than that at higher acid concentrations. The similar results were observed by Tamada and King (1990) who found that at low feed concentrations for the succinic acid-Alamine 336-chloroform-heptane case, diluent swing provides greater concentrating ability. %Recovery as high as 65% were found at lower acid concentrations in case of TOA in MIBK.

4.3. Using NaOH

Since the results of back-extraction from loaded organic phases of TOA in both the alcohols (1-decanol and 2-octanol) were nearly same, only 1-decanol was used in this study. Equal volumes of aqueous solutions consisting of various concentrations of NaOH (0.02–1.0 kmol/m³) were contacted with loaded organic phases of TOA+1-decanol and TOA+MIBK with initial acid concentration of 0.334 and 0.374 kmol/m³ propionic acid respectively. It was found that NaOH in molar ratio slightly higher than the molar ratio of acid in organic phase was able to recover 100% acid. Figs. 7 and 8 show the recovery against the ratio of [NaOH]/[HA]_{o,org} for recovery of acid from loaded organic phases of TOA+1-decanol and TOA+MIBK. It can be seen that 100% recovery of acid was obtained in both the case.

4.4. Using trimethylamine (TMA)

Equal volumes of aqueous solutions consisting of various concentration of TMA (0.05–0.31 kmol/m³) were contacted with loaded organic phases of TOA+1-decanol and TOA+MIBK, with initial acid concentration of 0.186 and 0.154 kmol/m³ propionic acid, respectively. It was found that TMA in molar ratio slightly higher than the acid in organic phase was able to recover 100% acid. Figs. 9 and 10 show the recovery against the ratio of TMA/[HA]_{o,org} for recovery of acid from loaded organic phases of TOA+1-decanol and TOA+MIBK. It can be seen that 100% recovery of acid was obtained in both the case.

5. Discussion of regeneration

Regeneration of propionic acid using HCl was not studied in the present text owing to that HCl is highly corrosive. Further, Yabannavar and Wang (1991b) suggested that the backextraction of the free acid from Alamine 336/oleyl alcohol solution with concentrated HCl, though result in fairly high recovery (83%), yet the emulsion formed during the backextraction was very stable.

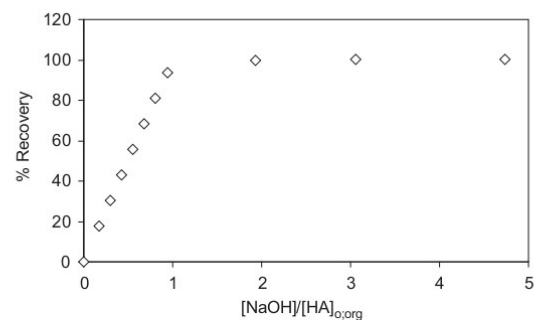


Fig. 7. Recovery of propionic acid from loaded organic phase of TOA+1-decanol using NaOH.

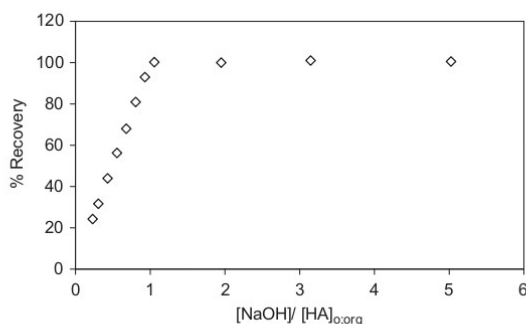


Fig. 8. Recovery of propionic acid from loaded organic phase of TOA+MIBK using NaOH.

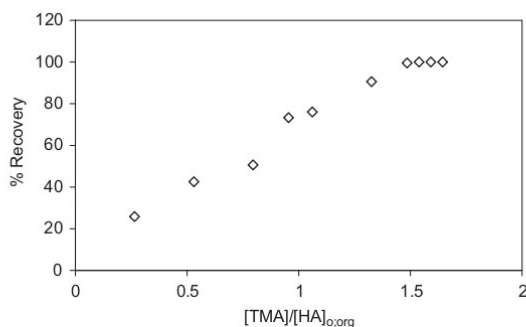


Fig. 9. Recovery of propionic acid from loaded organic phase of TOA+1-decanol using TMA.

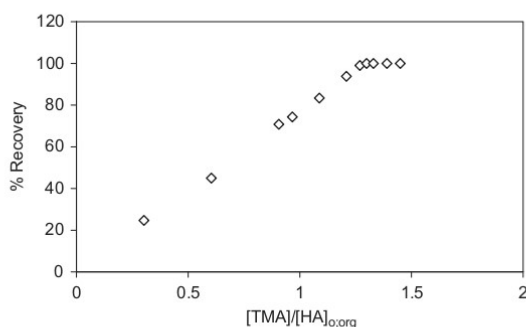


Fig. 10. Recovery of propionic acid from loaded organic phase of TOA+MIBK using TMA.

Back extraction of acid using NaOH resulted in 100% recovery and is simple and cheap. However, the acid is recovered as sodium propionate. Therefore, an appropriate acid (e.g., sulfuric acid) must be added to return it to the free acid form. This approach has the same drawbacks as the classical calcium precipitation process for direct recovery from the aqueous feed. Both sulfuric acid and NaOH are consumed, and a waste salt is formed, which requires disposal.

The advantage of regeneration technique using TMA is that it avoids consumption of chemicals and creation of salt byproduct. The aqueous base, which is volatile, enables thermal decomposi-

tion of the acid-base complex in the aqueous backextract. The decomposition forms carboxylic acid as a product and freebase as a vapor that can be reabsorbed in water and recycled for reuse in back-extraction. However, an important matter of concern is that the organic phase, which is recycled to the fermentor, may contain residual dissolved TMA, which can affect the bioactivity of the enzyme, if acid is to be recovered from the fermentation broth.

Diluent swing regeneration involving more than one diluent appears to be more complicated than the TMA approach, where an easily removable volatile amine (TMA) is the only externally introduced component. This process has the disadvantage of diluting the extract stream and requiring distillation of large amounts of solvent (after the regeneration) to obtain the same shift in the active/inert diluent ratio.

Temperature swing regeneration process is not successful for the regeneration of acid from loaded organic phases of TOA+alcohols. However, it can be seen that if MIBK was used as diluent the technique is successful. The only matter of concern in this case is that, the temperature is to be raised to high degree for the regeneration of the acid. This may be detrimental for some of the carboxylic acid whose structure may get modified owing to heat.

Among all the methods studied for the regeneration of acid from the loaded organic phases, it can be seen that backextraction using TMA is a clean and efficient. Thus using TMA was suggested as the best backextraction system. In order to successfully use this regeneration scheme for the acid recovery, it is required to study the kinetics of regeneration. The desire was that the kinetics should be fast for efficient regeneration process.

6. Kinetics of regeneration of acid

Regeneration of acids from loaded organic phase using TMA involves reaction between TMA in aqueous phase with propionic acid in complexed form in the organic phase. Reaction regime could be found from the experimental results (Doraiswamy and Sharma, 1984). For discerning the controlling for irreversible reactions, stirred cell was employed. Overall extraction rate is determined by interfacial chemical kinetics and molecular diffusion of components towards and away from interface. The two resistances to transfer are by diffusion and chemical complexation which is function of mode of contact and transport properties of the components. The equilibrium complexation reaction is reversible in nature. However, to avoid problems due to reversibility only initial rate were considered for evaluation of the kinetics. Plot of concentration versus time were drawn to obtain the initial rate for various concentrations of acid and TMA respectively. Initial rate was obtained by regression analysis to find

$$\left. \frac{d[\text{HA}]_{\text{aq}}}{dt} \right|_{t=0}$$

This was divided by the total interfacial area (0.00333 m^2) and multiplied by volume of aqueous phase to obtain the specific rate of reaction (R_A ; $\text{kmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

$$R_A = \frac{V_{\text{org}}}{A} \left. \frac{d[\text{HA}]}{dt} \right|_{t=0} \quad (2)$$

Doraiswamy and Sharma (1984) classified mass transfer with reaction into four regimes. Procedure for discerning reaction mechanism using stirred cell was also stated. In order that the process of backextraction to be fast, it was stated that rate of reaction will depend on $(m+1)/2$ th and $n/2$ th power to the acid and TMA concentration (where m and n are order with respect to acid and TMA respectively). Further, there should be no effect of speed of agitation and volume phase ratio on the process.

Figs. 11 and 12 represent the plot of R_A against the organic phase acid concentration and initial TMA concentration, for regeneration of propionic acid from loaded organic phases of TOA+2-octanol, TOA+1-decanol and TOA+MIBK, respectively. In Fig. 12, loaded organic phase propionic acid concentration was varied from 0.075–0.342 kmol/m³ for TOA+MIBK, 0.0936–0.370 kmol/m³ for TOA+2-octanol and 0.0654–0.366 kmol/m³ for TOA+1-decanol. A regression analysis of the experimental data yield a straight line through origin with unit slope, indicating the reaction to be first order in propionic acid concentration for all the systems studied. To determine order with respect to TMA concentration, TMA was varied from 0.2 to 0.5 kmol/m³ in water for fixed acid concentrations of loaded organic phase obtained by contacting 0.2 kmol/m³ propionic acid by TOA in 2-octanol, 1-decanol and MIBK, respectively. As it can be seen from Fig. 12, there is no effect of TMA concentration on the rate of extraction from loaded organic phases from TOA+MIBK, whereas in loaded organic phase from TOA in 1-decanol and 2-octanol, it was 0.7th and 1.6th order with respect to TMA. To determine the regime in which the regeneration of propionic acid using TMA falls, conditions given by Doraiswamy and Sharma (1984) were checked. Fig. 13 show the effect of speed of stirring (50–80 rpm) on R_A for fixed acid concentration of loaded organic phase obtained by contacting 0.2 kmol/m³ propionic acid by TOA in 2-octanol, 1-decanol and MIBK, respectively and TMA concentration of 0.5 kmol/m³ in water. In the entire speed range, the liquid–liquid interface was flat and thus interfacial area could be assumed equal to the geometrical area. R_A was found to be independent of speed of stirring. Effect of phase volume ratio on R_A was also presented

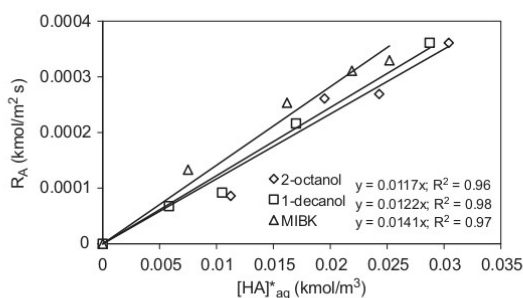


Fig. 11. Effect of propionic acid concentration in aqueous phase on specific rate of extraction for regeneration of propionic acid from different loaded organic phases (TMA concentration=0.5 kmol/m³; speed of agitation=80 rpm): \diamond —2-octanol; \square —1-decanol; \triangle —MIBK.

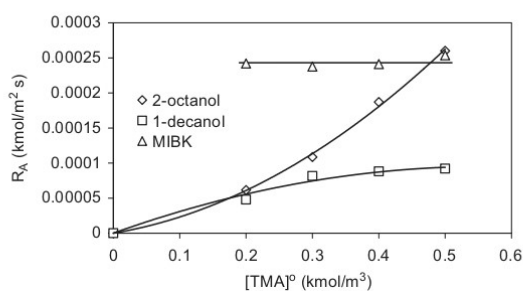


Fig. 12. Effect of TMA concentration on specific rate of extraction for regeneration of propionic acid from different loaded organic phases: \diamond —2-octanol; \square —1-decanol; \triangle —MIBK.

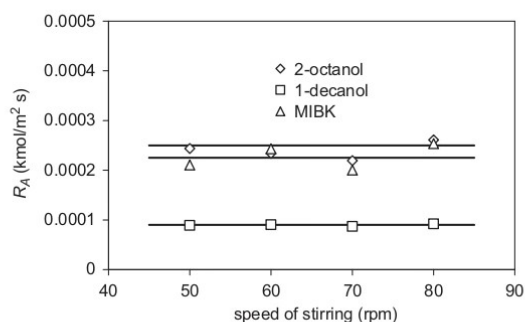


Fig. 13. Effect of speed of stirring on specific rate of extraction for regeneration of propionic acid from different loaded organic phases: \diamond —2-octanol; \square —1-decanol; \triangle —MIBK.

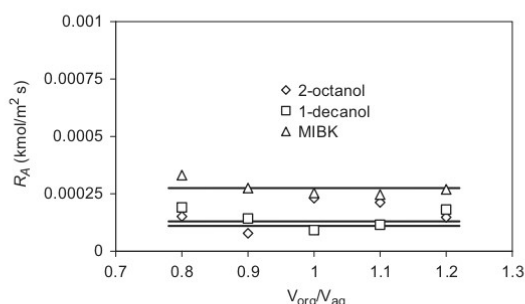


Fig. 14. Effect of volume phase ratios on specific rate of extraction for regeneration of propionic acid from different loaded organic phases: \diamond —2-octanol; \square —1-decanol; \triangle —MIBK.

(Fig. 14). R_A was plotted for various phase volume ratios (V_{org}/V_{aq} ; volume of organic phase to volume of aqueous phase), at constant speed of stirring, for 0.5 kmol/m³ TMA in water and acid concentrations of loaded organic phase obtained by contacting 0.2 kmol/m³ propionic acid by TOA in 2-octanol, 1-decanol and MIBK, respectively. Again, R_A was found to be independent of volume phase ratio. Thus the regeneration of propionic acid from loaded organic phase is independent of hydrodynamics of the system and thus is considered to be fast chemical reaction occurring in the diffusion film i.e. regime 3.

7. Conclusion

Backextraction of acid was studied using various techniques. Temperature swing regeneration results in 32–35%, 25–35% and 66–88% recovery of acid from the loaded organic phases of TOA+2-octanol; TOA+1-decanol and TOA+MIBK, respectively. Diluent swing regeneration using 1:0.5 and 1:1 volume ratios of organic and diluent phase resulted in 9.5%, ~8.3% and ~39.6% acid recovery from acid-laden organic phases of TOA+2-octanol, TOA+1-decanol and TOA+MIBK, respectively. Thus, efficiency of both the above two method depends on the type of organic phase and in the studied acid concentration, these methods were good for acid-laden organic phases of TOA+MIBK. Both NaOH and trimethyl amine (TMA) could result in 100% recovery of acid. However, it is advantages to use

TMA, as the base is volatile, and acid can be easily generated by applying heat. Kinetics of backextraction of acid using TMA in a stirred cell was also studied. Method of discerning mechanism was employed for the regime identification. In all the three loaded organic phases it was found the reaction is fast

Notation

[HA]	concentration of acid, kmol/m ³
[HA*]	equilibrium concentration of acid in the organic phase, kmol/m ³
A	interfacial area, m ²
m	order of reaction with respect to acid
n	order of reaction with respect to extractant
R _A	specific rate of extraction, kmol/m ² s
t	time, s
V	volume, m ³

Subscripts

aq	aqueous phase
org	organic phase
o	initial

Abbreviations

MIBK	methyl isobutyl ketone
TOA	tri-n-octyl amine
TMA	tri-methylamine

References

- Doraiswamy, L.K., Sharma, M.M., 1984. *Heterogeneous Reaction: Analysis, Examples, and Reactor Design*, Vol. 2: Fluid–Fluid–Solid–Reactions, first ed Wiley, New York, pp. 17–41.
- Gu, Z., Glatz, B.A., Glatz, C.E., 1998. Propionic acid production by extractive fermentation. I. Solvent considerations. *Biotechnology and Bioengineering* 57, 454–461.
- Keshav, A., Wasewar, K.L., Chand, S., 2008a. Extraction of propionic acid using different extractants (tri-n-butylphosphate, tri-n-octylamine and Aliquat 336). *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47, 6192–6196.
- Keshav, A., Wasewar, K.L., Chand, S., 2008b. Equilibrium studies for extraction of propionic acid using tri-n-butyl phosphate in different solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data* 53 (7), 1424–1430.
- Keshav, A., Wasewar, K.L., Chand, S., 2008c. Equilibrium and kinetics of extraction of propionic acid using tri-n-octylphosphineoxide. *Chemical Engineering and Technology* 31 (9), 1290–1295.
- Keshav, A., Wasewar, K.L., Chand, S., 2008d. Reactive extraction of propionic acid with tri-n-octylamine in different diluents. *Separation and Purification Technology* 63, 179–183.
- Keshav, A., Wasewar, K.L., Chand, S., 2008e. Reactive extraction of propionic acid using tri-n-octylamine, tri-n-butyl phosphate and Aliquat 336 in sunflower oil as diluent. *Journal of Chemical technology and Biotechnology*, Published online.
- Keshav, A., Wasewar, K.L., Chand, S., 2008f. Extraction of acrylic, propionic and butyric acid using Aliquat 336 in oleyl alcohol: equilibria and effect of temperature. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48 (2), 888–893.
- King, C.J., Tamada, J.A., 1990. Extraction of carboxylic acids with amine extractants. (3) Effect of temperature, water coextraction, and process considerations. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 29, 1327–1333.
- Mitchell, J.A., Reid, E.E., 1931. The pervaporation of aliphatic amides. *Journal of American Chemical Society*, 1879–1883.
- Payne, M.J., 1985. Propionic and butyric acids. In: Moo-Young, M. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3. Pergamon, New York, pp. 731–759.
- Poole, L.J., King, C.J., 1991. Regeneration of carboxylic acid-amine extracts by back-extraction with an aqueous solution of a volatile amine. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 30, 923–929.
- Streitwieser Jr., A., Heathcock, C.H., 1976. *Introduction to Organic Chemistry*. Macmillan, New York (Chapters 17 and 18).
- Tamada, J.A., King, C.J., 1989. Extraction of carboxylic acids by amine extractants. Report LBL-25571; Lawrence Berkeley Laboratory: Berkeley, CA.
- Tamada, J.A., King, C.J., 1990. Extraction of carboxylic acids with amine extractants. 3. Effect of temperature, water coextraction and process consideration. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 29, 1333–1338.
- Uslu, H., Inci, I., 2007. (Liquid+liquid) equilibria of the (water+propionic acid+Aliquat 336+organic solvents) at T=298.15. *Journal of Chemical Thermodynamics* 39, 804–809.
- Wasewar, K.L., Pangarkar, V.G., 2006. Intensification of propionic acid production by reactive extraction: effect of diluents on equilibrium. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 20, 325–331.
- Yabannavar, V.M., Wang, D.I.C., 1991a. Analysis of mass transfer for immobilized cells in an extractive lactic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 544–550.
- Yabannavar, V.M., Wang, D.I.C., 1991b. Strategies for reducing solvent toxicity in extractive fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 716–722.

Microbial Production of Propionic Acid with *Propionibacterium freudenreichii* Using an Anion Exchanger-Based In Situ Product Recovery (ISPR) Process with Direct and Indirect Contact of Cells

Peng Wang · Yunshan Wang · Zhiguo Su

Received: 29 August 2011 / Accepted: 1 December 2011 /
Published online: 23 December 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract The recovery of an inhibiting product from a bioreactor soon after its formation is an important issue in industrial bioprocess development. In the present study, the potential of the anion exchanger-based in situ product recovery (ISPR) technique for the biocatalytic production of propionic acid was discussed. The focus of the current work was the selection of a suitable configuration of metabolically active cells for application in propionic acid production. Accumulation of propionic acid in fermentation broth caused feedback inhibition of the growth and biotransformation activity of *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019. Relevant product inhibition kinetics was discussed, and the results showed that keeping the aqueous propionic acid concentration below 10.02 gL⁻¹ was an essential prerequisite for ISPR process. A batch study, in which three ISPR configuration mode designs were compared, was conducted. The comparison indicated that employing an external direct mode had significant advantages over other modes in terms of increased productivity and product yield, with a corresponding decrease in the number of downstream processing steps, as well as in substrate consumption. The fed-batch culture using an external direct mode for the continuous accumulation of propionic acid resulted in a cumulative propionic acid concentration of 62.5 gL⁻¹, with a corresponding product yield of 0.78 g propionic acid/g glucose.

Keywords *Propionibacterium freudenreichii* · Propionic acid · ISPR · External direct mode · Fed-batch fermentation

P. Wang · Y. Wang (✉) · Z. Su
National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese
Academy of Sciences, P.O. Box 353, Beijing 100190, People's Republic of China
e-mail: yswang@home.ipe.ac.cn

P. Wang · Y. Wang · Z. Su
Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Introduction

Propionic acid and its salts are widely used as anti-fungal agents in food [1], as additives in animal feeds [2, 3], and as important thermoplastics in the plastic industry. Propionic acid and its salts can be obtained either by chemical reactions, which are chiefly conducted through the chemical synthesis of petroleum feedstocks or by fermentation using the bacteria of the genera *Propionibacterium* [4].

Additionally, the production of propionic acid using a chemical method is unsatisfactory because it uses toxic reagents and requires a high energy input, making it an environmentally unfriendly production process. Consequently, a great deal of interest exists in the production of propionic acid using an attractive alternative, that is, fermentation. However, low yield and inefficiency attributable to propionic acid synthesis and inhibition of cell growth present problems. As a weak organic acid, non-dissociated propionic acid can pass through the bacterial cell membrane into the cytoplasm and release protons because of the intracellular alkaline environment. As a result, the pH gradient across the bacterial cell membrane is disturbed, affecting nutrient transfer and inhibiting cell growth and propionic acid synthesis [5, 6]. To improve propionic acid synthesis and alleviate the inhibition of microbial growth, two approaches using the in situ product recovery (ISPR) technique for propionic acid fermentation [7–10] and production with propionic acid-tolerant bacteria obtained through adaptive evolution [6, 11, 12] have been developed.

In the first method, several ISPR techniques in whole-cell biotechnology have been developed during the last 20 years. A product may be removed from its host using five possible primary techniques, namely evaporation, extraction, permeation, immobilization (including ion-exchange adsorption), and precipitation. A variety of techniques are often available for the removal of a specific product [13]. Among these techniques is ion-exchange adsorption. Ion-exchange adsorption is a mild technique suitable for capturing both high and low molecular weight products. This technique has the potential to provide a simple and robust process compared with other techniques, such as liquid–liquid extraction membrane filtration with cell recycling and electrodialysis [14–17].

However, the successful application of an ISPR process does not depend solely on the chosen separation technique but also on the configuration of the bioreactor/separation units, the mode of contact between the microorganisms, and the separation phase that removes the product from the vicinity of the cell. The in situ recovery of a product can occur either inside the reactor (internal) or in an external loop. The contact between the microorganisms and the product separation phase can be either direct or indirect. Thus, various ISPR configuration modes can be assembled: conventional mode (a), internal direct mode (b), internal indirect mode (c), and external direct mode (d) (Fig. 1). Previous studies have shown the various possible modes of operation (continuous and batch) and the use of a separation unit outside of the reactor or separation techniques that act right inside the bioreactor [9, 18, 19]. However, only few studies have focused on both the characteristics of different configurations (internal or external) and the contact mode (direct or indirect) to date. Therefore, in the batch case, the categorization of different ISPR configurations was studied by characterizing the position of the in situ separation and the mode of contact between the cell and the separation phase in the microbial propionic acid production process. Detailed product inhibition studies revealed the necessity of implementing ISPR at an early stage, i.e., at low product concentrations. The fed-batch case with an external direct mode led to a cumulative propionic acid concentration of 62.5 gL^{-1} , with a corresponding product yield of $0.78 \text{ g propionic acid/g glucose}$.

Introduction

Propionic acid and its salts are widely used as anti-fungal agents in food [1], as additives in animal feeds [2, 3], and as important thermoplastics in the plastic industry. Propionic acid and its salts can be obtained either by chemical reactions, which are chiefly conducted through the chemical synthesis of petroleum feedstocks or by fermentation using the bacteria of the genera *Propionibacterium* [4].

Additionally, the production of propionic acid using a chemical method is unsatisfactory because it uses toxic reagents and requires a high energy input, making it an environmentally unfriendly production process. Consequently, a great deal of interest exists in the production of propionic acid using an attractive alternative, that is, fermentation. However, low yield and inefficiency attributable to propionic acid synthesis and inhibition of cell growth present problems. As a weak organic acid, non-dissociated propionic acid can pass through the bacterial cell membrane into the cytoplasm and release protons because of the intracellular alkaline environment. As a result, the pH gradient across the bacterial cell membrane is disturbed, affecting nutrient transfer and inhibiting cell growth and propionic acid synthesis [5, 6]. To improve propionic acid synthesis and alleviate the inhibition of microbial growth, two approaches using the in situ product recovery (ISPR) technique for propionic acid fermentation [7–10] and production with propionic acid-tolerant bacteria obtained through adaptive evolution [6, 11, 12] have been developed.

In the first method, several ISPR techniques in whole-cell biotechnology have been developed during the last 20 years. A product may be removed from its host using five possible primary techniques, namely evaporation, extraction, permeation, immobilization (including ion-exchange adsorption), and precipitation. A variety of techniques are often available for the removal of a specific product [13]. Among these techniques is ion-exchange adsorption. Ion-exchange adsorption is a mild technique suitable for capturing both high and low molecular weight products. This technique has the potential to provide a simple and robust process compared with other techniques, such as liquid–liquid extraction membrane filtration with cell recycling and electrodialysis [14–17].

However, the successful application of an ISPR process does not depend solely on the chosen separation technique but also on the configuration of the bioreactor/separation units, the mode of contact between the microorganisms, and the separation phase that removes the product from the vicinity of the cell. The in situ recovery of a product can occur either inside the reactor (internal) or in an external loop. The contact between the microorganisms and the product separation phase can be either direct or indirect. Thus, various ISPR configuration modes can be assembled: conventional mode (a), internal direct mode (b), internal indirect mode (c), and external direct mode (d) (Fig. 1). Previous studies have shown the various possible modes of operation (continuous and batch) and the use of a separation unit outside of the reactor or separation techniques that act right inside the bioreactor [9, 18, 19]. However, only few studies have focused on both the characteristics of different configurations (internal or external) and the contact mode (direct or indirect) to date. Therefore, in the batch case, the categorization of different ISPR configurations was studied by characterizing the position of the in situ separation and the mode of contact between the cell and the separation phase in the microbial propionic acid production process. Detailed product inhibition studies revealed the necessity of implementing ISPR at an early stage, i.e., at low product concentrations. The fed-batch case with an external direct mode led to a cumulative propionic acid concentration of 62.5 gL^{-1} , with a corresponding product yield of $0.78 \text{ g propionic acid/g glucose}$.

at 25 °C was employed for the HPLC analysis. The mobile phase was a 0.02-M potassium dihydrogen phosphate buffer solution/acetonitrile (pH 2.8, adjusted with phosphoric acid solution) with 4% acetonitrile isocratic elution. Commercially available propionic acid was used as an external standard.

Measurement of Cell Concentration

To measure the growth kinetics, cell concentrations were analyzed photometrically at 600 nm (OD 600 nm). Before measuring the cell concentrations, the 1-mL broth was centrifuged at 10,000×g for 10 min, and the cell pellets were resuspended in 1 mL phosphate buffer after the removal of the supernatant. The error in the removal of the very small fraction of glucose was negligible. The OD 600 nm values were converted into dry cell weight (DCW) values using the following empirical equation based on the measurement of 11 different cell samples: $DCW (g L^{-1}) = OD 600 nm \times 0.30$; standard deviation = 0.06. The DCW was determined using the 5-mL liquid culture, as described by Mirata et al. [20].

Product Inhibition of Biotransformation and Growth

To investigate the growth-inhibiting effect of propionic acid on *P. freudenreichii* CICC 10019, the fermentation media were adjusted to seven different propionic acid concentrations ranging from 0 to 30.04 gL⁻¹ by adding respective aliquots of a highly concentrated propionic acid solution. Subsequently, the medium (50 mL in 200 mL flasks each) was inoculated with 10% (v/v) of a pre-culture grown overnight in the fermentation media and incubated at 30 °C with static cultivation. For each concentration of propionic acid, the maximum specific growth rate was determined through the differentiation of the growth curves created by fitting the data points with a logistic growth model using a mathematical analysis program (Origin, version 7.5, Microcal, Northampton, MA, USA). A linear mathematical model initially developed by Luong [21] for the product inhibition in ethanolic fermentation was used to describe the decrease in the maximum specific growth rate versus the increasing propionic acid concentration. The linear relationship is expressed by the following formula:

$$\mu_{\max} = \mu_{\max 0} \left(1 - \frac{p}{p_m} \right) \quad (1)$$

where μ_{\max} is the maximum specific growth rate of *P. freudenreichii* CICC 10019 in the presence of propionic acid and $\mu_{\max 0}$ is the maximum specific growth rate in the absence of propionic acid. p is the initial propionic acid concentration in the broth, and p_m is the propionic acid concentration above which cells do not grow. The experimental data were fitted through Eq. 1 using least squares regression (Origin 7.5).

Batch Culture with Different ISPR Configurations and Contact Modes

The selection of a proper ISPR process configuration and an appropriate contact mode between the microbes and the separation phase must be considered a priori in the implementation of these techniques in biocatalytic processes. To accumulate highly concentrated propionic acid, a batch culture of *P. freudenreichii* was conducted in a batch mode in three 7-L bioreactors (NBS, USA) equipped with pH (Mettler Toledo) and temperature control. The temperature was set at 30 °C with static cultivation. The basic configurations for the ISPR as

applied to the established techniques are shown in Fig. 1. The separation of the cells and propionic acid was achieved by employing the following configurations: (a) A process without ISPR operation was shown as a comparison; (b) an internal direct configuration, where the fermentation broth was in contact with a second product-removing phase (resin ZGA330) that was loaded periodically in the bioreactor; (c) an internal indirect configuration, where the resin ZGA330 was placed periodically in a mesh cylinder (length, 33 cm; diameter, 1.5 cm) constructed from a stainless steel mesh grid and attached to the baffles of the bioreactor; or (d) an external direct configuration, where the bioreactor liquid flows via a loop in contact with the resin ZGA330 in an external unit. The quantity of assembled free resin was 40 g, and the separation operations were incised simultaneously at 40–41, 64–65, and 88–89 h for the three ISPR configurations (Fig. 1b–d). Specifically, the separation operations were conducted by running the agitation with a rate at 150 rpm for b, c and opening the external loop with a flux at 5 L/h for d (contact time between resin and microbes was about 45 min for all configurations). Sampling and analysis of propionic acid and substrate concentration shall be conducted on a regular basis throughout the fermentation process. The total concentration of propionic, acetic, and succinic acid is the sum of concentrations of those in the fermentation broth and eluted from the resin after fermentation.

Fed-Batch Culture with External Direct ISPR Process

The fed-batch culture with an external direct ISPR process was conducted in another identical 7-L bioreactor (NBS, USA) connecting a modified glassy chromatographic column (25 mm o. d., length 500 mm, total volume 200 mL; purchased from Jinhua Co., Shanghai, China) by the circulation of the culture with a peristaltic pump through the glassy column of the 40-g ZGA330 ion-exchange resin at 30 °C. The fermentation broth was pumped into the bottom ion-exchange chromatographic column and was then pumped out from the top and returned into the bioreactor for circulation. The flux of the fermentation broth through the column was 5 L/h. When the fermentation broth was pumped into the column, the propionic acid bound to the ion-exchanger resin, releasing hydroxyl ions that maintained the pH of the fermentation broth. Thus, propionic acid, the target product, is adsorbed by the resin and prevented to return to the bioreactor for on-line separation. The resin was exchanged with 40 g of freshly impregnated resin when an increased propionic acid concentration in the culture was observed.

The fed-batch culture process was conducted by adding a concentrated glucose solution (600 gL^{-1}) to the culture when the nutrients were depleted to keep the concentration at approximately 10 gL^{-1} (in pulse feeding approach), which is in contrast to the batch culture with external direct ISPR process. For the external direct ISPR process, each charge of the 40-g ZGA330 resin saturated with propionic acid was placed in a separate column and was first washed with 500 mL of recirculating water. After the separation of the water, the propionic acid was eluted using a 200-mL 1-M sodium hydroxide solution, and the resin was regenerated for reuse.

Results and Discussion

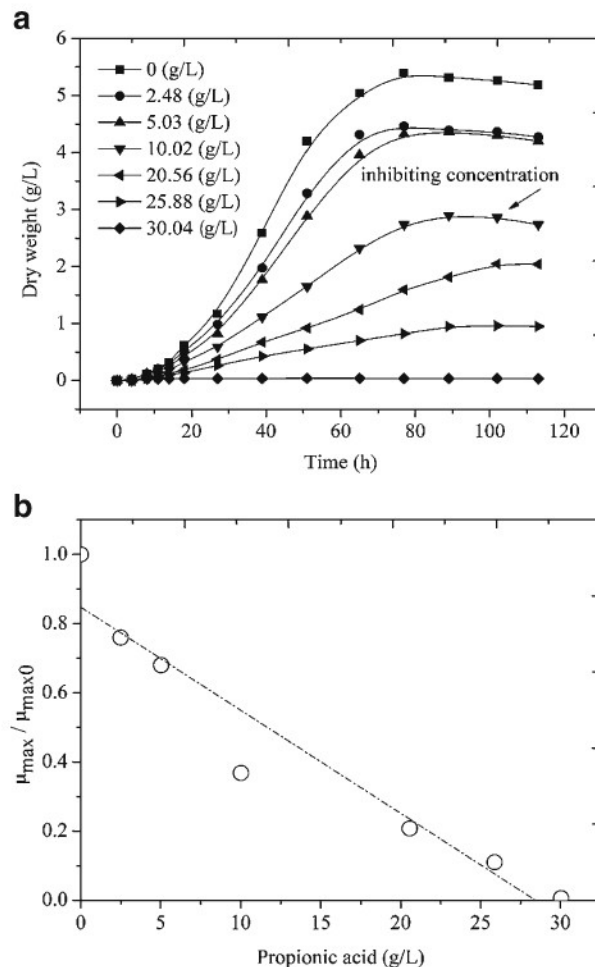
Inhibitory Effects of the Propionic Acid on *P. freudenreichii* CICC 10019

To gain a better understanding of the impact of product inhibition on cell growth and product yield, the impact of propionic acid on both growth and biotransformation performance was systematically examined in two separate studies. To investigate the growth inhibition effect

of propionic acid, the growth kinetics of the shaking flask cultures of the *P. freudenreichii* CICC 10019 in the fermentation medium supplemented with increasing propionic acid concentrations were determined (Fig. 2a). *P. freudenreichii* CICC 10019 had a lag phase of up to 24 h, suggesting the induction of cellular adaptation mechanisms. After the adaptation phase, low-level cell growth was still observed in the presence of the maximum propionic acid concentration tested at 25.88 g L⁻¹.

An analysis of the maximum specific growth rates, μ_{\max} , showed that the highest specific growth rate was achieved by *P. freudenreichii* CICC 10019 in the absence of propionic acid, that is, $\mu_{\max} = \mu_{\max 0} = 0.126 \text{ h}^{-1}$. The increasing concentration of propionic acid led to a linear decrease in the relative maximum growth rates $\mu_{\max}/\mu_{\max 0}$ (Fig. 2b). Based on a linear regression with an empirical equation by Luong, which was originally developed for ethanol inhibition in alcoholic fermentation, the critical inhibitory concentration was determined to be 28.62 g L⁻¹ propionic acid. This approximation was confirmed experimentally with a total inhibition of growth of 30.04 g L⁻¹ propionic acid (Fig. 2a, b).

Fig. 2 **a** Growth kinetics and **b** relative maximum specific growth rate of *P. freudenreichii* CICC 10019 in the presence of increasing propionic acid concentrations. Overall maximum specific growth rate was observed in the absence of propionic acid with $\mu_{\max} = \mu_{\max 0} = 0.126 \text{ h}^{-1}$. Seven cultivations (50 mL) were employed in a fermentation medium supplemented with the following increasing propionic acid concentrations (grams per liter): 0 (square), 2.48 (circle), 5.03 (up-pointing triangle), 10.02 (down-pointing triangle), 20.56 (right-pointing pointer), 25.88 (left-pointing pointer), and 30.04 (diamond). Linear regression ($r^2 = 0.962$) was performed based on an empirical model by Luong [21]

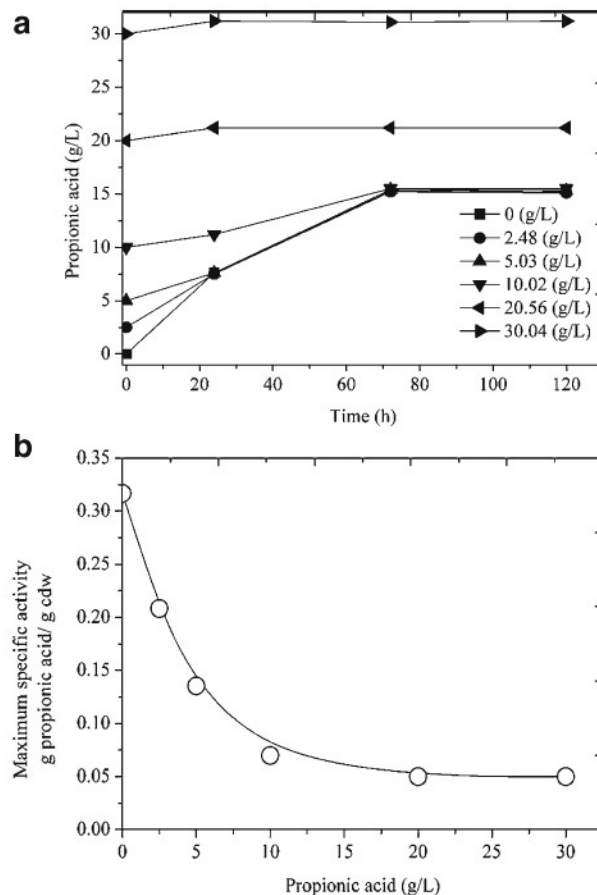


In a separate study, glucose biotransformation with *P. freudenreichii* CICC 10019 resting cells in the presence of increasing concentrations of initially dosed propionic acid was investigated (Fig. 3a). The maximum specific activities (in gram propionic acid formed per gram DCW) derived from these product formation kinetics revealed an exponential decrease with an increase in initial product concentration (Fig. 3b). Obviously, propionic acid inhibits the biotransformation activity of *P. freudenreichii* CICC 10019 at low concentrations ($\geq 2 \text{ g L}^{-1}$). The data from the inhibition studies clearly illustrate that maintaining a low level of aqueous propionic acid concentration (e.g., 10.02 g L^{-1}) by ISPR [22] is an essential prerequisite to increase the productivity, product yield, and maximum propionic acid concentration during glucose biotransformation.

Selecting a Suitable ISPR Mode for the Production of Propionic Acid

The ZGA330 resins were placed directly in the bioreactor (internal direct mode), inside a mesh cylinder that was placed in the bioreactor (internal indirect mode), or in an external fluidized bed (external direct mode) (Fig. 1). The external direct mode was combined with a propionic acid back-extraction step to regenerate the resins. The ZGA330 resins were used for the extraction of the propionic acid from the reaction suspension.

Fig. 3 **a** Product formation kinetics of *P. freudenreichii* CICC 10019 resting cells (1.5 gDCW/L, 0.1 M phosphate buffer, 10 g L^{-1} glucose) in the presence of the following increasing initial propionic acid concentrations (in grams per liter): 0 (right-pointing pointer), 2.48 (left-pointing pointer), 5.03 (down-pointing triangle), 10.02 (up-pointing triangle), 20.56 (diamond), and 30.04 (square). **b** Maximum specific activity as a function of the initial propionic acid concentration. The maximum specific activities have been calculated from the kinetics of propionic acid formation and correspond to the initial 40 h of biotransformation



The influence of different ISPR modes on propionic, acetic, and succinic acid production in the batch culture are shown in Fig. 4a–d. In the internal direct mode, the total propionic acid concentration reached 36.5 gL^{-1} at 120 h with an initial glucose concentration of 60 gL^{-1} . The total acetic and succinic acid concentrations were 17.3 and 7.0 gL^{-1} , respectively (Table 1). In this mode, the high final propionic acid concentration was higher than that achieved in the internal indirect mode (propionic acid (PA) 32 gL^{-1} ; acetic acid (AA) 19 gL^{-1} ; succinic acid (SA) 8.4 gL^{-1}). However, this concentration did not reach a level similar to that of the external direct mode (PA 44.1 gL^{-1} ; AA 24.3 gL^{-1} ; SA 11.6 gL^{-1}). This result implied that extraction capability was more powerful when cells were directly in contact with a separate phase.

Propionic acid fermentation was a multi-product symbiotic system. Acetic and succinic acids were accompanied with the propionic acid production in this work. Compared with the internal direct mode, the acetic and succinic acid productivity increased slightly, which corresponds to the propionic acid productivity a little decrease in the internal indirect mode. However, in the internal indirect mode, there is a significant increase in the productivity of these three acids. The theoretical mass ratio of propionic acid to acetic acid was 2:1 with glucose as substrate [4]. But in this work, the proportion of propionic acid to acetic acid decreased from 2.1 to 1.8. It was clear that the internal indirect mode fermentation could

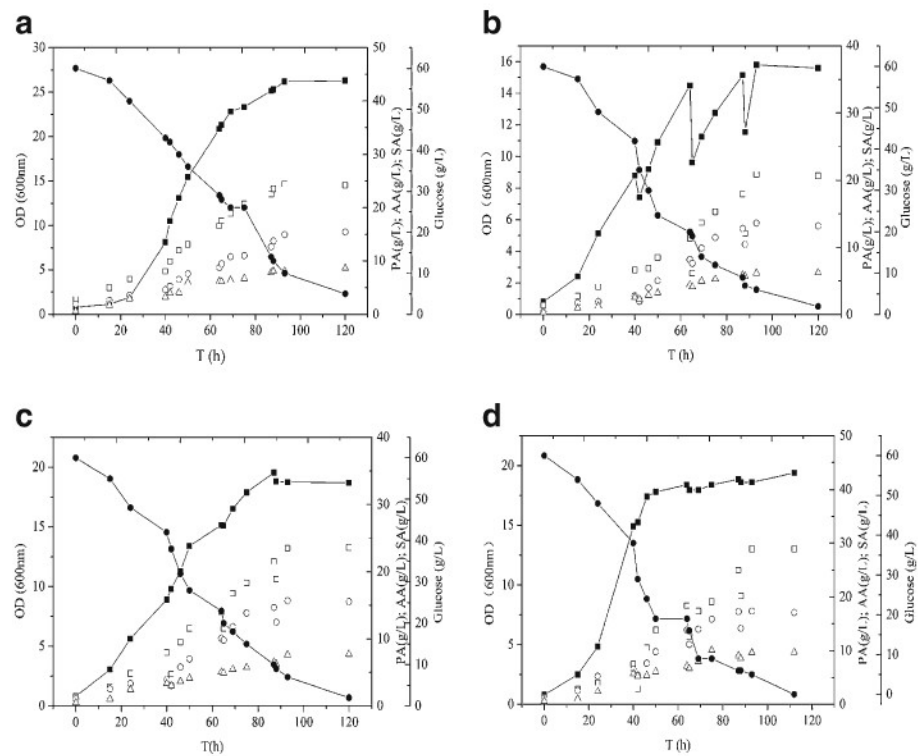


Fig. 4 Bioprocess kinetics of different configurations for propionic acid production. **a** Conventional fermentation mode, **b** internal direct ISPR mode, **c** internal indirect ISPR mode, and **d** external direct ISPR mode. Initial glucose concentration was 60 gL^{-1} , closed circle glucose concentration, closed square biomass (OD 600 nm), open square aqueous propionic acid concentration (PA), open circle aqueous acetic acid concentration (AA), and open triangle aqueous succinic acid concentration (SA)

The influence of different ISPR modes on propionic, acetic, and succinic acid production in the batch culture are shown in Fig. 4a–d. In the internal direct mode, the total propionic acid concentration reached 36.5 gL^{-1} at 120 h with an initial glucose concentration of 60 gL^{-1} . The total acetic and succinic acid concentrations were 17.3 and 7.0 gL^{-1} , respectively (Table 1). In this mode, the high final propionic acid concentration was higher than that achieved in the internal indirect mode (propionic acid (PA) 32 gL^{-1} ; acetic acid (AA) 19 gL^{-1} ; succinic acid (SA) 8.4 gL^{-1}). However, this concentration did not reach a level similar to that of the external direct mode (PA 44.1 gL^{-1} ; AA 24.3 gL^{-1} ; SA 11.6 gL^{-1}). This result implied that extraction capability was more powerful when cells were directly in contact with a separate phase.

Propionic acid fermentation was a multi-product symbiotic system. Acetic and succinic acids were accompanied with the propionic acid production in this work. Compared with the internal direct mode, the acetic and succinic acid productivity increased slightly, which corresponds to the propionic acid productivity a little decrease in the internal indirect mode. However, in the internal indirect mode, there is a significant increase in the productivity of these three acids. The theoretical mass ratio of propionic acid to acetic acid was 2:1 with glucose as substrate [4]. But in this work, the proportion of propionic acid to acetic acid decreased from 2.1 to 1.8. It was clear that the internal indirect mode fermentation could

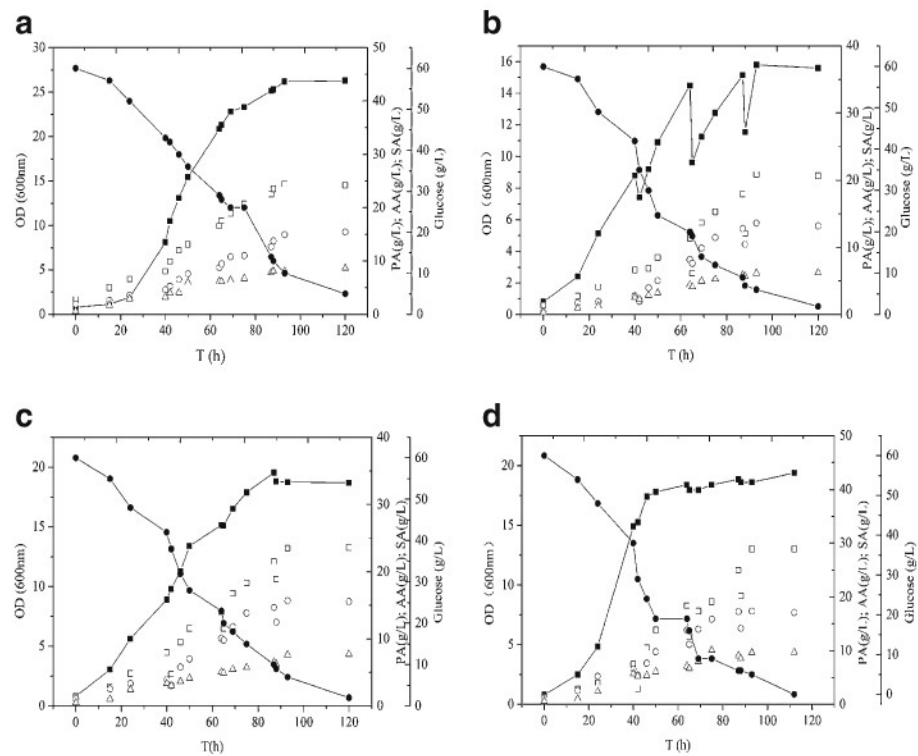


Fig. 4 Bioprocess kinetics of different configurations for propionic acid production. **a** Conventional fermentation mode, **b** internal direct ISPR mode, **c** internal indirect ISPR mode, and **d** external direct ISPR mode. Initial glucose concentration was 60 gL^{-1} , closed circle glucose concentration, closed square biomass (OD 600 nm), open square aqueous propionic acid concentration (PA), open circle aqueous acetic acid concentration (AA), and open triangle aqueous succinic acid concentration (SA)

membrane modules. This setup is relatively simple. However, fouling or clogging of the membrane in perstraction, pervaporation, or electro dialysis processes has often been observed when the cells were in direct contact with the membranes in ISPR configurations. Thus, this configuration was not studied in the current work.

Fed-Batch Biotransformation of Glucose into Propionic Acid with the External Direct Mode

The fed-batch cultivation was performed in a bioreactor with an external direct mode for the ISPR using a glassy chromatographic column of ZGA330 resin. Propionic acid was extracted from the fermentation broth, and the resin was regenerated for reuse when needed. The fermentations with *P. freudenreichii* CICC 10019 using an external loop showed that a recirculation at 5 L/h did not affect the biomass formation kinetics negatively (data not shown). To avoid nutrient-limiting conditions for the biotransformation into the liquid phase, a high concentration of glucose solution (600 gL^{-1}) was directly fed into the culture manually to maintain the glucose concentration in the broth at approximately 10 gL^{-1} in the broth.

Before starting the glucose solution feed, cells were grown for 80 h in the fermentation medium when the glucose concentration dropped below 10 gL^{-1} . The ISPR process was started after 33 h by circulating the broth through the external loop when the culture reached exponential growth (OD 600 nm of 16) and when 10 gL^{-1} propionic acid was produced (Fig. 5a, b).

Subsequently, the peristaltic pump was switched off, resulting in an immediate reduction in aqueous propionic acid concentration. The external loop was operated at intervals of about 15 h from 33 to 120 h. After 80 h, the culture attained a maximum OD 600 nm of approximately 25 (DCW 6.8 gL^{-1}), whereas propionic acid concentration again slowly increased to 10 gL^{-1} although the broth has recirculated four times. This product accumulation suggested that the resin became saturated within 80 h of the ISPR bioprocess.

Afterward, 40 g of fresh ZGA330 resins was alternated to reactivate the circulation system. The loaded resin was washed and eluted with 1 M NaOH/ethanol (40:60, v/v) to recover the propionic acid. The propionic acid saturated by ZGA330 resin was washed, eluted, regenerated, and balanced.

The increasing concentration of the inhibiting product in the broth reduced the metabolic activity of the cells, as illustrated by the corresponding course of the fed glucose, with an attenuation of glucose uptake arising between 40 and 70 h and an incipient increase in glucose concentration between 80 and 100 h (Fig. 5b). This C-source consumption can be interpreted as a cellular action to regenerate the cofactor needed for the ongoing enzymatic precursor conversion efficiently [23].

As illustrated in Fig. 5a, the additive propionic concentration rose to a maximum value of 62.5 gL^{-1} after approximately 140 h. Therefore, the fed-batch culture presented in the present work resulted in a 42% increase in final propionic acid concentration compared with the batch culture approach (Table 2). In addition, the productivity within 140 h of production was $0.45 \text{ g propionic acid/(L h)}$, higher than the corresponding value calculated for the batch culture process.

Compared with the batch culture process, the fed-batch process obtained a 16.8% increase in biomass (DCW 6.8 vs. 6 gL^{-1}). However, a significantly higher consumption of glucose was evident in the fed-batch process ($80 \text{ vs. } 60 \text{ gL}^{-1}$), experimentally suggesting that the fed-batch process might have again precipitated the C-resource metabolism into the route of propionic acid synthesis. Moreover, the yield of propionic acid reached $0.78 \text{ g propionic acid/g glucose}$, much higher than the 0.35-g g^{-1} theoretical yield of glucose [24].

Fig. 5 External direct mode bioprocess kinetics for the production of propionic acid with *P. freudenreichii* CICC 10019 in a fed-batch bioreactor coupled with an anion exchanger-based ISPR. Time courses of **a** aqueous propionic acid concentration in a batch culture using an external direct mode process (*open square*) and aqueous propionic acid concentration of fed-batch culture using an external direct mode process (*closed square*) and **b** glucose concentration in a batch culture using an external direct mode process (*open circle*) and a fed-batch culture using an external direct mode process (*closed circle*) are shown. Compared with the batch culture using an external direct mode process (*open triangle*), the advantages of a fed-batch culture using an external direct mode process (*closed triangle*) in terms of increasing cell density (OD 600 nm) are shown (c). Arrows indicate the initiation of ISPR. Main cultivation was conducted in a 7-L bioreactor with 5 L fermentation medium. After inoculation with 10% (v/v) of a pre-culture grown in a pre-culture medium, the concentrated glucose was fed to the culture twice between 80 and 120 h to maintain the nutrients at approximately 10 g L^{-1}

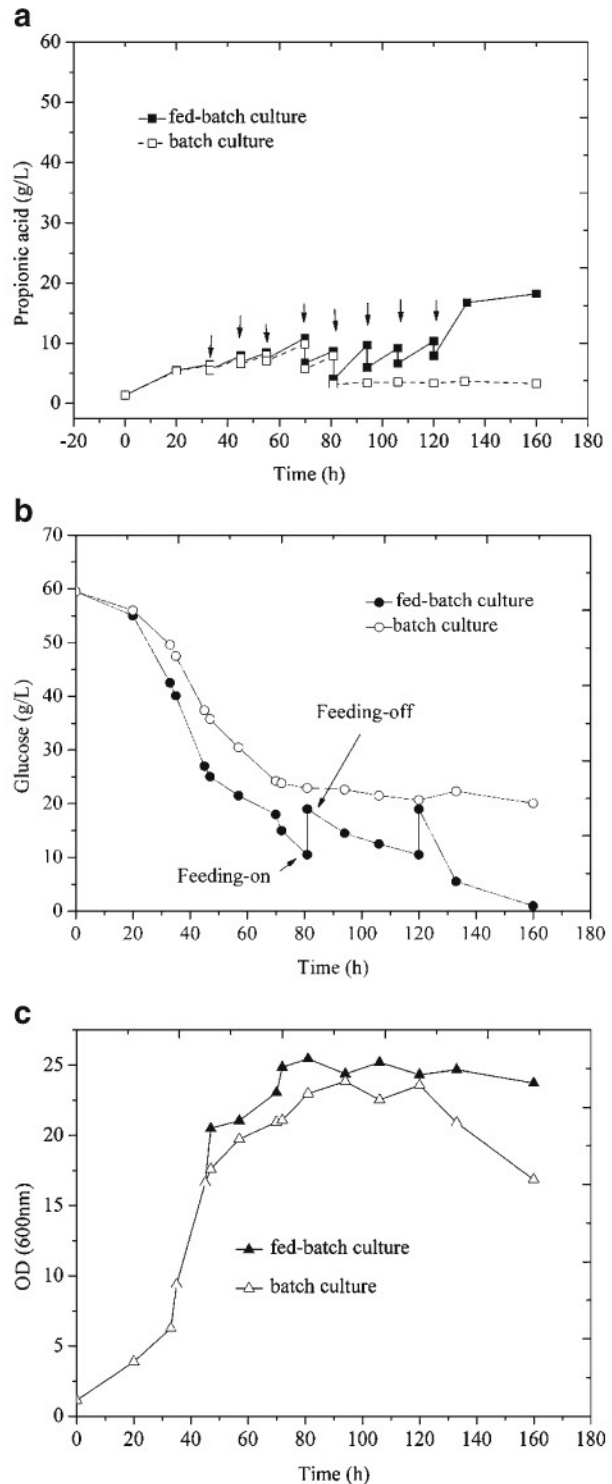


Table 2 Comparison of experiment results between a batch culture and a fed-batch culture that both use an external direct mode

	Culture time (h)	Glucose consumption ^a (g/L)	DCW (g/L)	Propionic acid (g/L)	Propionic acid productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$r_{p/s0}$ (g/g)
Batch culture	120	60	5.82	44.1	0.37	0.74
Fed-batch culture	140	80	6.8	62.5	0.45	0.78

^aThe consumption of substrate glucose in the ISPR process was 80 gL⁻¹ including two periodical feeding in all

Effects of External Direct Mode Process on Propionic Acid Fermentation

As illustrated in Table 2, the propionic acid concentration (62.5 gL⁻¹ in 140 h) obtained with external direct mode is lower than that obtained with immobilized cells in a fibrous-bed bioreactor (106 gL⁻¹ in 4 months) [25], but the cultures with immobilized cells required a long cultivation time and showed low productivity (0.45 vs. 0.25 gL⁻¹ h⁻¹). The product yield of propionic acid from substrate with external direct mode was markedly higher than that of with other modes including with immobilized cells because this mode could precipitate more glucose to produce propionic acid.

Propionic acid fermentation with glycerol as the carbon source has been extensively studied [26]. Compared to glycerol as the carbon source, both cell growth and propionic acid productivity were lower in glucose fermentation with batch or fed-batch mode. However, when used in external direct mode, both cell growth (DCW 5.82 vs. 4.76 gL⁻¹) and propionic acid productivity (0.45 vs. 0.20 gL⁻¹ h⁻¹) were notably promoted in this study.

Moreover, previous works have shown that extractive fermentation was effective in increasing propionic acid production [7]; however, the application of extractive fermentation is difficult at an industrial scale due to the high production costs [9]. The results in this study emphasize the benefit of integrating a highly selective ISPR technique as it can dramatically facilitate downstream processing by reducing the number of further purification steps needed to obtain a product of high purity [27, 28].

Conclusions

The anion exchanger-based ISPR technique might be an attractive option for the production of propionic acid, which employs whole cells as biocatalysts. However, the configuration of the bioreactor/separation units and the mode of operation are crucial for the successful implementation of this technique. The case study presented in the current research shows that employing an external direct mode for the ISPR process in a typical whole-cell catalyzed reaction can result in increased productivity and product yield, with minimal substrate consumption and lower production costs compared with other conventional ISPR configuration processes. The current work proposes a model for the biotransformation of glucose into other organic acids (e.g., succinic acid and lactic acid) because the efficient combination of an aqueous organic two-liquid phase bioprocess with solid-phase product recovery is demonstrated. Although the current study initiated the systematic development of an anion exchanger-based ISPR processes, further research is required to elucidate the different parameters and issues concerning this process. Finally, ISPR by ion exchange

should be a common practice in the design and implementation of robust integrated processes involving fermentation or biotransformation.

Acknowledgments The present work was supported by the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences, Grant NO.KSCX2-YW-G-021.

References

1. Lueck, E. (1980). Propionic acid. In E. Lueck (Ed.), *Antimicrobial food additives. Characteristics, uses, effects* (pp. 175–182). Berlin: Springer.
2. Huitson, J. J. (1968). *Process Biochemistry*, 3, 31–32.
3. Draughon, F. A., Mobley, D. C., Safley, L. M., & Backus, W. R. (1982). *Journal of Food Science*, 44, 1018–1019.
4. Playne, M. J. (1985). Propionic and butyric acids. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive biotechnology* (pp. 731–755). New York: Pergamon.
5. Gu, Z., Glatz, B., & Glatz, C. (1998). *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 13–18.
6. Suwannakham, S., & Yang, S. T. (2005). *Biotechnology and Bioengineering*, 91, 325–337.
7. Goswami, V., & Srivastava, A. K. (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 676–680.
8. Lewis, V., & Yang, S. T. (1992). *Biotechnology Progress*, 8, 104–110.
9. Ozadali, F., Glatz, B., & Glatz, C. (1996). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 710–716.
10. Wang, K., Chang, Z. D., Ma, Y. C., Lei, C., Wang, J., Zhu, T. Y., Liu, H. Z., Zuo, Y. J., & Li, X. (2008). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 2878–2882.
11. Woskow, S. A., & Glatz, B. A. (1991). *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2821–2828.
12. Suwannakham, S., Huang, Y., & Yang, S. T. (2006). *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 383–395.
13. Stark, D., & von Stockar, U. (2003). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 80, 149–175.
14. Matsumoto, M., Takagi, T., & Kondo, K. (1998). *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85, 483–487.
15. Siebold, M., Frieling, P. V., Joppien, R., Rindfleisch, D., Schügerl, K., & Röper, H. (1995). *Process Biochemistry*, 30, 81–95.
16. Mehaia, M. A., & Cheryan, M. (1987). *Process Biochemistry*, 22, 185–188.
17. Hjärleifsdottir, S., Seevaratnam, S., Holst, O., & Mattiasson, B. (1990). *Current Microbiology*, 20, 287–292.
18. Gupta, A., & Srivastava, A. K. (2001). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6, 1–5.
19. Boyaval, P., Corre, C., & Madec, M. N. (1994). *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 883–886.
20. Mirata, M. A., Wust, M., Mosandl, A., & Schrader, J. (2008). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3287–3296.
21. Luong, J. H. T. (1985). *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 280–285.
22. Alphand, V., Carrea, G., Wohlgemuth, R., Furstoss, R., & Woodley, J. M. (2003). *Trends in Biotechnology*, 21, 318–323.
23. León, R., Fernandes, P., Pinheiro, H. M., & Cabral, J. M. S. (1998). *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 483–500.
24. Coral, J., Karp, S. G., Vandenberghe, L. P. S., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 333–341.
25. Zhang, A., & Yang, S. T. (2009). *Process Biochemistry*, 44, 1346–1351.
26. Zhu, Y. F., Li, J. H., Tan, M., Liu, L., Jiang, L. L., Sun, J., Lee, P. S., Du, G. C., & Chen, J. (2010). *Bioresource Technology*, 101, 2845–2852.
27. Freeman, A., Woodley, J. M., & Lilly, M. D. (1993). *Biotechnology*, 11, 1007–1012.
28. Lye, G. J., & Woodley, J. M. (1999). *Trends in Biotechnology*, 17, 395–402.