**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Інститут (факультет) __біотехнології та екологічного контролю__**
**Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____**

| **«До захисту в ЕК»** | **«До захисту допущено»** |
|---|---|
| Декан факультету | Завідувач кафедри |
| _____ _Наталія ГРЕГІРЧАК_ | _____ _Віктор СТАБНІКОВ_ |
| (підпис) (ім'я та прізвище) | (підпис) (ім'я та прізвище) |
| «___» ____червня_____ 2023 р. | «___» ___червня_____ 2023 р. |

# КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
# НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності _____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми____«Біотехнології: фармацевтична,_____
_____промислова, харчова, природоохоронна»__
на тему: _____Біосинтез пропіонової кислоти *Propionibacterium* _____
*freudenreichii*_____
_____

Виконав: здобувач__IV__ курсу, групи___3__

_____РОМАНЕНКО Владислав Дмитрович_____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник: _КАРЛАШ Юрій Васильович_____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

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

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

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) __біотехнології та екологічного контролю_____
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____
Освітній ступінь____бакалавр_____
**Спеціальність**____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код і назва)
**Освітньо-професійна** програма _____« Біотехнології: фармацевтична___
_____промислова, харчова, природоохоронна»_____
(назва)

***ЗАТВЕРДЖУЮ**
**Завідувач кафедри** _біотехнології і_____
_____мікробіології_____

_____Віктор СТАБНІКОВ_
“_01_” ___березня___2023 року

**З А В Д А Н Н Я**

**НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

_____РОМАНЕНКА Владислава Дмитровича_____
(прізвище, ім’я, по батькові)
1. Тема роботи _Біосинтез пропіонової кислоти *Propionibacterium*_____
*freudenreichii*_____
_____
_____
керівник роботи _КАРЛАШ Юрій Васильович, к.т.н. доцент_____,
( прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-кс
2. Строк подання здобувачем роботи___05.06.2023_____
3. Вихідні дані до роботи __біологічний агент: _*Propionibacterium*_____
*freudenreichii* ,цільовий продукт: _пропіонова кислота, об’єм ферментера 5 м$^3$, коєфіцієнт заповнення 0,7._____
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)_ РОЗДІЛ 1. Опис пропіонової кислоти. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез пропіонової кислоти. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу пропіонової кислоти. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу пропіонової кислоти. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва пропіонової кислоти. РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва._____
5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробничого біосинтезу пропіонової кислоти *Propionobacterium freudenreichii* – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробничого біосинтезу пропіонової кислоти *Propionobacterium freudenreichii* – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| № | Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітка |
|---|---|---|---|
| 1 | Опис пропіонової кислоти | 01.03.2023 –12.03.2023 | |
| 2 | Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних | 13.03.2023 –26.03.2023 | |
| 3 | Техніко-економічне обґрунтування | 27.03.2023 – 02.04.2023 | |
| 4 | Біосинтез пропіонової кислоти | 03.04.2023 –16.04.2023 | |
| 5 | Обґрунтування вибору технологічної схеми | 17.04.2023 –03.05.2023 | |
| 6 | Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу пропіонової кислоти | 04.05.2023 –11.05.2023 | |
| 7 | Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу пропіонової кислоти | 12.05.2023 –17.05.2023 | |
| 8 | Контроль виробництва | 18.05.2023 –22.05.2023 | |
| 9 | Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва | 23.05.2023 –26.05.2023 | |
| 10 | Оформлення пояснювальної записки | 27.05.2023 –31.05.2023 | |
| 11 | Виконання графічної частини проекту | 27.05.2023 –31.05.2023 | |

**Здобувач** _____ Владислав РОМАНЕНКО
(підпис) (ім'я та прізвище)

**Керівник роботи** _____ Юрій КАРЛАШ
(підпис) (ім'я та прізвище)

# РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці біотехнології отримання пропіонової кислоти культивуванням *Propionibacterium freudenreichii*.

В даній роботі проведено порівняння біологічних агентів для промислового мікробного синтезу пропіонової кислоти, в результаті якого було визначено найкращого продуцента пропіонової кислоти: *P. freudenreichii* CICC 10019, який характеризується найменшою умовною вартістю 1 г пропіонової кислоти (0,085 грн/г) та демонструє найбільший показник синтезованого продукту за годину (0,354 г/год).

Розглянуто сучасні сфери застосування пропіонової кислоти, та проведено розрахунок її річної потреби, яка складає 6,14 м$^3$, при використанні в якості консерванту. для задоволення даної потреби необхідно використовувати виробничий ферментер об'ємом 10 м$^3$, з 25 виробничими циклами за рік.

Розроблено технологічну та апаратурну схеми біосинтезу пропіонової кислоти, які складаються з допоміжних робіт (підготовка аераційного повітря, підготовка азоту, зберігання гліцерину, приготування і стерилізація титрувальних агентів для регулювання рівня pH середовища та приготування та стерилізація поживного середовища) і технологічного процесу (отримання посівного матеріалу *P. freudenreichii* CICC 10019 та виробничий біосинтез *P. freudenreichii* CICC 10019).

Кваліфікаційна робота викладена на 82 сторінках в яких вміщено вступ, десять розділів та список використаної літератури (74 найменувань), 15 таблиць та 8 рисунків. Графічна частина роботи складається з апаратурної та технологічної схеми (2 аркуші формату А1).

**Ключові слова:** штам *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019, пропіонова кислота, консервант зерна, анаеробний виробничий синтез.

**ЗМІСТ**

РЕФЕРАТ ..... 3
ВСТУП ..... 6
РОЗДІЛ 1. Опис пропіонової кислоти ..... 7
1.1. Фізико-хімічні характеристики пропіонової кислоти ..... 7
1.2. Механізм біологічної дії ..... 7
1.3. Виробники пропіонової кислоти та сфери її застосування ..... 8
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних середовищ ..... 10
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування ..... 10
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища ..... 15
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 ..... 17
2.4. Таксономічний статус *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 . 18
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування ..... 19
3.1. Потреба в пропіоновій кислоті ..... 19
3.2. Розрахунок потужності виробництва ..... 20
3.3. Розрахунок об’єму ферментера та кількості виробничих циклів ..... 20
3.3.1. Розрахунок кількості партій продукту пропіонової кислоти (виробничих циклів) ..... 21
3.3.2. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу ... 21
РОЗДІЛ 4. Біосинтез пропіонової кислоти ..... 27
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 ..... 27
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у пропіонову кислоту ..... 29
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми ..... 30
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу пропіонової кислоти ..... 30
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера для *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 ..... 30
5.1.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря та азоту 31
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів ..... 32

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища ..... 37
5.1.4.1.Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу ..... 38
5.1.4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробництва пропіонової кислоти ..... 39
5.2. Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення пропіонової кислоти ..... 40
5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів ..... 41
5.3.1. Виділення пропіонової кислоти ..... 41
5.3.2. Доочищення елюату ..... 43
5.3.3. Концентрування ..... 44
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу пропіонової кислоти ..... 46
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу пропіонової кислоти ..... 50
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва пропіонової кислоти ..... 62
8.1. Мікробіологічний контроль ..... 62
8.2. Показники росту і синтезу пропіонової кислоти ..... 63
8.2.1. Концентрація біомаси ..... 63
8.2.2. Концентрація пропіонової кислоти ..... 63
8.2.3. Визначення концентрації джерел Карбону та Нітрогену ..... 64
8.3. Карта постадійного контролю ..... 65
РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва ..... 70
РОЗДІЛ 10. Аналіз нормативно-технічної документації та науково-технічної літератури ..... 74
Список використаної літератури ..... 76
ДОДАТКИ ..... 84

# ВСТУП

Пропіонова кислота та її солі мають широку сферу використання, та часто застосовуються в світі як харчові та кормові консерванти. На сьогодні для виробництва пропіонової кислоти зазвичай використовують хімічний спосіб отримання, який полягає в використанні нафтохімічних речовин. За прогнозами глобальний ринок пропіонової кислоти до 2026 року зросте на 3,5 % [1], а через проблеми високої вартості природніх ресурсів та можливі екологічні проблеми, більш цікавим на сьогодні є виробництво пропіонової кислоти з відновлюваних біоресурсів шляхом бродіння з використанням *Propionibacterium*.

Біотехнологічний спосіб отримання пропіонової кислоти все ще поступається хімічному способу отримання, тому вчені приділяють велику увагу дослідженням спрямованим на інтенсифікацію процесу біосинтезу та подальшого виділення. Так на сьогодні є проблема в синтезі пропіонової кислоти за допомогою представників родини *Propionibacterium*, через пригнічення росту мікроорганізмів при досягненні певної концентрації кислоти в культуральній рідині. Для вирішення даної проблеми вчені запропонували використовувати ферментацію з адсорбційним шаром, що на сьогодні є оптимальним варіантом, так як при досягненні лімітувальної концентрації кислоти відбувається рециркуляція культуральної рідини через іонообмінні колони де відбувається адсорбція пропіонової кислоти [2]. Так як за допомогою даного методу вихід кінцевого продукту є в рази більшим в порівнянні з звичайним методом біологічного синтезу, на сьогодні є актуальним пошук нових методів покращення даної технології (пошук нових штамів мікроорганізмів, оптимізація процесу біосинтезу, пошук більш дешевих ростових субстратів та покращення процесу виділення та очищення пропіонової кислоти).

# РОЗДІЛ 1
# ОПИС ПРОПІОНОВОЇ КИСЛОТИ

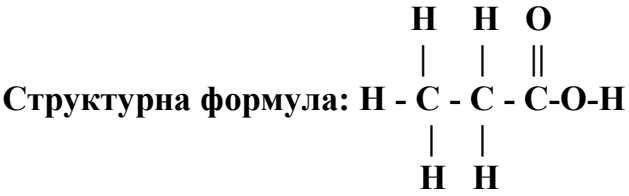
## 1.1. Фізико-хімічні характеристики пропіонової кислоти

Пропіонова кислота — легкозаймиста, корозійна маслянисти рідина із злегка гострим, неприємним, прогірклим запахом. Дана речовина має наступні властивості:

- Молекулярна маса: 74.1
- $T_{(самозайм)}$ — 955 °C;
- $T_{(кип)}$ — 141,1 °C;
- $T_{(спалаху)}$ — 52–58 °C (у відкритому посуді);
- $T_{(пл)}$ –21,5 °C; коефіцієнти розподілу октанол/вода — 0,33;
- показник заломлення *n*D25 – 1,3848;
- змішується з хлороформом, етанолом (95%), етером і водою;

**Хімічна формула: $C_3H_6O_2$**

**Структурна формула:**



## 1.2. Механізм біологічної дії

Пропіонова кислота використовується як антиоксидант і антимікробний консервант в пероральних та місцевих фармацевтичних препаратах; рідше — як етерифікуючий агент. При концентрації до 1% може використовуватись в харчовій промисловості (до 0,3% в борошні і сирних продуктах).

Має антимікробну (бактерицидну та бактеріостатичну) дію, що є ефективним захистом нашого організму щодо патогенних мікроорганізмів, в т.ч. завдяки створенню сприятливого pH-середовища для розвитку дружньої симбіонтної мікрофлори [3, 4].

Більшість антибактеріальної та консервантної активності пропіонової кислоти випливає з метаболічного шляху, оскільки метаболічна частка пропіонатів різна у різних мікроорганізмів, що призводить до антимікробних механізмів дії, які можуть обертатися навколо різних метаболітів пропіонату, викликаючи конкуренцію, інгібування та/або вплив на інші метаболічні шляхи в різних уражених мікроорганізмах. Однак у людському організмі пропіонова кислота, як правило, метаболізується з невеликим негативним впливом і в кінцевому підсумку стає хімічним проміжним продуктом у циклі лимонної кислоти.

Пропіонова кислота легко метаболізується. У чистому вигляді викликає корозію і може призвести до опіків. Рідинна і парова форми є горючими. Концентрована пропіонова кислота шкідлива при ковтанні, вдиханні або коли всмоктується крізь шкіру. Робота з нею потребує використання захисних окулярів, полівінілхлоридних рукавичок і відповідного захисного одягу в добре провітрюваному місці, подалі від джерел тепла та вогню. Несумісна з лугами, аміаком, амінами і галогенами. Може бути висолена з водних розчинів шляхом додавання хлориду кальцію чи інших солей [5].

### 1.3. Виробники пропіонової кислоти та сфери її застосування

Найбільшими світовими виробниками пропіонової кислоти є:

- BASF(Німеччина);
- Perstorp(Швеція);
- Dow Chemical(США);
- Eastman Chemical Company (США).

Застосовується у виробництві гербіцидів, лікарських засобів, ароматичних речовин (багато ефірів пропіонової кислоти мають приємний запах), пластмас, ПАР та в інших хімічних синтезах [6].

Дана кислота пригнічує ріст цвілі та деяких бактерій на рівнях від 0,1 до 1% маси. У результаті частина виробленої пропіонової кислоти споживається як консервант, у кормах для тварин і продуктах для споживання людиною.

Важливим застосуванням в якості консерванту є використання у хлібобулочних виробах, які використовують солі натрію та кальцію.

Як харчова добавка, вона дозволена для використання в ЄС, США, Австралії та Новій Зеландії.

Пропіонова кислота також корисна як проміжний продукт у виробництві інших хімічних речовин, особливо полімерів. Целюлоза-ацетат-пропіонат є корисним термопластом. Також використовується вінілпропіонат. У більш спеціалізованих застосуваннях він також використовується для виробництва пестицидів і фармацевтичних препаратів. Естери пропіонової кислоти мають фруктовий запах і іноді використовуються як розчинники або штучні ароматизатори [7].

# РОЗДІЛ 2
# ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, СКЛАДУ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ

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

Пропіонова кислота – одноосновна карбонова кислота аліфатичного ряду, безбарвна їдка рідина з різким запахом, у природному середовищі зазначена кислота присутня в нафті й формується під час вуглеводного бродіння. В біотехнологічному виробництві пропіонової кислоти в основному використовуються штами *Propionibacterium*, тому розглянемо порівняльну характеристику найбільш відомих продуцентів пропіонової кислоти, яку наведено в табл. 2.1.

*Propionibacterium freudenreichii* T82 має найменший час культивування (120 год), але проявляє найменші показники синтезу пропіонової кислоти 40,2 г/л, що менше в 1,78 та 2,27 рази ніж у *P. acidipropionici* ATCC 4875 і *P. freudenreichii* CICC 10019, відповідно [8].

*Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 проявляє більші показники синтезу пропіонової кислоти по відношеню до *P. freudenreichii T82*, але менші ніж у *P. freudenreichii* CICC 10019, довше вирощується та найпростіше поживне середовище в порівнянні з іншими мікроорганізмами [9].

*Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 – вирощується на гідролізаті з відходів сільськогогосподартсва і має найбільші показники синтезу пропіонової кислоти (91,4 г/л) на відмін від інших продуцентів та найбільший час культивування 258 год [10].

Розглянувши дані з табл. 2.1, складно визначити оптимального продуцента для промислового синтезу пропіонової кислоти, тому переглянемо вартість поживних середовищ для вирощування обраних біологічних агентів.

*Таблиця 2.1*

**Порівняльна характеристика продуцентів пропіонової кислоти**

| Продуцент | Склад поживного середовища, г/л | Концентрація пропіонової кислоти, г/л | Умови культивування | Література |
|---|---|---|---|---|
| *Propionibacterium freudenreichii T82* | Глюкоза – 25;<br>Пептон – 10;<br>Дріжджовий екстракт – 5;<br>$K_2HPO_4$ – 2,5;<br>$C_3H_8ClNO_2S$ – 0,4;<br>$KH_2PO_4$ – 1,5; | 40,2 | pH 7,0<br>30 °C<br>120 год | Piwowarek, K., Lipińska. Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by Propionibacterium freudenreichii strain T82. Antonie van Leeuwenhoek. 2017, 111(6) – 921–932. doi:10.1007/s10482-017-0991-7 |
| *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 | Кукурудзяна патока – 50;<br>Триптон – 5;<br>Дріжджовий екстракт – 10;<br>$K_2HPO_4$ – 0,25;<br>$MnSO_4$ – 0,05; | 71,8 | pH 6,0<br>30 °C<br>240 год<br>100 об/хв | Liu, Z., Ma, C. Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using Propionibacterium acidipropionici. Bioresource Technology. 2012, 114 – 711–714. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.11 |
| *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 | Гліцерол – 43;<br>Гідролізат кукурудзяних стебел* – 17,2;<br>Кукурудзяний лікер – 20;<br>$KH_2PO_4$ – 4,0;<br>$CoCl_2$ – 0,0127;<br>$CaCO_3$ – 4. | 91,4 | pH 7,0<br>30 °C<br>258 год | Wang, P., Jiao, Y. Novel fermentation process strengthening strategy for production of propionic acid and vitamin B12 by Propionibacterium freudenreichii. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2014, 41(12) – 1811–1815. doi:10.1007/s10295-014-1513-5 |

* - Гідродізат кукурудзяних стебел містить 55 г/л глюкози, 1,96 г/л ксилози та сліди арабінози та оцтової кислоти

*Таблиця 2.2*

**Вартість середовища для вирощування *Propionibacterium freudenreichii* T82, *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 та *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019**

| Біологічний агент | Компонент поживного середовища | Вміст, г/л | Ціна за 1 кг компонента, грн/кг | Вартість компонента (грн) на 1л середовища | Джерело інформації (1 – 13)* |
|---|---|---|---|---|---|
| *Propionibacterium freudenreichii* T82 | Глюкоза | 25 | 50 | 1,25 | 1 |
| | Дріжджовий екстракт | 5 | 1 100 | 5,5 | 2 |
| | $C_3H_8ClNO_2S$ | 0,4 | 562 | 0,225 | 3 |
| | Пептон | 10 | 1 188 | 11,88 | 4 |
| | $KH_2PO_4$ | 1,5 | 150 | 0,225 | 5 |
| | $K_2HPO_4$ | 2,5 | 119,28 | 0,298 | 6 |
| | Вартість 1 л середовища – 19,378 грн | | | | |
| *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 | Кукурудзяна екстракт | 50 | 90 | 4,5 | 7 |
| | Триптон | 5 | 1 680 | 8,4 | 8 |
| | Дріжджовий екстракт | 10 | 1 100 | 11 | 2 |
| | $K_2HPO_4$ | 0,25 | 119,28 | 0,0298 | 6 |
| | $MnSO_4$ | 0,05 | 54 | 0,0027 | 9 |
| | Вартість 1 л середовища – 23,933 грн | | | | |
| *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 | Гліцерол | 43 | 125 | 5,375 | 10 |
| | Гідролізат кукурудзяних стебел:<br>Глюкоза<br>Ксилоза | <br>0,935<br>0,033 | <br>50<br>663 | <br>0,046<br>0,022 | <br>1<br>11 |
| | Кукурудзяний екстракт | 20 | 90 | 1,8 | 7 |
| | $KH_2PO_4$ | 4,0 | 119,28 | 0,477 | 6 |
| | $CoCl_2$ | 0,0127 | 330 | 0,004 | 12 |
| | $CaCO_3$ | 4,0 | 6 | 0,024 | 13 |
| | Вартість 1 л середовища – 7,748 грн | | | | |

**Примітка**: * – Ціни вказано станом на травень 2022 р.


1. https://prom.ua/ua/p22960204-glyukoza-dekstroza-pischevaya.html?&primelead=Mg
2. https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html
3. https://flagma.ua/cistein-gidrohlorid-o10300950.html
4. https://flagma.ua/pepton-fermentativniy-o13622945.html
5. https://prom.ua/ua/p151620028-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html
6. https://novohim.com.ua/ua/catalog/promislova-ximiya-j-sirovina/kalij-fosfornokislij-2-zamishhenij/

7. https://flagma.ua/uk/csl-corn-steep-liquor-kukuruzny-liker-o5143193.html

8. https://russian.alibaba.com/p-detail/Tryptone-60463892253.html?spm=a2700.8699010.29.1.67806e4ax1j6JS

9. https://himfarminvest.com.ua/margantsa-sulfat

10. https://him-component.com.ua/p558106379-glitserin-farm-6kg.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjwpv2TBhDoARIsALBnVnmLSWJVnUsgb_BSIhxTFc6vif5k2ts40tSSeM7lkbH5aJy4YwwWFDIaAhjCEALw_wcB

11. https://prom.ua/ua/p734456299-ksiloza-chda.html

12. https://russian.alibaba.com/p-detail/High-643243189.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_image.7aff7712fGFZuX&s=p

13. https://prom.ua/ua/p1552369073-karbonat-kaltsiya-akarb.html

З даних, наведених в табл. 2.2, зрозуміло, що *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 має найнижчу вартість 1 л поживного середовища (7,75 грн), а вартість поживного середовища для *Propionibacterium freudenreichii* T82 та *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 майже в 2,5 та 3,1 рази більша, відповідно, але враховуючи різний час культивування та різну синтезувальну властивість даних мікроорганізмів, визначених даних не достатньо для вибору найкращого продуцента. Щоб повність впевнитись, що обраний представник є кращим біологічним агентом, потрібно розрахувати умовну вартість 1 г пропіонової кислоти і кількість утвореної пропіонової кислоти за годину.

В табл. 2.3 наведено порівняння вартості 1 г пропіонової кислоти у *P. freudenreichii* T82, *P. acidipropionici* ATCC 4875 *та P. freudenreichii* CICC 10019.

*Таблиця 2.3*

**Умовна вартість 1 г пропіонової кислоти при культивувані *Propionibacterium freudenreichii* T82, *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 та *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019**

| Біологічний агент | Вартість 1 л середовища, грн | Концентрація пропіонової кислоти, г/л | Умовна вартість 1 г пропіонової кислоти, грн/г | Час культивування, год | Кількість утвореної пропіонової кислоти за годину, г/год |
|---|---|---|---|---|---|
| *Propionibacterium freudenreichii* T82 | 19,378 | 40,2 | **0,482** | 120 | **0,335** |
| *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 | 23,933 | 71,8 | **0,333** | 240 | **0,299** |
| *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 | 7,75 | 91,4 | **0,085** | 258 | **0,354** |

Підсумовуючи вищезазначене робимо висновок, що *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 має найменший показник кількості синтезованої пропіонової кислоти за годину при відносно непоганому показнику вартості 1 г цільового продукту, а *Propionibacterium freudenreichii* T82 має найбільший показник умовної вартості 1 г пропіонової кислоти та в порівнянні з *P. acidipropionici* ATCC 4875 більший показник утвореної кислоти за годину, але данні біологічні агенти в порівнянні з *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 мають гірші показники по обидвом критеріям. Так *P. freudenreichii* CICC 10019 має найбільший показник утвореної кислоти за годину та найменшу умовну вартість 1 г пропіонової кислоти що майже в 3,9 та 5,7 рази більше в порівнянні з *P. Acidipropionici* ATCC 4875 та *P. freudenreichii* T82.

Отже, в якості основного продуцента пропіонової кислоти, доцільно обрати *P. freudenreichii* CICC 10019, через високу концентрацію синтезованої кислоти за 1 годину і невисоку умовну вартість пропіонової кислоти в порівнянні з іншими продуцентами.

## 2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

***Визначення вмісту азоту***

Дано:

Кукурудзяний екстракт – 20 г/л

Згідно статті [11] вміст азоту в кукурудзяному екстракті 8,2 %, отже:

$$20 \times 8{,}2\ \% = 1{,}64\ \text{г/л}$$

Враховуючи, що клітина в своєму складі містить 10 % азоту від усіх компонентів, для визначення концентрації біомаси, отримане значення необхідно збільшити в 10 разів:

$$1{,}64 \times 10 = 16{,}4\ \text{г/л}$$

Отже, розрахована теоретично можлива концентрація біомаси при використанні 20 г/л кукурудзяного екстракту, за азотом дорівнює 16,4 г/л.

***Визначення вмісту вуглецю***

Дано:

Гліцерин ($C_3H_8O_3$) = 43 г/л;

M($C_3H_8O_3$) = 92 г/моль;

M($C_3$) = 36 г/моль;

Кількість вуглецю з гліцерину:

$$\frac{\mathrm{M(C_3)} \times \mathrm{C_3H_8O_3}}{\mathrm{M(C_3H_8O_3)}} = \frac{36 \times 43}{92} = 16{,}82$$

Також в поживному середовищі наявний гідролізат кукурудзяних стебел 17 г/л, який за хімічним складом в 1 л містить 55 г/л глюкози та 1,96 г/л ксилози. Тоді в поживному середовищі наступна кількість даних речовин:

$$17 \times 55 / 1000 = 0{,}935\ \text{г/л глюкози}$$

$$17 \times 1{,}96 / 1000 = 0{,}033\ \text{г/л ксилози}$$

$C_5H_{10}O_5$ = 0,033 г/л;

M($C_5H_{10}O_5$) = 150 г/моль;

M($C_5$) = 60 г/моль;

Кількість вуглецю з ксилози:

$$\frac{M(C_5) \times C_5H_{10}O_5}{M(C_5H_{10}O_5)} = \frac{60 \times 0{,}033}{150} = 0{,}0132$$

$C_6H_{12}O_6$= 0,935 г/л;

$M(C_6H_{12}O_6)$ = 180 г/моль;

$M(C_6)$ = 72 г/моль;

Кількість вуглецю з глюкози:

$$\frac{M(C_6) \times C_6H_{12}O_6}{M(C_6H_{12}O_6)} = \frac{72 \times 0{,}935}{180} = 0{,}374$$

Загальний вміст вуглецю становить:

$$0{,}0132 + 0{,}374 + 16{,}82 = 17{,}207$$

Знаючи те, що клітина складається на 50 % з вуглецю, для встановлення концентрації біомаси, отримане значення необхідно збільшити вдвічі:

$$17{,}207 \times 2 = 34{,}4 \text{ г/л}$$

Також необхідно врахувати холосте окислення, на яке витрачається близько 50 % вуглецю, отже, можливий вихід біомаси за вуглецем становитиме 17,207 г/л.

З проведених розрахунків можна зробити наступний висновок: в якості лімітуючого фактору в даному поживному середовищі виступає азот, що призводить до припинення росту при споживанні всього азоту. Тоді, максимальний рівень біомаси становить 16,4 г/л. Розрахуємо яка кількість вуглецю потрібна для синтезу пропіонової кислоти кислоти.

Дано:

Концентрації пропіонової кислоти – 91,4 г/л

$M(C_3H_6O_2)$ = 74 г/моль;

$M(C_3)$ = 36 г/моль;

$$\frac{Ar(C_3) \times C_3H_6O_2}{M(C_3H_6O_2)} = \frac{36 \times 91{,}4}{74} = 44{,}5$$

Враховуючи що на синтез біомаси піде 16,4 вуглецю тоді на синтез пропіонової кислоти залишається 17,207 – 16,4 = 0,807 вуглецю, а нам

необхідно 44,5 не вистачає 44,5 - 0,807 = 43,7, розрахуємо яку кількість гліцерину необхідно додати до складу поживного середовища.

$$\frac{M(C_3) \times C_3H_8O_3}{M(C_3H_8O_3)} = \frac{36 \times X}{92} = 43{,}7$$

$$X = \frac{43{,}7 \times 92}{36} = 111{,}7 \text{ г/л}$$

Отже, що б забезпечити необхідну кількість вуглецю на синтез 91,4 г/л пропіонової кислоти необхідно внести в середовище додаткові 111,7 г/л гліцерину, тобто збільшити кінцеву концентрацію гліцерину до 154,7 г/л. Враховуючи велику концентрацію джерела вуглецю доцільно проводити виробничий синтез з внесенням джерела вуглецю дробно.

### 2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019

*Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 - є грампозитивною, мезофільною, аеротолерантною, нерухомою, неспороутворюючою бактерією з високим вмістом ГХ. Нерухомі палички розміром 0,5–0,8 на 1,0–1,5 мкм, мікроорганізм. У молодих культурах – викривлені, злегка розгалужені палички, у старіших — кокоподібної форми.

Утворюють колонії жовтого, оранжевого або червоного кольору, ростуть як в анаеробних, так і в аеробних умовах. Непатогенні, мешкають у рубці та кишечнику жуйних тварин, у молочних продуктах (твердих сирах), є представниками резидентної мікрофлори кишечника людини. [12]

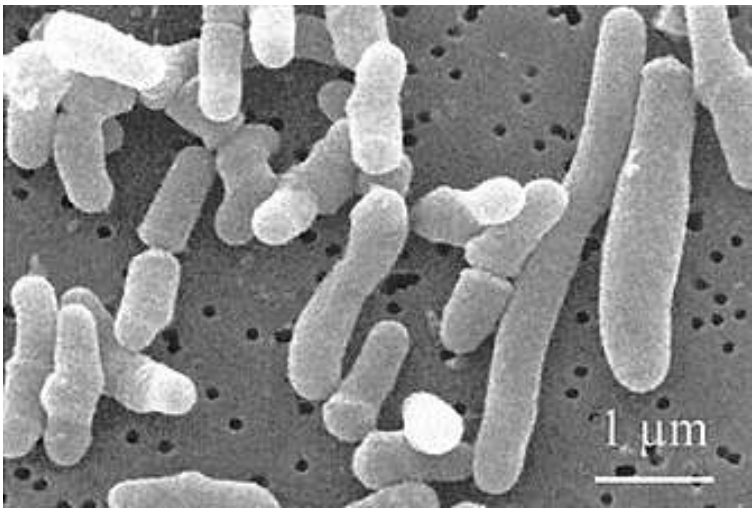



*Рис.2.1.* ***Propionibacterium freudenreichii***

*P. freudenreichii* – належить до факультативних анаеробів, максимальне зростання спостерігається при температурі 30–37°C та нейтральній кислотності (pH близько 7,0). На відміну від інших видів, *P. freudenreichii* може рости в сирному батоні при 3,8 і 6,8 °C. Тим не менш, лактатдегідрогеназа нечутливих до холоду і холодочутливих штамів завжди активна при 5 °C, приблизно одна третина активності при 30 °C. Крім того, культури пропіонібактерій все ще живі і здатні рости після зберігання протягом кількох тижнів при 5 °C у багатому середовищі.

*P. freudenreichii* може використовувати кілька джерел вуглецю (наприклад, гліцерин, еритріол, L-арабіноза, адонітол, галактозу, D-глюкоза, D-маноза, D-фруктоза, арбутин, інозитол, ескулін, лактозу, лактат і глюконат).

На відміну від інших видів, *P. freudenreichii* здатний відновлювати піруват до пропіонату за допомогою транскарбоксилазного циклу (також званого циклом Вуда-Веркмана), який є циклічним процесом у поєднанні з окисним фосфорилюванням, що забезпечує вищий вихід АТФ, ніж у інших пропіонатів [13, 14]

### 2.4. Таксономічний статус *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019

Сучасна (філогенетична) класифікація для *P. freudenreichii* наведена згідно з другим виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій [15].

домен *Bacteria*

тип *Actinobacteria*

клас *Actinobacteria*

порядок *Propionibacteriale*s

сімейство *Propionibacteriaceae*

рід пропіоновокислих бактерій (*Propionibacterium*)

вид *Propionibacterium freudenreichii*

штам *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019

# РОЗДІЛ 3
# ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

## 3.1. Потреба в пропіоновій кислоті

Серед наведених в першому розділі сфер застосування, найбільш цікавим на сьогодні є використання в якості харчового консерванту. Дану речовину схвалено управлінням з харчових продуктів і медикаментів США (FDA) до використання в лікарських препаратах для тварин, кормах та супутніх продуктах, хімічних консервантах, та визнана загально безпечною харчовою речовиною [16]. Добавка Е 280 не токсична і не несе ніякого негативного впливу на репродуктивні органи. В організмі людини швидко окислюється і виводиться з нього [17].

Дана кислота пригнічує ріст цвілі та різних бактерій та використовується як консервант для їжі (особливо хліба та інших хлібобулочних виробів, як її солі натрію або кальцію), корму для тварин (безпосередньо або як його амонійної солі) і зерна [18]. Хоч дана речовина визнана безпечною у світі та постійно використовуються, вона не входить до списку добавок, дозволених для використання у харчових продуктах в Україні, тому використовувати її в харчових продуктах неможливо [17].

Через неможливість використання в харчових продуктах, слід розглянути використання пропіонової кислоти в якості консерванту для зерна. При даному застосуванні можна досягти наступних переваг: знижує pH зерна до рівня, який запобігає розвитку цвілі та мікотоксинів, а також може покращити рівень енергії зерна для годування худоби, та як відзначають у Департаменті сільського господарства, охорони навколишнього середовища та сільських справ, при обробленні пропіоновою кислотою зерна зникає необхідність його сушіння.

Враховуючи переваги використання пропіонової кислоти в якості консерванту зерна, а також дані від продовольчої та сільськогосподарської організації ООН (FAO), що втрати зерна і зернопродуктів під час зберігання щороку становлять 10–15% [19], дане використання в Україні є оптимальним так як вирощування даного продукту в нашій країні є одним з головних пунктів економічних прибутків за рахунок експорту в інші країни.

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Встановивши спосіб застосування пропіонової кислоти розрахуємо теоретичну потребу в рік. В 2021 році аграріями було зібрано понад 106 млн. тон зерна [20]. Дане значення включає в себе всі зернові культури на всій території України, тому для подальших розрахунків оберемо оприлюднені Державною службою статистики України дані зібраного врожаю пшениці в Вінницькій області, які становлять 327 196,7 центнер [21].

Слід також врахувати що не всі виробники будуть використовувати даний метод при зберіганні зерна, а також слід врахувати жорсткі конкуруючі умови на ринку, тому доцільно припустити що потреба яку ми зможемо покрити буде становити 2,5 % від зібраної кількості пшениці.

$$327\ 196{,}7\ \text{ц} \times 2{,}5\ \% = 8\ 180\ \text{ц}$$

Для пропіонової кислоти наведено норми внесення для оптимального ефекту консервування, так для зберігання цільного зерна вологістю 20 % необхідно внести 7,5 л пропіонової кислоти на тонну зерна, тоді потреба в пропіоновій кислоті буде становити [22]:

$$8\ 180\ \text{ц} \times 0{,}1 \times 7{,}5 = 6\ 135\ \text{л}$$

Отже, річна потреба в пропіоновій кислоті для використання в якості консерванту зерна, буде становити 6,14 м$^3$.

### 3.3. Розрахунок об’єму ферментера та кількості виробничих циклів

Спочатку для розрахунку приймаємо наступні вихідні дані:

- річна потужність підприємства, $G_{гп}$ = 6 140 м$^3$/рік
- кількість робочих днів у рік $T_{рд}$ = 250 днів
- концентрація продукту в культуральній рідині $P_{кр}$= 91,4 кг/м$^3$

- сухих речовин (СР) в готовому продукті (0,9-0,95) $СР_{гп} = 0,95$

- час виробничого циклу $Т_{цк} = 268$ год

- коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини від можливих нестерильних операцій), 1,1-1,5; $К_1 = 1,1$

- коефіцієнт заповнення ферментера для анаеробного культивування $К_ф = 0,7$

- сумарні втрати при виділенні пропіонової кислоти (сума всіх втрат по стадіям виділення пропіонової кислоти) $Е_{св} = 0,2$

- втрати культуральної рідини при біосинтезі (крапевинос), 0,05- 0,2) $Е_ф = 0,1$

### 3.3.1. Розрахунок кількості партій продукту пропіонової кислоти (виробничих циклів)

1.1. Кількість ферментацій на рік

$$N_{цк} = 24 \times К_1 \times Т_{рд}/Т_{цк} = 24 \cdot 1,1 \cdot 250/268 = 24,6$$

Округляємо до цілого в більшу сторону $N_{цк} = 25$

1.2. Кількість пропіонової кислоти за цикл, кг/цикл

$$G_{цк} = G_{гп}/N_{цк} = 6\ 140/\ 25 = 245,6$$

1.3.Об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію з врахуванням втрат при виділенні пропіонової кислоти Есв, $м^3$

$$\mathbf{V}_{кр} = G_{цк} \cdot СР_{гп}/Р_{кр} \cdot (1-Е_{св}) = 245,6 \cdot 0,95/94,1(1-0,2) = 3,1$$

1.4. Робочий об'єм ферментера, $V_ф$, $м^3$

$$V_ф = V_{кр}/(1-Е_ф) = 3,5$$

1.5. Приблизний геометричний об'єм ферментера, $м^3$

$$V_{пф} = V_ф/К_ф = 5,0$$

1.6. З таблиці Технічні характеристика ферментерів вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, $м^3$ $V_{гф} = 5,0$

1.7. Уточнюємо коефіцієнт заповнення $К_{уф}$,частка

$$К_{уф} = V_ф/V_{гф} = 3,5/5,0 = 0,70$$

Перевірене значення $К_{уф}$ відповідає вибраному діапазону - 0,65 - 0,8

### 3.3.2. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримуємо $V_{пц}$ = 3,1 м$^3$ культуральної рідини. При отриманні культуральної рідини потрібно врахувати втрати які є результатом краплевиносу, які дорівнюють 10%.

Отже, об’єм середовища та посівного матеріалу на початку виробничого синтезу пропіонової кислоти становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1-\text{E}_{\text{ф}}} = \frac{3,1}{1-0,1} = 3,5 \text{ м}^3$$

**Розрахунок розчину підживлення**

Загальний об'єм поживного середовища у ферментері $V_{псф}$ = 3 500 л

Початкова концентрація субстрату в культуральній рідині

$C_п$ = 44 г/л (кг/м$^3$)

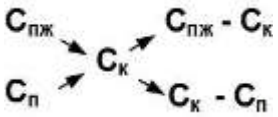
Кінцева концентрація субстрату в культуральній рідині

$C_к$ = 156 г/л (кг/м$^3$)

Розчин підживлення з концентрацією $C_{пж}$ = 1000 г/л (кг/м$^3$)

Кількість підживлень n = 4

1. Розрахунок початкового об’єму поживного середовища і розчину підживлення (за правилом хреста)




$\Delta 1 = C_{пж} – C_к = 1000 – 156 = 844$

$\Delta 2 = C_к – C_п = 156 – 44 = 112$

Визначаємо співвідношення $C_{св}$= Δ211:Δ28 = 7,53

Початковий об’єм поживного середовища $V_{пс1}$

$$V_{пс1} = V_{псф}/(1+1/C_{св}) = 3\ 090 \text{ л}$$

Об’єм розчину підживлення $V_{рп}$

$$V_{рп} = V_{пс1}/ C_{св}=410 \text{ л}$$

Перевірка $V_{псф} = V_{пс1}+ V_{рп} = 3\ 090 + 410 = 3\ 500$ л

3. Розрахунок об’єму розчину на одноразове підживлення $V_{рп1,}$ л та маси джерела субстрату $m_{c1}$, кг

$$V_{рп1} = V_{рп} /n = 410/4 = 102,5 \text{ л}$$

$$m_{с1} = (V_{рп1} \cdot C_{пж})/1000 = 102,5 \cdot 1000/ 1000 = 102,5 \text{ кг}$$

4. Перевірка розрахунку за сумарною кінцевою масою джерела субстрату

$$m_к = (V_{псф} \cdot C_к)/1000 = 3\ 500 \cdot 156 /1000 = 546 \text{ кг}$$

$m_к = (V_{пс1} \cdot C_п)/1000 + n \cdot m_{с1} = (3\ 090 \cdot 44)/1000 + 4 \cdot 102,5 = 546$ кг.

Отже, розрахунок зроблено вірно, та подальші розрахунку будуть проводитись по визначеному початковому об'єму поживного середовища - 3 090 л.

Робочий об'єм ферментера складається з сумарного об'єму поживного середовища (ПС) $V_{пс1}$ і посівного матеріалу (ПМ) $V_{пм1}$.

Посівний матеріал отримують в посівному апараті (ПА), об'єм посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища який вноситься в ферментер:

$$V_{пс1} = V_{роб1}/(1+X_{пм1}) = 3,09 / (1 + 0,1) = 2,81 \text{ м}^3$$

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 3,09 – 2,81 = 0,28 \text{ м}^3$$

*Поживне середовище та посівний матеріал для стадії отримання інокуляту в посівному апараті*

Посівний матеріал вирощують в посівному апараті з наступним робочим об'ємом $V_{роб2}$

$$V_{роб2} = V_{пм1}/(1-E_{пм}) = 280 / (1 – 0,1) = 311 \text{ л}$$

де $E_{пм}$ становить 0,1 та є втратами культуральної рідини при отриманні посівного матеріалу в посівному апараті через краплевинос під час аерації.

Щоб отримати посівний матеріал необхідно передбачити наступні об'єми поживного середовища $V_{пс2}$ і посівного матеріалу:

$$V_{пс2} = V_{роб2}/(1+X_{пм2}) = 311 / (1 + 0,1) = 283 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 311 – 283 = 28 \text{ л}$$

Для встановлення геометричного об'єму посівного апарата $V_{па1}$ використаємо робочий об'єм та коефіцієнт заповнення (0,6).

$$V_{па1} = V_{роб2} / К_{зап} = 311 / 0,6 = 518 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 отримують при вирощувані біологічного агента в посівному апараті з об'ємом $V_{па} = 630$ л.

Дійсний коефіцієнт заповнення становитиме

$$К_{зап2} = V_{роб2} / V_{па} = 311 / 630 = 0,5,$$

дане значення є допустимим, тому даний об'єм посівного апарат вибрано правильно.

*Поживне середовища та посівний матеріла для стадії отримання інокуляту в інокуляторах*

Посівний матеріал для засіву посівного апарата об'ємом 630 л вирощують в інокуляторі з наступним робочим об'ємом $V_{роб3}$

$$V_{роб3} = V_{пм3}/(1-Е_{пм3}) = 28 / (1 – 0,05) = 29,5 л,$$

де $Е_{пм3}$ становить 0,05 та є втратами культуральної рідини при отриманні посівного матеріалу в посівному апараті через краплевинос під час аерації

Щоб отримати посівний матеріал необхідно передбачити наступні об'єми поживного середовища $V_{пс3}$ та посівного матеріалу

$$V_{пс3}= V_{роб3}/(1+Х_{пм3}) = 29,5 / (1 + 0,1) = 26,8 л$$

Об'єм посівного матеріалу:

$$V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 29,5 – 26,8 = 2,7 л$$

Для встановлення геометричного об'єму посівного апарата $V_{па1}$ використаємо робочий об'єм та коефіцієнт заповнення (0,6).

$$V_{ін1} = V_{роб3} / К_{зап} = 29,5 / 0,6 = 49,2 л$$

Дану кількість посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 отримують при вирощувані біологічного агента в інокуляторі з об'ємом $V_{ін1} = 60$ л.

Дійсний коефіцієнт заповнення становитиме

$$К_{зап1} = V_{роб3} / V_{ін} = 29,5 / 60 = 0,492, що допустимо.$$

Посівний матеріал для інокулятора об'ємом 60 л вирощують в інокуляторі з наступним робочим об'ємом $V_{роб4}$

$$V_{роб4} = V_{пм3}/(1-Е_{пм3}) = 2,7 / (1 – 0,05) = 2,84 л,$$

де $Е_{пм3}$ становить 0,05 та є втратами культуральної рідини при отриманні посівного матеріалу в посівному апараті через краплевинос під час аерації

Щоб отримати посівний матеріал необхідно передбачити наступні об'єми поживного середовища $V_{пс3}$ та посівного матеріалу

$$V_{пс4}= V_{роб4}/(1+X_{пм4}) = 2,84 / (1 + 0,1) = 2,58 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу:

$$V_{пм4} = V_{роб4} - V_{пс4} = 2,84 – 2,58 = 0,26 \text{ л}$$

Для встановлення геометричного об’єму посівного апарата $V_{па1}$ використаємо робочий об’єм та коефіцієнт заповнення (0,6).

$$V_{ін2} = V_{роб4} / К_{зап} = 2,84 / 0,6 = 4,7 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 отримують при вирощувані біологічного агента в інокуляторі з об’ємом $V_{ін1} = 5$ л.

Дійсний коефіцієнт заповнення становитиме

$$К_{зап4} = V_{роб4} /V_{ін} = 2,84 / 5 = 0,56, \text{ що допустимо.}$$

*Поживне середовища та посівний матеріла для стадії отримання інокуляту в колбах на качалці*

Об’єм посівного матеріалу, що вирощують в качалочних колбах становить $V_{пм4} = 0,26$ л. Втратами нехтуємо, оскільки вони незначні.

$$V_{роб5}= V_{пм4} = 0,26 \text{ л}$$

Щоб отримати посівний матеріал необхідно передбачити наступні об’єми поживного середовища $V_{пс5}$ та посівного матеріалу

$$V_{пс5}= V_{роб5}/(1+X_{пм5}) = 0,26 / (1 + 0,1) = 0,24 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу:

$$V_{пм5} = V_{роб5} – V_{пс5} = 0,26 – 0,24 = 0,02 \text{ л}$$

Для вирощування використовуємо стандартні качалочні колби об’ємом $V_{кол} = 0,75$ л та з коефіцієнтом заповнення $К_{зап} = 0,2$

Кількість качалочних колб

$$N_к = V_{роб5}/V_{кол}\times К_{зап} = 0,26 / 0,75\cdot0,2 = 1,73, \text{ отже приймемо 2 колби}$$

Підсумовуючи, для отримання посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 для синтезу пропіонової кислоти у ферментері об'ємом 5 $м^3$ і з коефіцієнтом заповнення 0,7, необхідно провести отримання посівного матеріалу в чотири стадії.

*Таблиця 3.1*

**Узагальнені дані об’ємів апаратів необхідних для підготовки посівного матеріалу та виробничого синтезу пропіонової кислоти**

| Стадія | Геометричний об’єм, $V_г$, л | Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка | Робочий об’єм, $V_{роб}$, л | Об’єм ПС, $V_{пс}$, л | Об’єм ПМ, $V_{пм}$, л |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,750 × 2 колби | 0,2 | 0,26 | 0,24 | 0,02 |
| 2 | 5 | 0,56 | 2,84 | 2,58 | 0,26 |
| 3 | 60 | 0,49 | 29,5 | 26,8 | 2,7 |
| 4 | 630 | 0,5 | 311 | 283 | 28 |
| 5 | 5 000 | 0,7 | 3 500 | 2 810 | 280 |

# РОЗДІЛ 4
# БІОСИНТЕЗ ПРОПІОНОВОЇ КИСЛОТИ

## 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019

Для біологічного агента *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 джерелами вуглецю виступають гліцерол та глюкоза. Оскільки в базі KEGG немає інформації стосовно саме цього штаму, користуватимемося схемою, наведеною для *P. freudenreichii* subsp. freudenreichii DSM 20271 [23]. Глюкоза даним мікроорганізмом катаболізується шляхом гліколізу. Спочатку здійснюється перетворення на глюкозо-6-фосфат за участю поліфосфатглюкокінази [КФ: 2.7.1.63]. Після цього відбувається ізомеризація глюкозо-6-фосфату в фруктозо-6-фосфат при впливі глюкозо-6-фосфат-ізомерази [КФ: 5.3.1.9], який потім фосфорилюється за допомогою 6-фосфофруктокінази [КФ: 2.7.1.11] з утворенням фруктозо-1,6-дифосфату. Ця сполука внаслідок дії фруктозо-бісфосфатальдолази II класу [КФ: 4.1.2.13] розщеплюється на гліцеральдегід-3-фосфат і гліцеронфосфат, які можуть трансформуватись один в одного у присутності тріозофосфатізомерази [КФ: 5.3.1.1]. Утворений гліцеральдегід-3-фосфат окиснюється (з утворенням 2 молекул НАДН) до 1,3-дифосфогліцерату (фермент – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа [КФ: 1.2.1.12]), який у подальшому дефосфорилюється за участі фосфогліцераткінази [КФ: 2.7.2.3] з утворенням 3-фосфогліцерату, котрий ізомеризується в 2-фосфогліцерат під дією 2,3-бісфосфогліцерат-залежної фосфогліцерат-мутази [КФ: 5.4.2.11]. 2-фосфогліцерат за допомогою енолази [КФ: 4.2.1.11] переходить у фосфоенолпіруват, після чого піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40] каталізує відщеплення молекули АТФ, забезпечуючи таким чином утворення пірувату, котрий далі залучається до циклу трикарбонових кислот.

Гліцерол спершу перетворюється на гліцеральдегід і гліцерон. Утворений гліцеральдегід під дією альдегіддегідрогенази [КФ: 1.2.1.3] окиснюється до гліцерату, який у подальшому фосфорилюється за участі гліцерат-2-кінази [КФ: 2.7.1.165] до 2-фосфогліцерату, котрий метаболізується до піровату за тими ж самими реакціями, що й в гліколізі. Гліцерон же фосфорилюється дигідроксиацетонкіназою [КФ: 2.7.1.121] до гліцеронфосфату, котрий залучається до реакцій гліколізу.

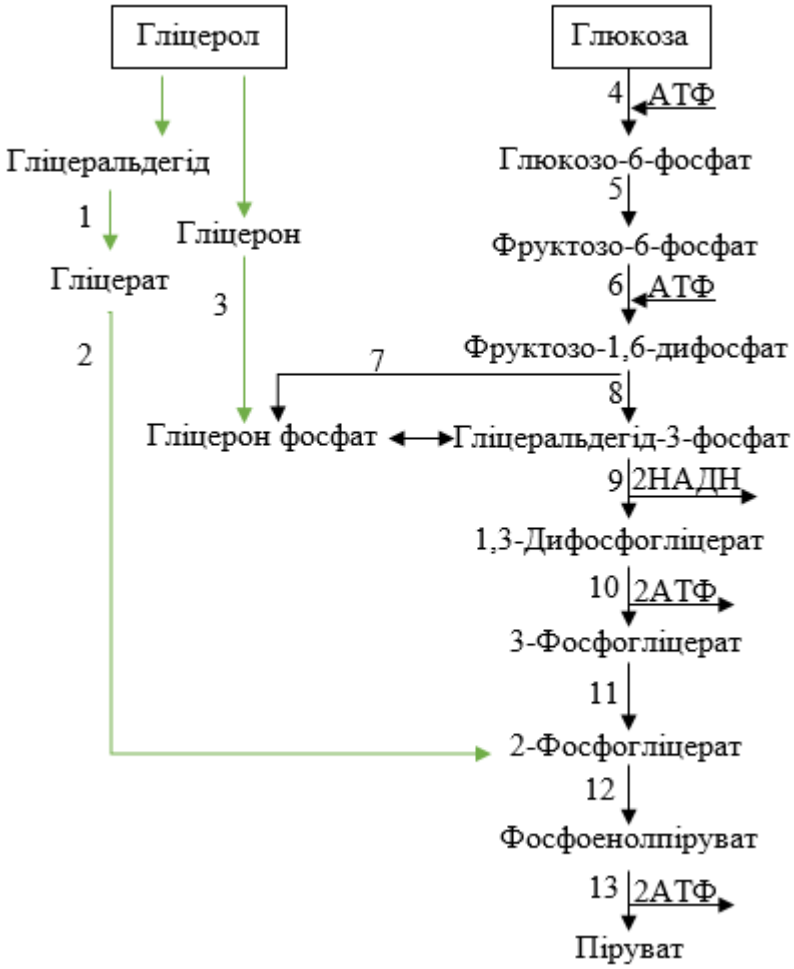



*Рис 4.1.* **Катаболізм глюкози та гліцеролу у *Propionibacterium freudenreichii*.**

**Ферменти**: 1 – альдегіддегідрогеназа [КФ: 1.2.1.3]; 2 – гліцерат-2-кіназа [КФ: 2.7.1.165]; 3 – дигідроксиацетонкіназа [КФ: 2.7.1.121].4 – поліфосфатглюкокіназа [КФ: 2.7.1.63]; 5 – глюкозо-6-фосфат ізомераза [КФ: 5.3.1.9]; 6 – 6-фосфофруктокіназа [КФ: 2.7.1.11]; 7 – тріозофосфат ізомераза [КФ: 5.3.1.1]; 8 – фруктозо-бісфосфат альдолаза [КФ: 4.1.2.13]; 9 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа [КФ: 1.2.1.12]; 10 –

фосфогліцераткіназа [КФ: 2.7.2.3]; 11 – 2,3-бісфосфогліцерат-залежна фосфогліцерат-мутаза [КФ: 5.4.2.11]; 12 – енолаза [КФ: 4.2.1.11]; 13 – піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40].

### 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у пропіонову кислоту

Під час росту *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSM 20271 з використанням глюкози та гліцерину в якості джерела вуглецю внаслідок катаболізму даних речовин утворюється піруват, який далі за допомогою піруватдегідрогенази [КФ: 1.2.4.1] трансформується в ацетил-КоА, який в подальшому залучається до циклу трикарбонових кислот.

Реакції катаболізму в циклі трикарбонових кислот відбуваються в наступному порядку цитрат, ізоцитрат, 2-оксоглутарат, сукциніл-КоА, сукцинат, фумарат, малат, оксалоацетат, за участі ферментів цитратсинтази [КФ: 2.3.3.1], аконітази [КФ: 4.2.1.3], ізоцитратдегідрогенази [КФ: 1.1.1.42], 2-оксоглутаратдегідрогенази [КФ: 2.3.1.61], сукциніл-КоА:ацетат-КоА-трансферази [КФ: 2.8.3.18], сукцинатдегідрогенази [КФ: 1.3.5.1], фумаратгідратази [КФ: 4.2.1.2] та малатдегідрогенази [КФ: 1.1.1.37 ], відповідно.

Першим етапом синтезу пропіонової кислоти з циклу трикарбонових кислот є перетворення сукциніл-КоА в (R)-Метилмалоніл-КоА, який в подальшому проходить наступні перетворення (S)-метилмалоніл-КоА, пропаноїл-КоА, пропіонілфосфат, дані реакції відбуваються за участі метилмалоніл-КоА мутази [КФ: 5.4.99.2], метилмалоніл-КоА/етилмалоніл-КоА епімерази [КФ: 5.1.99.1], метилмалоніл-КоА карбокситрансферази [КФ: 2.1.3.1] та фосфатацетилтрансферази [КФ: 2.3.1.8], відповідно.

Заключним етапом синтезу пропіонової кислоти за допомогою *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSM 20271 є перетворення пропіонілфосфату за участі ацетаткінази [КФ: 2.7.2.1] в пропіонову кислоту.

Схематичне зображення біотрансформації глюкози та гліцерину в пропіонову кислоту у *Propionibacterium freudenreichii* наведено в додатку 1.

# РОЗДІЛ 5
# ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

## 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу пропіонової кислоти

### 5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера для *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019

*Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 – представник роду *Propionibacterium,* який використовується для синтезу пропіонової кислоти. Оскільки оптимальна температура культивування 30 °C, а рівень pH 7,0 то даний мікроорганізм є мезофільним нейтрофілом. Враховуючи що такі умови є сприятливими для росту більшості мікроорганізмів, необхідно проводити вирощування в асептичних умовах, для уникнення контамінації.

З огляду на вище зазначену інформацію виробничий синтез пропіонової кислоти має відбуватись глибинним способом, що дозволить зменшити ризик контамінації. Оскільки максимальний синтез пропіонової кислоти проходить в стаціонарній фазі росту біологічного агента, процес повинен бути періодичним.

*P. freudenreichii* CICC 10019 є факультативним анаеробом, тобто він може рости з доступом повітря і без нього, але, враховуючи, що синтез пропіонової кислоти відбувається в анаеробних умовах, необхідно передбачити безперервну подачу інертного газу під час виробничого біосинтезу.

Підсумовуючи, культивування *P. freudenreichii* CICC 10019 з метою отримання високої концентрації пропіонової кислоти буде здійснюватися періодичним глибинним способом без доступу кисню в асептичних умовах.

Для вибору ферментера необхідно врахувати особливості *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019, а також економічні аспекти виробничого процесу.

Визначивши що синтез пропіонової кислоти відбувається в строго анаеробних умовах, обов'язковим є створення безкисневих умов що можна досягти безперервною подачею інертного газу (аргону або азоту) для видалення надлишкового кисню.

Оптимальною температурою росту *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 є 30 °C, для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою в яку подаватимуть глуху пару або холодну воду та датчиком температури щоб контролювати її рівень.

Щоб контролювати рівень pH в процесів вирощування продуцента ферментер оснащують датчиком pH.

Отже, виробничий ферментер буде оснащений датчиками рівня pH, температури, мішалкою, сорочкою та пристроєм для подачі інертного газу (азоту).

### 5.1.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря та азоту

*Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 є факультативний анаероб, тобто може рости як за анаеробних умов так і за аеробних умов, основна різниця даних умов полягає в впливі на синтез пропіонової кислоти, так за аеробних умов дана культура представляє краще накопичення біомаси, а за анаеробних умов відбувається над синтез пропіонової кислоти. Отже для технологічного процесу отримання пропіонової кислоти використовуючи *P. freudenreichii* CICC 10019 необхідно передбачити підготовку, як аераційного повітря (для стадій отримання посівного матеріалу в інокуляторах та посівному апараті), так і азоту який використовуватимуть для видалення надлишкового кисню з метою створення анаеробних умов культивування (для стадію виробництва пропіонової кислоти).

Для отримання готового стерильного повітря потрібно пройти наступні стадії:

- забір повітря (у найвищій точці будівліН ~ 17 м за допомогою вертикальної труби з повітрозабірником);
- очищення на тканинних фільтрах грубого очищення відібраного повітря від пилу (δ > 50 мкм);
- подача повітря в компресор для стиснення (під час даного етапу відбувається нагрівання повітря до 120 – 200ºС);
- охолодження повітря для конденсації вологи;
- видалення вологи в ресивері а також зменшення пульсаційних рухів повітря;
- нагрів до 45–50 ºС та стабілізування тиску;
- очищення пропускаючи через головний фільтр, ступінь очищення повинен відповідати 95%;
- очищення перед подачею в апарат в індивідуальних фільтрах ступінь очищення повинен відповідати 99,99%.

На стадіях підготовки азоту використовуватимемо азоту з балонів тому подаватимемо його в очищувач балонних газів та в подальшому пропускатимемо через індивідуальний фільтр, після проходження фільтру ступеню очищення повинен становити 99,9%.

### 5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробничий процес біосинтезу пропіонової кислоти культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019, відбувається впродовж 250 діб та проходить в ферментері об'ємом 5 м$^3$, з приготування посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 в посівному апараті 0,63 м$^3$ та інокуляторах 60 та 5 л. Технологічний процес проходить в приміщені виробничого синтезу пропіонової кислоти, приміщенні отримання посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019, приміщені для вирощування *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 в качалочних колбах та мікробіологічній лабораторії, для контролю виробництва.

Графічне зображення теоретичного плану приміщення для технологічного процесу синтезу пропіонової кислоти представлено на рис. 5.1.

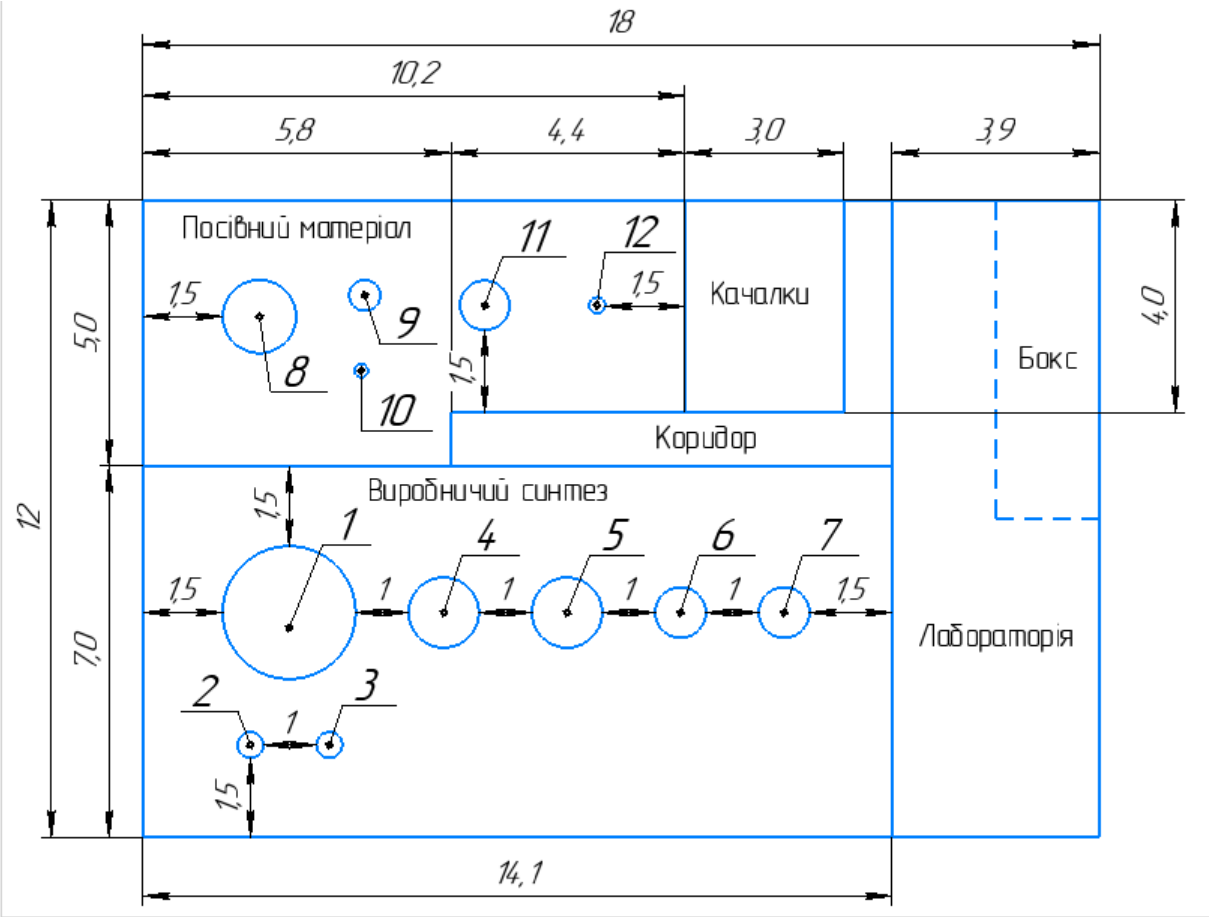



*Рис. 5.1.* **Ескіз планування виробничих приміщень для виробництва пропіонової кислоти**

Розміри представленого на рис. 5.1 обладнання описано в табл. 5.1.

*Таблиця 5.1*

**Габаритні розміри обладнання для біотехнологічного синтезу пропіонової кислоти**

| Поз. | Обладнання | Геометричний об'єм, л | Діаметр, м | Висота, м |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Ферментер | 5 000 | 2,5 | 5,6 |
| 2 | Реактор-змішувач для приготування 6 % хлоридної кислоти | 10 | 0,485 | 0,37 |
| 3 | Реактор-змішувач для приготування 12 % розчину аміаку | 10 | 0,485 | 0,37 |
| 4 | Реактор-змішувач для зберігання гліцерину | 630 | 1,32 | 1,84 |
| 5 | Реактор-змішувач для приготування композиції 1 | 630 | 1,32 | 1,84 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 6 | Реактор-змішувач для приготування композиції 2 | 60 | 0,95 | 1,4 |
| 7 | Реактор-змішувач для приготування композиції 3 | 100 | 0,95 | 1,6 |
| 8 | Посівний апарат | 630 | 1,38 | 2,8 |
| 9 | Реактор-змішувач для приготування композиції 1 | 25 | 0,585 | 0,5 |
| 10 | Реактор-змішувач для приготування композиції 2 | 5 | 0,25 | 0,3 |
| 11 | Інокулятор-2 | 60 | 0,93 | 2,6 |
| 12 | Інокулятор-1 | 5 | 0,3 | 0,4 |
| | Всього | 7 165 | | |

З данних продемонстрованих в табл. 5.1, загальний об'єм обладнання який використовується для синтезу пропіонової кислоти становить 7,165 м$^3$. Також слід вирахувати площу на якій зазначене обладнання розміщається, (підлога, стіни) (з врахуванням що висота стін цеху отримання пропіонової кислоти дорівнює 12 м, а інших приміщень 6 м). Площа підлоги цеху біологічного синтезу пропіонової кислоти 14,1 м × 7 м = 98,7 м$^2$, а площа стін (14,1 м × 6 + 7 м × 6) × 2 = 253,2 м$^2$. Площа підлоги вирощування посівного матеріалу 5,8 × 5 + 4,4 × 4 = 46,6 м$^2$, а площа стін (10,2 + 4,0 + 4,4 + 1,0 + 5,8 + 5,0) × 3 = 91,2 м$^2$. Мікробіологічна лабораторія 12 × 3,9 = 46,8 м$^2$, а стін – (12 × 3 + 3,9 × 3) × 2 = 95,4 м$^2$. Площа підлоги приміщення з качалочними колбами 3 × 4 = 12 м$^2$, а стін – (3 × 3 + 4 × 3) × 2 = 42 м$^2$, узагальнені значення площ приміщень продемонстровано в табл. 5.2

*Таблиця 5.2*

**Площа стін та підлоги виробничих приміщень синтезу пропіонової кислоти**

| **Приміщення** | **Площа підлоги, м$^2$** | **Площа стін, м$^2$** | **Загальна площа, м$^2$** |
|---|---|---|---|
| Цех виробничого біосинтезу | 98,7 | 253,2 | 351,9 |
| Цех отримання посівного матеріалу | 46,6 | 91,2 | 137,8 |
| Мікробіологічна лабораторія | 46,8 | 95,4 | 142,2 |
| Приміщення з качалками | 12 | 42 | 54 |
| **Загальна площа** | 204,1 | 481,8 | |

Загальна кількість циклів отримання культуральної рідини для подальшого отримання пропіонової кислоти становить 25 циклів/рік, перед кожним циклом та після останнього проводять миття обладнання, отже, за рік обладнання митимуть 26 рази. Щоб забезпечення чистоти приміщень, підлогу миють щодня, так як кількість трудоднів становить 250 то кількість миття підлоги становить таке саме значення. Окрім щоденного миття підлоги раз на місяць потрібно проводити генеральне прибирання, за рік кількість генеральних прибирань становитиме 9 разів. Площу оброблення за виробничий рік наведено в табл. 5.3.

*Таблиця 5.3*

**Загальна площа миття, дезінфекції об'єктів за весь виробничий період синтезу пропіонової кислоти**

| **Об'єкт миття та/або дезінфекції** | **Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м$^2$ (м$^3$)** | **Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва** | **Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м$^2$ (м$^3$ )** |
|---|---|---|---|
| Обладнання | 7,165 | 26 | 186,29 |
| Підлога | 204,1 | 250 | 51 025 |
| Стіни, двері вікна | 481,8 | 9 | 4 336,2 |

Загальне порівняння дезінфекційних засобів наведено в табл. 5.4

*Таблиця 5.4*

**Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для синтезу пропіонової кислоти**

| Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діюча речовина) | Об'єкт миття та дезінфекції | Концентрація робочого розчину | Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, $м^2$ ($м^3$) | Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л | Вартість 1 л/кг мийного/ дезінфікуючого засобу, грн | Вартість 1 л робочого розчину, грн | Загальна вартість миття та дезінфекції за весь період виробництва, грн |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| «Дезактин» (дихлорантин) [24] | Стіни, підлога, вікна, двері | 0,2% | 55 361,2 | 5 536,12 | 430 | 0,9 | 4 982,5 |
| «Dezaldum 20» (алкілдиметилбензиламоній хлорид, глутаровий альдегід) [25] | Стіни, підлога, вікна, двері | 1% | 55 361,2 | 5 536,12 | 131,25 | 1,313 | 7 269 |
| «Ексан Про Дез» (ПАР, етанол, ялицева олія) [26] | Стіни, підлога, вікна, двері | 1,5% | 55 361,2 | 5 536,12 | 93,5 | 1,403 | 7 767 |
| Каустична сода (NaOH) [27] | Обладнання | 1% | 186,29 | 37 258 | 57 | 0,6 | 22 356 |

Примітка: ПАР – поверхнево-активні речовини.

### 5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Щоб отримати посівний матеріалу *P. freudenreichii* CICC 10019, використовують поживне середовище з наступним складом [10], г/л:

Глюкоза – 20;

Кукурудзяний екстракт – 10;

$(NH_4)_2SO_4$ – 2;

Сухий агар – 2

Для виробництва пропіонової кислоти за допомогою *P. freudenreichii* CICC 10019, дану культуру необхідно вирощувати на поживному середовищі, де джерелом карбону є суміш гліцерину та гідролізату кукурудзяних стебел ГС (у 1 л ГС вміст глюкози 55 г/л) у співвідношенні 2,5:1 [10].

Вміст гліцерину в поживному субстраті – 43 г/л,

Гідролізату – 17 г/л , вміст глюкози в гідролізаті

1000 г (мл) ГС – 55 г глюкози

17 г ГС - х глюкози х = 17×55/1000 = 0,935 г глюкози

Кукурудзяний екстракт – 20;

$KH_2PO_4$ – 4,0;

$CoCl_2$ – 0,0127;

$CaCO_3$ – 4.

Параметри процесу біосинтезу: час ферментації $T_б$ = 258 год, температура – t = 30 ºС в анаеробних умовах. Вихідний розчин поживного середовища доводили до pH = 6,8- 7,0 12% розчином аміака.

Процес біосинтезу проводять із підживленням починаючи з 48 год культивування через кожні 24 год, кількість підживлень – 4.

Технологічний процес виробництва пропіонової кислоти складається з отримання посівного матеріалу *P. freudenreichii* CICC 10019 в качалочних колбах, інокуляторах геометричним об'ємом 5, 60 л, посівному апараті 630 л та виробничого біосинтезу, який буде відбуватись у ферментері геометричним об'ємом 5 $м^3$.

Особливість даного процесу біосинтезу пропіонової кислоти полягає у використанні адсорбційного біореактора з розширеним шаром (АБРШ), що включає в себе 3 адсорбційні колонки, які паралельно з'єдані контуром рециркуляції з виробничим ферментером з мішалкою і працюють у напівбезперервному режимі. При досягненні лімітуючої концентрації пропіонової кислоти в ферментері (10 г/л), вмикають контур рециркуляції і проводять адсорбцію пропіонової кислоти в одній з колонок на смолу Duolite A30 ($OH^-$, 9,0 мекв/г) пропускаючи культуральну рідину через неї. Після адсорбції колонку відключають і проводять елюцію пропіонової кислоти.

Адсорбцію пропіонової кислоти проводили через 12, 24, 48 годин культивування кожні 12 годин. Загальна кількість елюйованої пропіонової кислоти протягом часу культивування склала 91,4 г/л.

Крім того, з метою збільшення виходу пропіонової кислоти було використано підживлення гліцеролом через 48 год культивування.

### 5.1.4.1.Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу

Враховуючи невелике за компонентним складом, поживне середовище, приготування та стерилізація даних компонентів буде відбуватись майже незмінно, відрізнятись буде тільки місце стерилізації через збільшення об'ємів поживного середовища.

Поділ композиції на всі стадії отримання посівного матеріалу буде виглядати наступним чином:

***Композиція 1***: Глюкоза, кукурудзяний екстракт та агар (112 °С, 20 хв).

***Композиція 2***: амоній сульфат (0,15 МПа, 131 °С, 40 хв).

Враховуючи невеликий об'єм поживного середовища на стадії отримання посівного матеріалу *P. freudenreichii* CICC 10019 в колбах на качалці та інокуляторі об'ємом 5 л, приготування композицій буде відбуватись в колбах з подальшою стерилізацією в автоклаві, відповідно до необхідних температурних режимів.

На стадію отримання посівного матеріалу *P. freudenreichii* CICC 10019 в посівному апараті об'ємом 60 л, враховуючи більший об'єм поживного середовища, стерилізація термолабільної композиції (композиція 1) буде відбуватись в автоклаві (тобто так само як і на попередніх стадіях), в той час як приготування солі буде відбуватись в колбі з подальшим розміщенням в посівному апараті та стерилізацією гострою парою в посівному апараті (для зменшення економічних витрат на придбання недоцільного додаткового обладнання).

На останній стадії отримання посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 630 л, враховуючи більші геометричні розміри апарату та в рази більші об'єми необхідного поживного середовища, використання автоклаву для стерилізації композицій не підходить, тому приготування та стерилізація композиції 1 буде відбуватись в реакторі-змішувачі. А для зменшення недоцільних економічних витрат приготування композиції 2 (розчинення солі в невеликому об'ємі води) буде відбуватись в колбі з подальшим розміщенням в посівному апараті та внесенням остаточної кількості води і стерилізації в посівному апараті гострою парою.

### 5.1.4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробництва пропіонової кислоти

Як зазначалось раніше для виробничого синтезу пропіонової кислоти культивуванням *P. freudenreichii* CICC 10019 використовується поживне середовище з іншим компонентним складом, а також враховуючи кількість поживного середовища необхідного на дану стадію (2,81 $м^3$) поділ складових середовища на композицій буде відбуватись наступним чином:

***Композиція 1:*** ГС+ кукурудзяний екстракт (t = 115 ºС , 20 хв).

***Композиція 2***: $CoCl_2$ та $KH_2PO_4$ (0,15 МПа, 131 °С, 40 хв);

***Композиція 3***: $CaCO_3$ (0,15 МПа, 131 °С, 40 хв);

***Композиція 4***: Гліцерин.

**Отримання гідролізату кукурудзяних стебел (ГС)**

Стебла кукурудзи (СК) висушивали та подрібнювали до дрібнодисперсного порошку 50-100 мкм. Для отримання ГС 200 г порошку СК добавляли 800 мл води в колбу на 2 л і стерилізували при темпереатурі 121 ºС протягом 30 хв, охолоджували і добавляли комерційну целюлазу з активністю 5 Од/г СК в асептичних умовах до колби для ферментативного гідролізу целюлози протягом 48 годин при t = 55 ºС, pH = 4,8 та 100 об/хв мішалки. Перед ферментативним гідролізом pH регулювали добавленням HCl. По закінченню гідролізат центрифугували протягом 10 хв при $1 \cdot 10^4$ об/хв для видалення нерозчинних домішок, а фугат концентрували на роторному випарнику протягом 30 хв до вмісту глюкози 55 г/л та 1,96 г/л ксилози.

Термолабільні речовини (гідролізат кукурудзяних стебл та кукурудзяний екстракт) об'єднують в одну композицію, приготування і стерилізація даної композиції буде відбуватись в окремому реакторі-змішувачі об'ємом 630 л.

Хлорид кобальту та монофосфат калію потребують більш жорстких умов стерилізації тому їх об'єднують в одну композицію, так як при стерилізації даних компонентів може утворитися фосфат кобальту який є нерозчинним у воді осадом, перед стерилізацією даної композиції необхідно понизити її рівень pH.

Так як гліцерин не потребує попередньої стерилізації, він буде зберігатись в окремому збірнику. Кальцій карбонат застосовують в середовищі в якості регулятора рівня pH, через що стерилізувати його доцільно окремо при 131ºС протягом 40 хв.

## 5.2. Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення пропіонової кислоти

Процес виробничого синтезу пропіонової кислоти культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 у ферментері об'ємом 5 $м^3$, відбувається з використанням адсорбційного біореактора з розширеним шаром, що передбачає наявність іонообмінних колон, які паралельно з'єднані контуром рециркуляції та працюють у напівбезперервному режимі. При

досягненні в ферментері концентрації пропіонової кислоти 10 г/л вмикається контур рециркуляції та відбувається адсорбція пропіонової кислоти на іонообмінній смолі (Duolite A30). Після зменшення концентрації кислоти в культуральній рідині контур рециркуляції вимикають та продовжують виробничий синтез. В колонку, через яку подавалась культуральна рідина, подають деіонізовану воду, для промивання залишків які не адсобрувались на смолі та в подальшому проводять десорбцію пропіонової кислоти.

Так як при даній технології біосинтезу в кінці виробництва ми отримуємо елюат який містить пропіонову кислоту та елюент для отримання чистого продукту нам необхідно виконати декілька етапів, концентрування для видалення елюенту та враховуючи що пропіонова кислота це рідина, потреба в сушінні відпадає, тому після концентрування буде відбуватись пакування та маркування готової до реалізації пропіонової кислоти. Схематичне зображення етапів виділення та очищення пропіонової кислоти наведено на рис. 5.2.

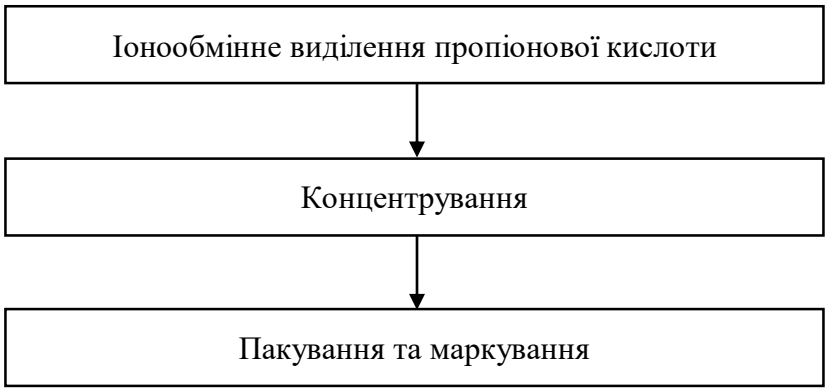



*Рис. 5.2.* **Схематичне зображення стадій виділення та очищення пропіонової кислоти**

## 5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів

### 5.3.1. Виділення пропіонової кислоти

Враховуючи зазначену раніше інформацію, а саме технологію біосинтезу пропіонової кислоти, необхідно визначити яким елюент використовувати для десорбції пропіонової кислоти з іонообмінної смоли.

Так в статті [28] наведено що для десорбції можна використовувати 1 М розчин натрію гідроксиду. Даний метод дозволяє повністю виділити пропіонову кислоту з смоли, але в даного елюенту є декілька недоліків. По-перше під час десорбції буде використовуватись велика кількість гідроксиду натрію (швидкість десорбції становить 3 л елюенту на 1 л смоли за годину), а по-друге, те що під час десорбції розчином гідроксиду натрію пропіонова кислота буде вступати в реакцію та утворюватиметься пропіонат натрію, який необхідно буде в подальшому перетворювати на пропіонову кислоту.

В іншій статті [29], описано метод десорбції за допомогою розчину 1 М гідроксиду натрію та етанолу, в співвідношенні 1 до 1,5, відповідно. Даний елюент має такі самі недоліки, як і попередній, але при його використанні ми можемо більшу частину розчину (а саме етанол) відновити та повторно використовувати в подальшому, що є кращим варіантом.

Отже, процес виділення пропіонової кислоти буде виглядати наступним чином: культуральну рідину при досягненні концентрації пропіонової кислоти 10 г/л пропускають через іонообмінні колони в яких відбувається адсорбування цільового продукту, потім відбувається промивання смоли водою, для змиття непотрібних залишків, та в подальшому відбувається десорбція за допомогою розчину 1 М гідроксиду натрію з етанолом у співвідношенні 1 до 1,5, відповідно. В результаті отримуємо елюат, який містить цільовий продукт, гідроксид натрію, етанол та воду.

Для даної стадії необхідно передбачити наявність реактора-змішувача для приготування елюенту, реактор-змішувач для зберігання елюату та іонообмінні колони.

Кількість культуральної рідини приблизно 3 100 л, швидкість пропускання культуральної рідини через смолу становить 5 л культуральної рідини на 1 л смоли за 1 год, отже, необхідна кількість смоли становить:

$$3\ 100 / 10 = 310 \text{ л}$$

де 10 це швидкість проходження культуральної рідини крізь смолу, за 2 год (5 л КР на 1 л смоли за 1 год * 2 год = 10 л КР)

Дізнавшись теоретичну кількість смоли можемо розрахувати необхідну кількість елюенту, швидкість десорбції 3 л елюенту на 1 л смоли за 1 год, приймемо що час десорбції буде також становити 2 год, тоді нам необхідно:

310 л * 3 л * 2 год = 1 860 л елюенту.

Отже, для приготування елюенту необхідно перебачити наявність реактора об'ємом 2 $м^3$, а також передбачити реактор об'ємом 4 $м^3$ для зберігання елюату.

### 5.3.2. Доочищення елюату

В результаті десорбції пропіонової кислоти, в реакторі-змішувачі знаходиться суміш етанолу, 1 М гідроксиду натрію та пропіонової кислоти. Так як згадувалось раніше, що при десорбції розчином з гідроксидом натрію може утворюватися пропіонат натрію необхідно отриману сіль відновити до кислоти. Для відновлення пропіонату натрію до пропіонової кислоти та нейтралізації гідроксиду натрію необхідно до розчину внести таку саму кількість 1 М хлоридної кислоти [30], як і кількість 1 М гідроксиду натрію який використовували при десорбції з смоли, в результаті ми нейтралізуємо гідроксид натрію, який залишився в розчині, до води та хлориду натрію та отримаємо пропіонову кислоту.

Результатом виділення та очищення пропіонової кислоти має бути рідина, враховуючи що після внесення хлоридної кисллоти ми отримали суміш пропіонової кислоти етанолу та води, та враховуючи фізико-хімічні властивості даних речовин можна було б застосувати процес випарювання, для видалення етанолу та води з розчину (температура кипіння етанолу становить 79 °С, води – 100 °С, пропіонової кислоти – 142 °С). Але через наявність хлориду натрію в розчині в результаті випарювання ми отримаємо пропіонову кислоту з розчиненим хлоридом натрію в ній. Тому доцільно використати метод описаний в статті [31], а саме пропустити розчин через іонообмінну смолу полі(4-вінілпіридин), в результаті на даній смолі адсорбується пропіонова кислота, а весь інший розчин змиється, в подальшому розчин води та етанолу можна направити на випарну установку для регенерування етанолу

та його повторного використання. Після адсорбування смолу промивають деіонізованою водою та проводять десорбцію ацетоном. В результаті на виході отримуємо елюат, який складається з пропіонової кислоти та ацетону.

Внесення 1 М хлоридної кислоти відбувається в такій самій кількості як і 1 М гідроксиду натрію, а саме:

1 860 л елюенту * 40 % (частина 1 М гідроксиду натрію) = 744 л (1 М хлоридної кислоти)

Отже, загальна кількість рідини перед проведенням адсорбції пропіонової кислоти буде становити 1 860 + 744 = 2 604 л. Процес адсорбції та десорбції відбувається з швидкістю 3 л розчину на 1 л смоли за 1 год, приймемо, що процес буде відбуватись 3 години, тоді необхідна кількість смоли буде становити:

2 604 л / (3 л * 3 год) = 290 л смоли

А кількість ацетону буде становити 290 л * 3 = 870 л. Підсумовуючи вище наведену інформацію, можна зробити висновок, що на дану стадію необхідно передбачити наявність реактора змішувача об’ємом 1 м$^3$ для приготування 1 М розчину хлоридної кислоти, іонообмінної колони з внутрішнім об’ємом 400 л, збірник об’ємом 1 м$^3$ для зберігання ацетону перед використанням для десорбції пропіонової кислоти та збірник для зберігання елюату об’ємом 1 м$^3$.

### 5.3.3. Концентрування

Після попереднього етапу в збірнику елюату, знаходиться пропіонова кислота та ацетон, для отримання очищеної кислоти необхідно прибрати ацетон. Перед визначенням способу видалення ацетону розглянемо фізико-хімічні властивості ацетону та пропіонової кислоти: температура кипіння ацетону становить 56 °С, а пропіонової кислоти – 142 °С. Враховуючи велику різницю температур кипіння та те що ацетон є більш леткою речовиною для отримання очищеної пропіонової кислоти можна використати випарну установку. Для випарювання доцільно обрати роторно-плівковий випарник,

так як продуктивність за випаровуваною вологою у даного типу є найкраща [32].

Під час випарювання ацетон конденсують та в подальшому використовують повторно, що дозволить зменшити економічні витрати.

В результаті випарювання отримуємо пропіонову кислоту з чистотою більше 98 %, вихід продукту становить більше 80 %.

Для даної стадії необхідно передбачити наявність роторно-плівкового випарника, та збірника об’ємом 0,4 м$^3$ для зберігання готового продукту.

Розглянувши стадії виділення та очищення, можна навести більш точні стадії, які необхідно виконати для отримання чистої пропіонової кислоти, перелік даних стадій наведено на рис. 5.3.

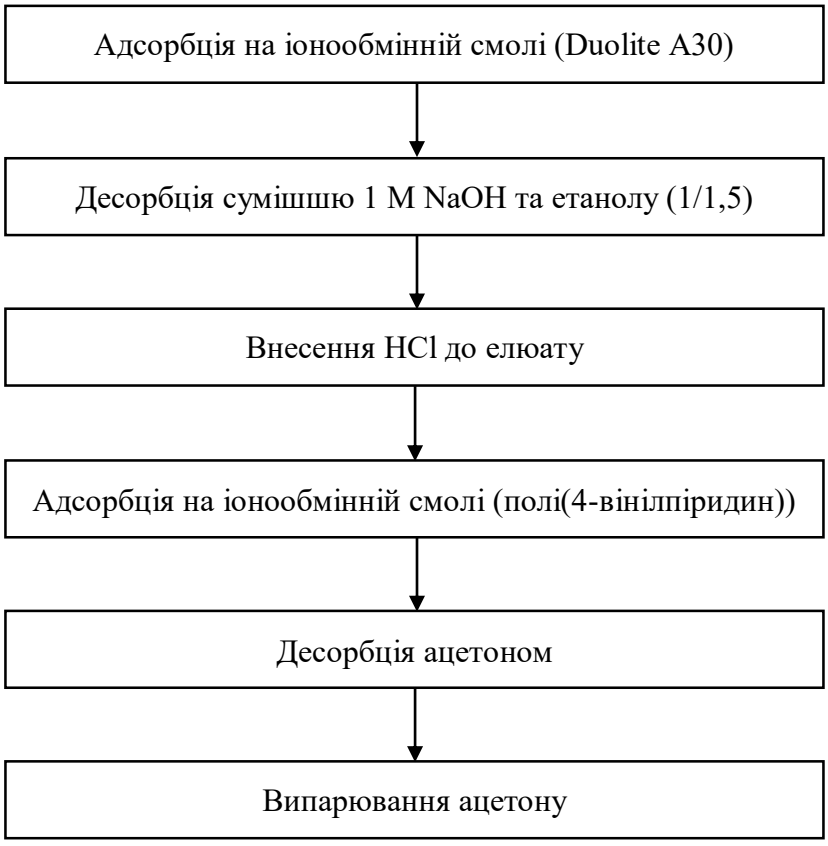



*Рис. 5.3.* **Етапи виділення та очищення пропіонової кислоти**

# РОЗДІЛ 6
# СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ ПРОПІОНОВОЇ КИСЛОТИ

*Таблиця 6.1*

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика (виробник) |
|---|---|---|---|
| ПЗ-1 | Повітрозабірник | 1 | З наявною металевою сіткою, для вилучення забруднюючих часток пилу |
| Ф-2 | Фільтр грубого очищення | 1 | Фільтр сітчастий, з гофрованою тканою сіткою. Розміри: 495*247*48 (мм). Клас очищення: G2/G3 (E = 90 %). Продуктивність – 1100 м$^3$/год, [33] |
| К-3 | Компресор | 1 | Компресор Tidy 4. Продуктивність 410 л/хв, потужність – 3 кВт [34]. |
| Т-4 | Теплообмінник-охолоджувач | 1 | Теплообмінник кожухотрубний OPEKS-3-ST з нержавіючої сталі. Тиск 6–40 бар, діапазон робочої температури 60 - 400 ºС [35] |
| Рс-5 | Ресивер | 1 | Рисивер об’ємом 200 л з нержавіючої сталі (з компресором) [36] |
| Т-6 | Теплообмінник-нагрівач | 1 | Калорифер паровий з нержавіючої сталі, виконаний в фірми ОПЕКС (Україна), продуктивність – 400 л/хв [37] |
| Ф-7 | Фільтр тонкого очищення | 1 | Фільтр кишеньковий з поліестером та мікроволокном, оцинкована або нержавіюча сталь. Розміри: 287*287*600 (мм). Клас очищення: G4/F9 (E = 92 %). Продуктивність – 800 м$^3$/год. [38] |

*Продовження табл. 6.1*

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика (виробник) |
|---|---|---|---|
| ІФ-8<br>ІФ-10<br>ІФ-16<br>ІФ-33 | Індивідуальний фільтр | 4 | HEPA фільтр з мікроскловолокном, пластиковий, алюмінієви, корпус. Розміри: 610*610*78 (мм). Клас очищення: E10-12/H13/H14/U15-17 (E = 99,995 %). Продуктивність – 1000 $м^3$/год [39] |
| Ін-9 | Інокулятор | 1 | Ферментер пілотний з нержавіючої сталі об'ємом 5 л, виконаний компанією Solaris (Серія S). Оснащений барботером, ротаметром, сорочкою та мішалкою (200 об/хв), датчиками температури та рівня pH [40] |
| Ін-11 | Інокулятор | 1 | Ферментер пілотний з нержавіючої сталі об'ємом 60 л, виконаний компанією Solaris (Серія S). Оснащений барботером, ротаметром, сорочкою та мішалкою (200 об/хв), датчиками температури та рівня pH [40] |
| Д-12<br>Д-15<br>Д-19<br>Д-25<br>Д-28 | Об'ємно-ваговий дозатор | 5 | Дозатор-лічильник для води максимальна потужність – 180 Вт продуктивністю 10 - 400 л/хв [42]. |
| Р-13 | Реактор-змішувач | 1 | Сталевий реактор об'ємом 25 л, оснащений перемішуючим пристроєм та сорочкою. Діаметр – 0,35 м, висота – 0,65 м, потужність двигуна – 0,75 кВт частота обертання мішалки – 100 об/хв [43] |
| Р-14 | Реактор-змішувач | 1 | Сталевий реактор об'ємом 5 л, оснащений перемішуючим пристроєм та сорочкою. Діаметр – 0,152 м, висота – 0,310 м, потужність двигуна – 0,75 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв [44] |

*Продовження табл. 6.1*

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика (виробник) |
|---|---|---|---|
| ПА-17 | Посівний апарат | 1 | Ферментер пілотний з нержавіючої сталі об'ємом 630 л, виконаний компанією Solaris (Серія I). Оснащений барботером, ротаметром, сорочкою та мішалкою (200 об/хв), датчиками температури та рівня pH [40] |
| ДЗ-18<br>ДЗ-22 | Об'ємно-ваговий дозатор | 2 | Автоматичний дозатор з межами дозування від 60 до 500 кг. Дискретність – 0,2 кг, споживана потужність – 0,3 кВт, похибка дозування – 1 %. Розміри: 1900*1500*2400 (мм) [45] |
| Р-20<br>Р-23 | Реактор-змішувач | 2 | Сталевий реактор об'ємом 630 л, перемішуючим пристроєм та оснащений сорочкою. Діаметр – 0,9 м, висота – 2,79 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв; потужність двигуна – 2,2 кВт [43] |
| Н-21 | Перистальтичний насос | 1 | Насос перистальтичний PTL17. продуктивність – 908 л/год з частотою обертання – 140 об/хв, [41] |
| Н-24 | Перистальтичний насос | 1 | Насос перистальтичний PTL09. Продуктивність – 80 л/год з частотою обертання – 80 об/хв [41] |
| Р-26 | Реактор-змішувач | 1 | Сталевий реактор об'ємом 100 л, оснащений перемішуючим пристроєм та сорочкою. Діаметр – 0,508 м, висота – 2,835 м, потужність двигуна – 0,75 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв; [43] |
| Н-27<br>Н-35 | Перистальтичний насос | 2 | Насос перистальтичний PTL13. Продуктивність 196 л/год з частотою обертання – 80 об/хв, [41] |
| Р-29 | Реактор-змішувач | 1 | Сталевий реактор об'ємом 63 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Діаметр – 0,508 м, висота – 2,63 м, потужність двигуна – 0,75 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв [43] |

*Закінчення табл. 6.1*

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика (виробник) |
|---|---|---|---|
| Р-30<br>Р-31 | Реактор-змішувач | 2 | Сталевий реактор об'ємом 10 л, оснащений перемішуючим пристроєм та сорочкою. Діаметр – 0,25 м, висота – 0,5 м, потужність двигуна – 0,75 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв [43] |
| Б-32 | Балон з інертним газом | 1 | Балони з азотом |
| Фр-34 | Ферментер | 1 | Ферментер пілотний з нержавіючої сталі об'ємом 5 $м^3$, виконаний компанією Solaris (Серія I). Оснащений барботером, ротаметром, сорочкою та мішалкою (200 об/хв), датчиками температури та рівня pH [40] |

# РОЗДІЛ 7
# ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ ПРОПІОНОВОЇ КИСЛОТИ

Технологічна схема отримання пропіонової кислоти за допомогою культури *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 складається з допоміжних робіт (підготовка аераційного повітря, підготовка азоту, зберігання гліцерину, приготування та стерилізація титрувальних агентів для регуляції рівня pH поживного середовища та приготування і стерилізація поживного середовища) та технологічних процесів (отримання посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 та виробничий біосинтез пропіонової кислоти).

Схеми (апаратурна та технологічна) отримання пропіонової кислоти наведені в графічній частині роботи

***ДР 1. Підготовка аераційного повітря***

***ДР 1.1. Забір повітря***

Атмосферне повітря відбирають на висоті 17 м за допомогою вертикальної труби з повітрезабірником (ПЗ-1).

***ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря***

Відібране повітря для видалення крупних часток бруду і пилу подають на фільтр грубого очищення (Ф-2). Отримане на виході повітря має чистоту 90 %.

***ДР 1.3. Подача повітря на компресор***

Очищене повітря після проходження фільтрів грубого очищення стискають до тиску 0,4 МПа подаючи його в компресор (К-3), в результаті збільшується температура до 250ºС.

***ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення вологи***

Стиснене та нагріте повітря після компресора подають в теплообмінник (Т-4) для охолодження до 18 ºС та в подальшому направляють в ресивера (Рс-5), щоб видалити вологи, повітря на виході має вологу 60%.

***ДР 1.5. Підігрів повітря***

Видаливши вологи повітря проходить крізь теплообміннику (Т-6) де відбувається його нагрівання до 30-35 ºС.

***ДР 1.6. Тонке очищення повітря***

Повітря, отримане після нагріваня, подають на головний фільтр очищення (Ф-7),ступінь очищеня становить Е=92%.

***ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах***

Для досягнення ступеня очищення Е=99,995% перед подачею повітря в апарати воно проходить крізь індивідуальні фільтри (ІФ-8, ІФ-10, ІФ-16).

***ДР 2. Підготовка азоту для виробничого біосинтезу***

***ДР 2.1 Подача азоту***

Азот з балонів (Б-32), де відбувається зберігання інертного газу, подають в очищувач балонних газів, на виході азот має чистоту більше 95%.

***ДР 2.2. Очищення азоту в індивідуальному фільтрі***

Очищений азот перед подачею в ферментер (*до ТП 7.1*) пропускають крізь індивідуальний фільтр (ІФ-33).

***ДР 3. Приготування титрувальних агентів для регулювання рівня pH поживного середовища***

***ДР 3.1. Приготування розчину 6%-ї хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища***

Для підкислення поживного середовища на виробничий біосинтез необхідно приготувати 6,265 л 6 % хлоридної кислоти, щоб зробити це в реактор (Р-30) об'ємом 10 л заповнюють 5,225 л питної води та при постійному перемішуванні вносять 1 л 36% кислоти хлоридної, відміряної попередньо мірним стаканом.

***ДР 3.2. Приготування і стерилізація 12 % розчину аміаку***

Для підлуження поживного середовища на виробничий біосинтез необхідно приготувати 3,13 л 12 % розчину аміаку. В реактор- змішувач (Р-31) вносять 1,5 л 25 % розчину аміаку, та вносять 1,63 л води питної, перемішують (100 об/хв), та в даному реакторі проводять стерилізацію 40 хв при 131ºС (0,15 МПа).

***ДР 4. Зберігання гліцерину***

***ДР 4.1. Зберігання гліцерину на виробничий біосинтез***

На стадію виробничого біосинтезу для приготування поживного середовища необхідно 120,8 л гліцерину, а для внесення додаткового джерела вуглецю 410 л гліцерину, в збірник об'ємом 630 л (Р-23) подають за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-22) необхідну кількість гліцерину, де відбувається його зберігання при температурі 25°С та постійному перемішуванні (70 об/хв).

***ДР 5. Приготування і стерилізація поживного середовища***

***ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці***

З метою отримання ПС необхідно приготувати 240 мл поживного середовища. Кількість компонентів необхідна для приготування даної кількості розчину наведена в табл. 7.1.

*Таблиця 7.1*

**Кількість компонентів та склад композицій потрібний для отримання посівного матеріалу в 2 качалочних колбах**

| **Компоненти поживного середовища** | **Вміст, г/л** | **Кількість для приготування 260 мл середовища, г** | **Композиції** | **Об'єм композиції, л** |
|---|---|---|---|---|
| Глюкоза | 20 | 5,2 | Композиція 1 | 0,058 |
| Кукурудзяний екстракт | 10 | 2,6 | | |
| Агар | 2 | 0,52 | | |
| Вода | | 50 (мл) | | |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2 | 0,52 | Композиція 2 | 0,202 |
| Вода | | 202 (мл) | | |
| Разом: | | | | 0,26 л |

*ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції 1*

Зважують наважки, на технічних вагах, глюкози масою 5,2 г, кукурудзяного екстракту – 2,6 г та агару – 0,52 г. Зважені наважки завантажують в колбу об'ємом 0,1 л, доливають, відміряної за допомогою мірного стакана, 50 мл питної води та проводять перемішування до повного розчинення внесених наважок, розчинивши вміст колби її закривають ватно-марлевим корком та розміщують в автоклаві, де 30 хв відбувається стерилізація при 112 °С.

*ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції 2*

Зважують наважку, на технічних вагах, амонію сульфату масою 0,52 г. Зважену наважку завантажують в колбу об'ємом 0,5 л, доливають, відміряної за допомогою мірного стакана, 202 мл питної води та проводять перемішування до повного розчинення внесеної наважки, розчинивши вміст колби її закривають ватно-марлевим корком та розміщують в автоклаві, де 40 хв відбувається стерилізація при 131 °С.

***ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 1 місткістю 5 л***

Для отримання посівного матеріалу необхідно приготувати 2,58 л поживного середовища. Кількість компонентів необхідна для приготування даної кількості розчину наведена в табл. 7.2.

*Таблиця 7.2*

**Кількість компонентів та склад композицій потрібний для отримання посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 5 л**

| **Компоненти поживного середовища** | **Вміст, г/л** | **Кількість для приготування 2,58 л середовища, г** | **Композиції** | **Об'єм композиції, л** |
|---|---|---|---|---|
| Глюкоза | 20 | 51,6 | Композиція 1 | 0,558 |
| Кукурудзяний екстракт | 10 | 25,8 | | |
| Агар | 2 | 5,16 | | |
| Вода | | 0,4 (л) | | |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2 | 5,16 | Композиція 2 | 2,022 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Вода | | 2,02 (л) | | |
| Разом: | | | | 2,58 |

*ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції 1*

Зважують наважки, на технічних вагах, глюкози масою 51,6 г, кукурудзяного екстракту – 25,8 г та агару – 5,16 г. Зважені наважки завантажують в колбу об'ємом 0,5 л, доливають, відміряної за допомогою мірного стакана, 400 мл питної води та проводять перемішування до повного розчинення внесених наважок, розчинивши вміст колби її закривають ватно-марлевим корком та розміщують в автоклаві, де 30 хв відбувається стерилізація при 112 °С.

*ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції 2*

Зважують наважку, на технічних вагах, амонію сульфату масою 5,16 г. Зважену наважку завантажують в колбу об'ємом 5 л, доливають, відміряної за допомогою мірного стакана, 2,02 л питної води та проводять перемішування до повного розчинення внесеної наважки, розчинивши вміст колби її закривають ватно-марлевим корком та розміщують в автоклаві, де 40 хв відбувається стерилізація при 131 °С.

***ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 2 місткістю 60 л***

З метою отримання ПС в інокуляторі місткістю 60 л потрібно приготувати 26,8 л поживного середовища. Так як стерилізацію відбуватиметься гострою парою необхідно зменшити кількість води для приготування середовищ, кількість води для приготування середовища становитиме 23,7 л. Кількість компонентів необхідна для приготування даної кількості розчину наведена в табл. 7.3.

*Таблиця 7.3*

**Кількість компонентів та склад композицій потрібний для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 2 місткістю 60 л**

| **Компоненти поживного середовища** | **Вміст, г/л** | **Кількість для** | **Композиції** | **Об'єм композиції, л** |
|---|---|---|---|---|

| | | **приготування 26,8 л середовища, г** | | |
|---|---|---|---|---|
| Глюкоза | 20 | 536 | Композиція 1 | 2,86 |
| Кукурудзяний екстракт | 10 | 268 | | |
| Агар | 2 | 53,6 | | |
| Вода | | 2,0 (л) | | |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2 | 53,6 | Композиція 2 | 21,74 |
| Вода | | 21,7 (л) | | |
| Конденсат | | 2,2 (л) | | 2,2 |
| | | | Разом: | 26,8 |

*ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції 1*

Зважують наважки, на технічних вагах, глюкози масою 536 г, кукурудзяного екстракту – 268 г та агару – 53,6 г. Зважені наважки завантажують в колбу об'ємом 5 л, доливають, відміряної за допомогою мірного стакана, 2 л питної води та проводять перемішування до повного розчинення внесених наважок, розчинивши вміст колби її закривають ватно-марлевим корком та розміщують в автоклаві, де 30 хв відбувається стерилізація при 112 °С.

*ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції 2*

Зважують наважку, на технічних вагах, амонію сульфату масою 53,6 г. Зважену наважку завантажують в колбу об'ємом 0,5 л, додають відміряну мірним стаканом води питної в кількості 0,2 л та перемішують до повного розчинення, після розчинення солі вміст колби подають в посівний апарат (ПА-11) додають 21,5 л води питної та вмикають перемішуючий пристрій. Розчинивши проводять стерилізацію гострою парою 40 хв при 131 °С.

***ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 630 л***

З метою отримання ПС в посівному апараті місткістю 630 л потрібно приготувати 283 л поживного середовища. Так як стерилізацію відбуватиметься гострою парою необхідно зменшити кількість води для приготування середовищ, кількість води для приготування середовища

становитиме 23,7 л. Кількість компонентів необхідна для приготування даної кількості розчину наведена в табл. 7.4.

*Таблиця 7.4*

**Кількість компонентів та склад композицій потрібний для отримання посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 630 л**

| **Компоненти поживного середовища** | **Вміст, г/л** | **Кількість для приготування 283 л середовища, г** | **Композиції** | **Об'єм композиції, л** |
|---|---|---|---|---|
| Глюкоза | 20 | 5 660 | Композиція 1 | 21,05 |
| Кукурудзяний екстракт | 10 | 2 830 | | |
| Агар | 2 | 566 | | |
| Вода | | 12 (л) | | |
| Конденсат | | 1,2(л) | | 1,2 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2 | 566 | Композиція 2 | 237,1 |
| Вода | | 236,5 (л) | | |
| Конденсат | | 23,65 (л) | | 23,65 |
| Разом: | | | | 295 л |

*ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції 1*

Зважують наважки, на технічних вагах, глюкози масою 5,66 кг, кукурудзяного екстракту – 2,83 кг та агару – 0,566 кг. Зважені наважку завантажують в реактор-змішувач об'ємом 25 л (Р-13) та через дозатор (Д-12) доливають 12 л води питної. Подаючи в сорочку реактора глуху пару нагрівають композицію до 40 °С та перемішують. Розчинивши наважки в реактор подають гостру пару для стерилізації 30 хв при 112 °С.

*ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції 2*

Зважують наважку, на технічних вагах, амонію сульфату масою 566 г. Зважену наважку завантажують в реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-14), додають 3,5 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій та перемішують до повного розчинення солі, після розчинення вміст реактора подають в посівний апарат та за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-15) додають 233 л води питної та перемішують мішалкою. Розчинивши наважку подають гостру пару для стерилізації 40 хв при 131 °С.

***ДР 5.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу пропіонової кислоти в ферментері місткістю 5 м³***

Для біосинтезу пропіонової кислоти в ферментері місткістю 5 м³ (Фр-38) необхідно приготувати 2 810 л поживного середовища. Так як стерилізацію відбуватиметься гострою парою необхідно зменшити кількість води для приготування середовищ, кількість води для приготування середовища становитиме 2 331 л. Кількість компонентів необхідна для приготування даної кількості розчину наведена в табл. 7.5.

*Таблиця 7.5*

**Склад композицій для біосинтезу пропіонової кислоти в ферментері місткістю 5 м³**

| **Компоненти поживного середовища** | **Вміст, г/л** | **Кількість для приготування середовища, $V_{пс1}$ = 2810 л, кг** | **Композиції** | **Об'єм композиції, л** |
|---|---|---|---|---|
| Гідролізат стебел | 17 | 47,77 л | Композиція 1 | 454 |
| Кукурудзяний екстракт | 20 | 56,2 кг | | |
| Вода | | 350л | | |
| Конденсат | | 35 л | | 35 |
| $KH_2PO_4$ | 4 | 11,24 | Композиція 2 | 1 936 |
| $CoCl_2$ | 0,0127 | 0,036 | | |
| Вода | | 1 925 (л) | | |
| Конденсат | | 192 (л) | | 192 |
| $CaCO_3$ | 4 | 11,24 | Композиція 3 | 67 |
| Вода | | 56 (л) | | |
| Конденсат | | 5,2 (л) | | 5,2 |
| Гліцерин | 43 | 120,8 (л) | Композиція 4 | 120,8 |
| | | | Разом: | 2 810 |

*ДР 5.5.1. Приготування і стерилізація композиції 1*

Через об'ємно-вагового дозатор (ДЗ-18) в реактор-змішувач об'ємом 0,63 м³ вносять 56,2 кг кукурудзяного екстракту та 47,77 л гідролізату стебел. Після зважування та розміщення компонентів в реактор (Р-20) через дозатора (Д-19) доливають 350 л води питної та перемішують з одночасним подачею

глухої пари в сорочку для нагрівання до 40 °С. Розчинивши компоненти композиції подають гостру пару для стерилізації 30 хв при 112 °С.

*ДР 5.5.2. Приготування і стерилізація композиції 2*

Зважують наважки, на технічних вагах, хлориду кобальту масою 36 г та калію монофосфату – 11,24 кг, які поміщають в реактор об'ємом 60 л (Р-29), через об'ємно-ваговий дозатора (Д-28) додають 45 л води питної та одночасно вмикають перемішуючий пристрій і подають глуху пару в сорочку для нагрівання до 40 °С.

Розчинивши компоненти розчин подають в ферментер місткістю 5м$^3$ і через дозатор (Д-28) додають 1 880 л води питної та самоплином (*від ДР 3.1*) вносять розчин 6% хлоридної кислоти, для зниження рівня pH до 4,0. Понизивши рівень pH в ферментер подають гостру пару для стерилізації 40 хв при 131 °С.

*ДР 5.5.3. Приготування і стерилізація композиції 3*

В реактор-змішувач об'ємом 100 л (Р-26) поміщають наважку кальцію карбонату 11,24 кг, зважену на технологічних вагах. Після внесення наважки за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-25) вносять 56 л води та вмикають мішалку для суспендування компонента, в подальшому подають гостру пару для стерилізації 40 хв при 131 °С.

***ТП 6.Підготовка посівного матеріалу Propionibacterium freudenreichii CICC 10019***

***ТП 6.1.Підтримання колекційної культури Propionibacterium freudenreichii CICC 10019***

Зберігають колекційну культуру *P. freudenreichii* CICC 10019 на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) при температурі 4 °С. В строго асептичних умовах кожні 3 місяці культуру пересівають.

***ТП 6.2. Одержання робочої культури***

З дотриманням асептики бактеріологічною петлею колекційну культуру *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 методом виснажувального штриха розсівають на чашки Петрі з МПА середовищем для вирлщування

ізольованих колоній. Засіяні чашки розміщують в термостаті на 24 год при 30 ºС.

***ТП 6.3. Вирощування посівного матеріалу Propionibacterium freudenreichii CICC 10019 на агаризованих поживних середовищах***

З дотриманням асептики ізольовані колонії, отримані на попередній стадії (*від ТП 6.2*), бактеріологічною петлею пересівають в пробірки з МПА середовищем (одну колонію засівають в одну пробірку). Пробірки поміщають в термостат на 24 год при 30 ºС.

***ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу Propionibacterium freudenreichii CICC 10019 в колбах на качалці***

В колбу з композицією 2 в асептичних умовах вносять композицію 1, перемішують та розливають по 0,12 л в 2 стерильні колби місткістю 750 мл.

З дотриманням асептики в пробірку з робочою культурою *P. freudenreichii* CICC 10019 вносять фізіологічний розчин щоб суспендувати клітини. Використовуючи піпетку одержану суспензію клітин відбирають та додають в колби з приготованим поживним середовищем.

Вирощування культури відбувається в колбі на качалці (200 об/хв) при 30 ºС упродовж 72 год. Після завершення процесу культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (Х=8 г/л). В асептичних умовах посівний матеріал з двох колб переливають в стерильну засівну колбу об’ємом 0,5 л.

***ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу Propionibacterium freudenreichii CICC 10019 в інокуляторі місткістю 5 л***

В інокулятор об'ємом 5 л вносять стерильну композицію 1 об'ємом 0,558 л та стерильну композицію 2 об'ємом 2,022 л. Приготувавши поживне середовища, використовуючи засівну колбу подають посівний матеріал (*від ТП 6.4*).

Для отримання посівного матеріалу проводять культивування при 30 ºС, 72 год з постійним перемішуванням (200 об/хв) та витратою аераційного повітря 1 л/(л·хв). Через кожні 8 год, а також завершивши культивування, для

здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (Х=8 г/л) відбирають проби КР.

***ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу Propionibacterium freudenreichii CICC 10019 в посівному апараті місткістю 60 л***

В інокулятор об’ємом 60 л (Ін-11) з 23,94 л стерильної композиції 2, з дотриманням асептики, з колби вносять 2,86 л стерильної композиції 1. Об’єднавши композиції, за допомогою труби перетискуванняв посівний апарат подають посівний матеріал, отриманий на попередній стадії.

Для отримання посівного матеріалу проводять культивування при 30 ºС, 72 год з постійним перемішуванням (200 об/хв) та витратою аераційного повітря 1 л/(л·хв). Через кожні 8 год, а також завершивши культивування, для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (Х=8 г/л) відбирають проби КР.

***ТП 6.7. Вирощування посівного матеріалу Propionibacterium freudenreichii CICC 10019 в посівному апараті місткістю 630 л***

У посівний апарат об’ємом 0,63 м$^3$ (ПА-17) з 260,75 л стерильної композиції 2 самоплином вносять 22,25 л стерильної композиції 1. Та в подальшому використовуючи трубу перетискування завантажують посівний матеріал.

Для отримання посівного матеріалу проводять культивування при 30 ºС, 72 год з постійним перемішуванням (200 об/хв) та витратою аераційного повітря 1 л/(л·хв). Через кожні 8 год, а також завершивши культивування, для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (Х=8 г/л) відбирають проби КР.

***ТП 7. Виробничий біосинтез***

***ТП 7.1. Виробничий біосинтез в ферментері місткістю 5 м$^3$***

У виробничий ферментер об'ємом 5 м$^3$ (Фр-34) з стерильною композицією 2 за допомогою перистальтичних насосів (Н-21, Н-27) вносять стерильну композицію 1 та 3 та додають 12%-ий розчин аміаку (*від ДР 3.2*), для врегулювання рівня pH до 7,0. Врегулювавши рівень pH в ферментер за

допомогою перистальтичного насоса (Н-24) подають 120,8 л гліцерину (*від ДР 4.1*).

Під час виробничого біосинтезу на 48 год культивування та в подальшому через кожні 24 год 3 рази вносять підживлювальний розчин (*від ДР 4.1*) за допомогою перистальтичного насоса (Н-28), для підтримання необхідної концентрації джерела вуглецю.

Під час виробничого біосинтезу при досягненні лімітуючої концентрації пропіонової кислоти в ферментері (а саме: 10 г/л), включають контур рециркуляції і проводять адсорбцію пропіонової кислоти в одній з колонок на смолу Duolite A30 ($OH^-$, 9,0 мекв/г) пропускаючи культуральну рідину через неї.

Через кожні 12 год, а також завершивши культивування, для здійснення мікробіологічного контролю визначення концентрації джерела азоту, вуглецю та кількості пропіонової кислоти відбирають проби КР.

Вирощування культури відбувається до досягнення концентрації біомаси та концентрації пропіонової кислоти 16 г/л і 91,4 г/л, відповідно, при температурі 30 ºС впродовж 258 год. Для над синтезу пропіонової кислоти та створення анаеробних умов культивування під час виробничого біосинтезу у ферментер подається азот (*від ДР 2.2*).

# РОЗДІЛ 8
# КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПРОПІОНОВОЇ КИСЛОТИ
## 8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль виробництва включає перевірку чистоти культури *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 – висівом на агаризовані середовища в чашках Петрі зразка культуральної рідини (методом виснажувального штриха) та мікроскопіюванням, а також випробування поживного середовища на стерильність після процесу стерилізації.

Посів культуральної рідини на чашки Петрі здійснюють так: для аналізу відбирають 5 мл культуральної рідини, з цієї кількості відбирають стерильною піпеткою по 0,1 мл для засіву кожної з чашок Петрі. Для випробування використовують чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (виявлення бактерій, витримують за 37 ℃ на протязі 24 год) та сусло-агаром (виявлення грибів і дріжджів, витримують за 30 ℃ 7 діб). Після витримування чашок здійснюють візуальний аналіз вирослих колоній, враховуючи, що бактерії *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 утворюють опуклі напівпрозорі блискучі колонії (рис. 8.1), колір яких може варіюватися від кремового до червонуватого [46, 47].

Мікроскопіюють зразок, використовуючи препарат «роздавлена крапля», який готують так: краплину культуральної рідини наносять на предметне скло (попередньо знежирене), після чого мазок накривають покривним скельцем і проводять мікроскопіювання, переглядаючи зразок з використанням об'єктива зі збільшенням 40х. Клітини *P. freudenreichii* CICC 10019 (рис. 8.1) являють собою грампозитивні нерухливі аспорогенні плеоморфні палички (часто - булавоподібні) розміром 0,5-0,8×1-5 мкм, які можуть розташовуватися поодинці, попарно, короткими ланцюжками, у V- або Y-конфігураціях [46].

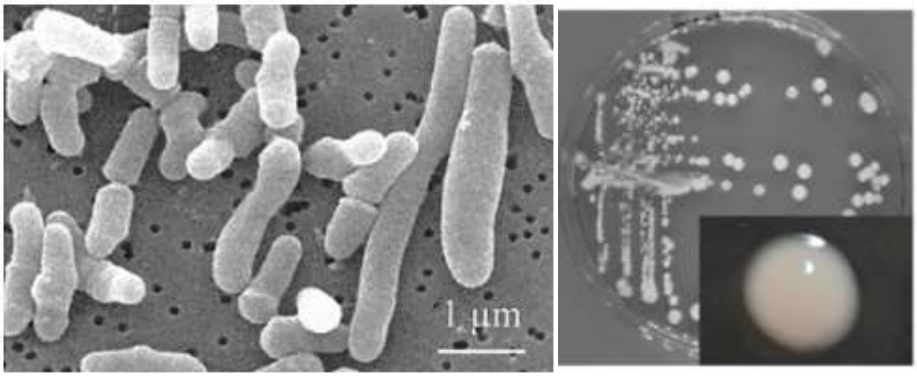



*Рис. 8.1.* **Морфологічні (зліва) та культуральні (справа) ознаки бактерій *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019**

Випробування поживного середовища на стерильність проводять його висівом на агаризовані середовища. Для аналізу відбирають 5 мл поживного середовища, з цієї кількості відбирають стерильною піпеткою по 0,1 мл для засіву кожної з чашок Петрі. Для випробування використовують такі ж агаризовані середовища, як і під час перевірки мікробіологічної чистоти культури: м'ясо-пептонний агаром – для виявлення бактерій (37 °С, 24 год) та сусло-агар – для виявлення грибів і дріжджів (30 °С, 7 діб). Після витримування чашок здійснюють візуальний аналіз поверхонь агаризованих середовищ. Ріст будь-яких мікроорганізмів не має спостерігатися [46].

## 8.2. Показники росту і синтезу пропіонової кислоти

### 8.2.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначають фотометрично. Відбирають пробу культуральної рідини об'ємом 1 мл, здійснюють її центрифугування за частоти обертання 10000 g упродовж 10 хв, щоб відділити біомасу, яку в подальшому ресуспендують у 1 мл фосфатного буферу. Оптичну густину утвореної суспензії визначають на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 600 нм, після чого здійснюють перерахунок на абсолютно суху біомасу за калібрувальним графіком [10].

### 8.2.2. Концентрація пропіонової кислоти

Концентрацію пропіонової кислоти визначають в отриманому після центрифугування 1 мл культуральної рідини (10000 g, 10 хв) супернатанті методом високоефективної рідинної хроматографії, під час якого

використовують колонку Beckman C18 (розмір частинок: 5 мкм, розміри колонки: 4,6 мкм*25 см). У якості елюента використовують 0,005 М розчин сірчаної кислоти, який подають зі швидкістю 0,6 мл/хв. Визначення концентрації пропіонової кислоти відбувається фотометрично за довжини хвилі 215 нм і температури 25 °С [10].

### 8.2.3. Визначення концентрації джерел Карбону та Нітрогену

Джерелом Карбону в поживному середовищі є гідролізат кукурудзяних стебел і гліцерол. Концентрацію гідролізату визначають за концентрацією основного його компоненту – глюкози (55 г/л, тобто, 5,5 %). Вміст глюкози вимірюють, використовуючи глюкозооксидазний метод, згідно з яким глюкоза піддається окисненню задля того, щоб утворився пероксиду водню, котрий, під час подальшої реакції з ортотолуїдином окиснює його, внаслідок чого утворюється забарвлений розчин. Далі проводять колориметричне визначення оптичної густини цього розчину за довжини хвилі світла 625 нм, використовуючи фотоелектроколориметр. За виміряним значенням оптичної густини визначають концентрацію глюкози, використовуючи калібрувальний графік [48]. Отримане значення перераховують на гідролізат кукурудзяних стебел діленням на 5,5 і множенням на 100.

Концентрацію гліцеролу визначають спектрофотометрично після низки хімічних реакцій. Спочатку гліцерол перетворюють на формальдегід внаслідок реакції з перйодатом натрію. Потім до розчину додають ацетилацетон в ізопропіловому спирті з метою перетворення формальдегіду на барвник. Спершу проводять центрифугування 5 мл культуральної рідини за частоти обертання 10000 g упродовж 10 хв для вилучення біомаси. 0,2 мл отриманого супернатанту вносять у пробірку, додають 0,2 мл розчину перйодату натрію ($NaIO_4$), пробірку струшують і залишають розчин для проходження реакції (10 хв). Після закінчення реакції в пробірку вносять 0,6 мл розчину ацетилацетону в ізопропіловому спирті, пробірку струшують. Далі проводять визначення оптичної густини утвореної забарвленої сполуки за довжини хвилі світла 410 нм, використовуючи спектрофотометр.

Концентрацію гліцеролу визначають за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами гліцеролу [49].

Як джерело Нітрогену в поживному середовищі виступає кукурудзяний екстракт, у якому Нітроген перебуває переважно в вигляді амінокислот (так званий амінний Нітроген) – 3 % від загальної маси екстракту [50]. Для визначення амінного Нітрогену застосовують мідний метод, суть якого: утворення комплексних сполук міді з амінокислотами з подальшим реагуванням міді з йодидом калію, внаслідок чого виділяється йод ($I_2$), який відтитровується тіосульфатом натрію ($Na_2S_2O_3$). Спершу проводять центрифугування 5 мл культуральної рідини за частоти обертання 10000 g упродовж 10 хв для вилучення біомаси. Отриманий супернатант підлужують, додаючи розчин натрію гідроксиду (0,1 М), до утвореного розчину додають надлишкову кількість ортофосфату міді, суспендованого в боратному буферному розчині. Ортофосфат, що не прореагував і випав в осад, вилучають фільтруванням. В отриманий фільтрат вносять оцтову кислоту (щоб утворився ацетат міді) і йодид калію, після чого виділений у результаті реакції йод відтитровують шляхом додавання розчину тіосульфату натрію (0,01 М). Концентрацію амінного азоту обчислюють у мг/л, використовуючи співвідношення: 1 мл 0,01 М тіосульфату натрію – 0,28 мг амінного азоту [51]. Концентрацію кукурудзяного екстракту визначають діленням отриманого значення на 3 та множенням на 100.

## 8.3. Карта постадійного контролю

*Таблиця 8.1*

| **Номер контрольної точки та назва стадії** | **Об'єкт контролю та визначуваний показник** | **Засоби та методи контролю** | **Періодичність відбору проб** | **Нормативні значення показника** |
|---|---|---|---|---|
| ***1*** | ***2*** | ***3*** | ***4*** | ***5*** |
| 1.1 *Забір повітря* $К_т$ | *повітрезабірник* висота повітрезабірника | - | Під час купівлі та встановлення | Н = 17 м |
| 1.2 *Попереднє грубе очищення повітря* $К_т$ | *повітря* ступінь очищення | Відповідно до паспорта фільтра | На виході з фільтра | Е = 90 % |

*Продовження табл. 8.1*

| *1* | *2* | *3* | *4* | *5* |
|---|---|---|---|---|
| 1.3 *Подача повітря на компресор* $К_т$ | *стиснене повітря* температура, тиск | Термометр, манометр | На виході з компресора | P = 0,4 МПа $t^o$ = 250 ºС |
| 1.4 *Охолодження повітря і видалення вологи* $К_т$ | *повітря* вологість, температура | Психрометр, термометр | На виході з охолоджувача | $t^o$ = 18 ºС W = 60 % |
| 1.5 *Підігрів повітря* $К_т$ | *повітря* вологість, температура | Психрометр, термометр | На виході з нагрівача | $t^o$ = 30-35 ºС W = 50 % |
| 1.6 *Тонке очищення повітря* $К_т$ | *повітря* ступінь очищення | Відповідно до паспорта фільтра | На виході з фільтра | Е = 92 % |
| 1.7 *Очищення повітря на індивідуальних фільтрах* Кт | *повітря* ступінь очищення | Відповідно до паспорта фільтра | На виході з фільтра | Е = 99,995 % |
| 2.1 *Подача азоту* Кт | *азот* ступінь очищення | Відповідно до паспорта фільтра | На виході з фільтра | Е = 95 % |
| 2.2 *Очищення азоту в індивідуальному фільтрі* Кт | *азот* ступінь очищення | Відповідно до паспорта фільтра | На виході з фільтра | Е = 99,995 % |
| 3.1 *Приготування розчину 6%-ї хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища* Кх | *готовий розчин хлоридної кислоти* вміст HCl | Хімічний метод з використанням тетраборату натрію та метилового червоного | Після приготування розчину | С = 6 % |
| 3.2 *Приготування і стерилізація 12% розчину аміаку* Кт, Км | *готовий розчин натрію гідроксиду* швидкість обертання мішалки, тиск, час, температура, стерильність | Годинник, манометр, тахометр, мікробіологічне випробування | Швидкість обертання мішалки, тиск, температура – автоматично; час – безперервно під час стерилізації; мікробіологічне випробування – після закінчення стерилізації | n = 100 об/хв t = 40 хв P = 0,15 МПа $t^o$ = 131 ºС стерильність |
| 4.1 *Зберігання гліцерину на виробничий біосинтез* Кт, Км | *гліцерин* температура, швидкість обертання мішалки | Датчик температури, тахометр | Температура та швидкість обертання мішалки підтримуються автоматично | $t^o$ = 25 ºС n = 70 об/хв |

*Продовження табл. 8.1*

| ***1*** | ***2*** | ***3*** | ***4*** | ***5*** |
|---|---|---|---|---|
| 5.1.1, 5.2.1, 5.3.1 *Приготування і стерилізація композиції 1* Кт, Км | *композиція 1* тиск, час | Манометр, годинник, мікробіологічне випробування | Тиск підтримується автоматично; час вимірюється безперервно під час стерилізації; мікробіологічне випробування – після закінчення стерилізації | t = 30 хв P = 0,05 МПа стерильність |
| 5.1.2, 5.2.2, 5.3.2 *Приготування і стерилізація композиції 2* Кт, Км | *композиція 2* тиск, час | Манометр, годинник, мікробіологічне випробування | Тиск підтримується автоматично; час вимірюється безперервно під час стерилізації; мікробіологічне випробування – після закінчення стерилізації | t = 40 хв P = 0,15 МПа стерильність |
| 5.4.1, 5.5.1 *Приготування і стерилізація композиції 1* Кт, Км | *композиція 1* температура розчинення, швидкість обертання мішалки, тиск і час стерилізації, стерильність | Годинник, манометр, тахометр, датчик температури, мікробіологічне випробування | Швидкість обертання мішалки, тиск, температура – автоматично, мікробіологічне випробування – після закінчення стерилізації | n = 100 об/хв $t^o$ (розчинення) = 40 ºС t = 30 хв $t^o$ = 112 ºС P = 0,05 МПа стерильність |
| 5.4.2 *Приготування і стерилізація композиції 2* Кт, Км | *композиція 2* температура розчинення, швидкість обертання мішалки, тиск і час стерилізації, стерильність | Годинник, манометр, тахометр, датчик температури, мікробіологічне випробування | Швидкість обертання мішалки, тиск, температура – автоматично, мікробіологічне випробування – після закінчення стерилізації | n = 100 об/хв $t^o$ (розчинення) = 40 ºС t = 40 хв $t^o$ = 131 ºС P = 0,05 МПа стерильність |
| 5.5.2 *Приготування і стерилізація композиції 2* $К_т$, $К_м$ | *композиція 2* температура розчинення, швидкість обертання мішалки, pH, тиск і час стерилізації, стерильність | Годинник, манометр, датчики температури та pH, тахометр, мікробіологічне випробування | Швидкість обертання мішалки, тиск, температура – автоматично, pH – перед стерилізацією, мікробіологічне випробування – після закінчення стерилізації | $t^o$ (розчинення) = 40 ºС n = 100 об/хв pH = 4,0 t = 40 хв $t^o$ = 131 ºС P = 0,15 МПа стерильність |
| 5.5.3 *Приготування і стерилізація композиції 3* $К_т$, $К_м$ | *композиція 3* швидкість обертання мішалки, тиск і час стерилізації, стерильність | Тахометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Швидкість обертання мішалки, тиск – автоматично, мікробіологічне випробування – після закінчення стерилізації | n = 100 об/хв t = 40 хв P = 0,15 МПа $t^o$ = 131 ºС стерильність |

*Продовження табл. 8.1*

| ***1*** | ***2*** | ***3*** | ***4*** | ***5*** |
|---|---|---|---|---|
| 6.1 *Підтримання колекційної культури* $К_т$, $К_м$ | *колекційна культура P. freudenreichii CICC 10019* мікробіологічна чистота, температура | Мікробіологічне випробування, датчик температури | Мікробіологічне випробування – кожні 3 міс, температура – автоматично | мікробіологічна чистота $t^o$ = 4 ºС |
| 6.2 *Одержання робочої культури* $К_т$, $К_м$ | *робоча культура P. freudenreichii CICC 10019* мікробіологічна чистота, температура, час | Мікробіологічне випробування, датчик температури, годинник | Температура підтримується автоматично, час – безперервно під час інкубації, мікробіологічне випробування – після закінчення інкубації | мікробіологічна чистота $t^o$ = 30 ºС t = 24 год |
| 6.3 *Вирощування посівного матеріалу на агаризованих поживних середовищах* Кт, Км | *робоча культура P. freudenreichii CICC 10019* мікробіологічна чистота, температура, час | Мікробіологічне випробування, датчик температури, годинник | Температура підтримується автоматично, час – безперервно під час інкубації, мікробіологічне випробування – після закінчення інкубації | мікробіологічна чистота $t^o$ = 30 ºС t = 24 год |
| 6.4 *Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці* Кт, Км | *культуральна рідина* мікробіологічна чистота, температура, швидкість обертання колб, час, концентрація біомаси, | Мікробіологічне випробування, термометр технічний, тахометр, годинник, фотоелектроколориметр | Температура, швидкість обертання колб – автоматично, час – безперервно під час культивування, мікробіологічне випробування і концентрація біомаси – після закінчення культивування | $t^o$ = 30 ºС t = 72 год n = 200 об/хв X = 8 г/л мікробіологічна чистота |
| 6.5, 6.6, 6.7 *Вирощування посівного матеріалу в посівних апаратах місткістю 5 л, 50 л і 500 л* $К_т$, $К_м$ | *культуральна рідина* температура, час, витрата аераційного повітря, швидкість обертання мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота | Мікробіологічне випробування, датчик температури, годинник, ротаметр, тахометр, фотоелектроколориметр | Температура, витрата аераційного повітря та швидкість обертання мішалки – автоматично, час – безперервно під час культивування, мікробіологічне випробування і концентрація біомаси – кожні 8 год і після закінчення культивування | $t^o$ = 30 ºС t = 72 год v = 1 л/(л*хв) $n = 200\ хв^{-1}$ X = 8 г/л на кінець культивування; мікробіологічна чистота |

*Закінчення табл. 8.1*

| ***1*** | ***2*** | ***3*** | ***4*** | ***5*** |
|---|---|---|---|---|
| 7.1 *Виробничий біосинтез в ферментері місткістю 5 м$^3$* Кт, Км, Кх | *культуральна рідина* температура, час, витрата азоту, pH, швидкість обертання мішалки, концентрація біомаси, концентрація пропіонової кислоти, мікробіологічна чистота | Мікробіологічне випробування, датчики температури та pH, годинник, ротаметр, тахометр, фотоелектроколориметр, рідинний хроматограф | Температура, витрата азоту та швидкість обертання мішалки – автоматично, час – безперервно під час культивування, мікробіологічне випробування, концентрація біомаси та пропіонової кислоти – кожні 12 год | $t^o$ = 30 ºС<br>t = 258 год<br>v($N_2$) = 1 м$^3$/(м$^3$*хв)<br>pH = 7,0<br>n = 200 хв-1<br>X = 16 г/л на кінецькультивування<br>С(пропіонової кислоти) = 91,4 г/л<br>мікробіологічна чистота |

# РОЗДІЛ 9
# АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Зазвичай технологічний процес на підприємствах є джерелом формування твердих, рідких та газоподібних відходів. В якості твердих відходів зазвичай виступає пакування та біомаса мікрооранізмів після синтезу цільового продукту. В якості газоподібних відходів слугують викиди вуглекислого газу отримувані в результаті життєдіяльності мікроорганізмів. В яксоті рідких відходів слугують залишки дезінфікуючих та миючих засобів, титрувальних агентів, та рідини що залишаються після видалення цільового продукту з КР. Зважаючи на можливі великі об'єми відходів на біотехнологічних виробництвах використовують різноманітні системи та методи для знешкодження відходів щоб зменшити вплив на навколишнє середовище.

## Система знешкодження твердих відходів

До основного об'єму твердих відходів відносять пакувальну тару, а зважаючи на сучасні тенденції які пов'язані з вторинним використанням сировини, вираховувати об'єми та способи утилізації даних речовин не має сенсу, через подальше сортування та відправлення на вторинну переробку. Також до твердих відходів відносять біомасу мікроорганізмів, так як цільовий продукт виробництва (пропіонова кислота) є екзометаболітом то після процесу ферментації біологічну масу необхідно утилізувати, найзручнішим та найпростішим способом утилізації біомаси є спалювання. Перевагою даного методу є те що енергію від згоряння можна застосовувати для підтримання сталої температури виробничих приміщень в зимовий період.

**Система знешкодження рідких відходів**

Щоб очистити наявні рідких відходів можна впровадити метод описаний в патенті [52]. Описана в патенті технологія є економічно вигідною так як дозволяє повторно використовувати очищену воду в цілях підприємства.

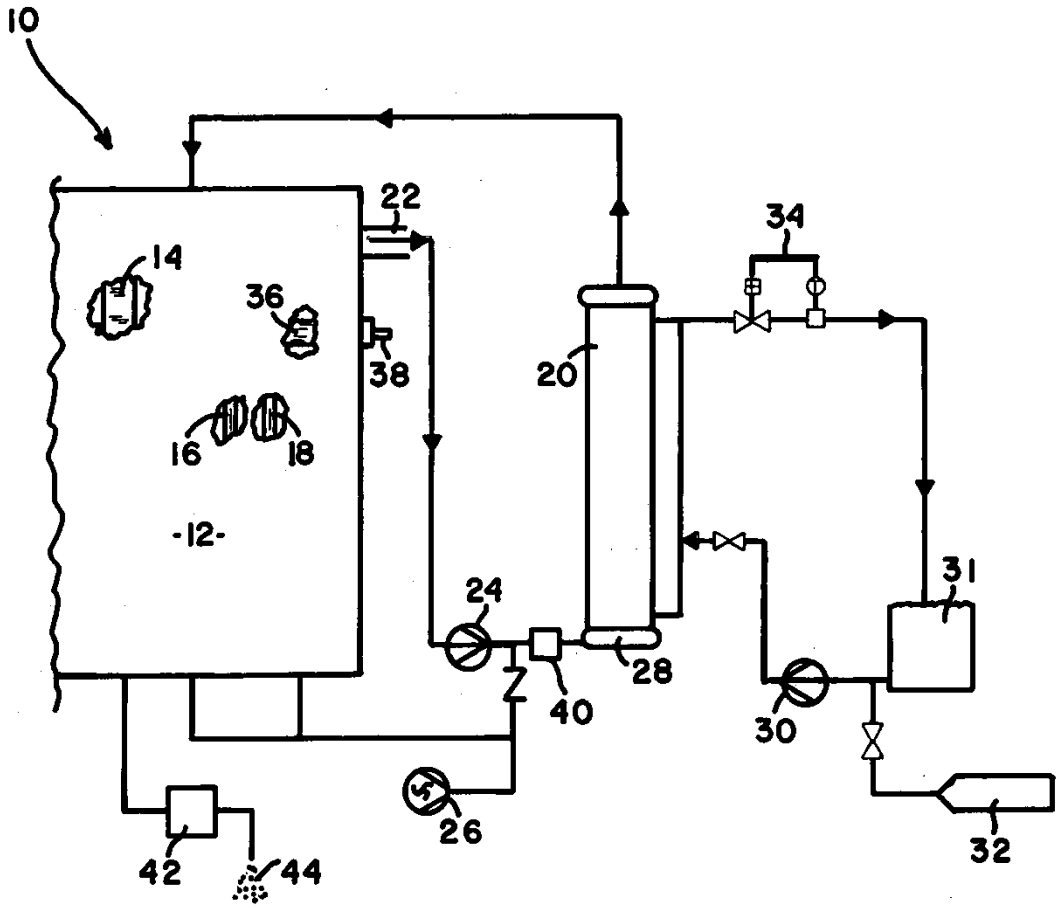



*Рис. 9.1.* **Схематичне зображення установки очищення рідких відходів**

Для очищення використовується біологічний басейн в якому розміщується колектор I.V.E (14), для стабілізування потоку рідини, стабілізувавши потік його направляють через шари біомаси, які використовується в якості природного біологічного фільтра. Далі потік проходить через перегородку omni-flow (16) для проведення денітрифікація, після рідини направляють в другу перегородку post omni-flow (18) для дезінфекції і освітлення рідини. Отриману рідину через патрубок (22) направляють до установки зворотного осмосу (20). В даній схемі також наявна спалювач (42), який при необхідності використовується для спалювати непотрібні речовини (наприклад мул, тощо) з перетворенням їх на золу.

Після проходження даної установки, рідина очищена на 100 % від речовин розміром більше 10 нм, отримана каламутність води складає менше 0,1 NTU, а також в даному розчинні повністю відсутні органічних сполуки з молекулярною масою більше 100 кДа.

**Система знешкодження газоподібних відходів**

Відпрацьоване повітря отримують під час доферментаційних процесів та апаратах, під час ферментації та на післяферментаційних стадіях в основному під час висушування продукту. Наявні газоподібні відходи на біотехнологічних виробництвах в основному містять аерозоль бактеріальних спор та вуглекислий газ.

Отримання посівного матеріалу займає 24 год на всіх стадіях, вирощування посівного матеріалу відбувається в інокуляторах 5 л та 60 л та в посівному апараті об'ємом 630 л, а процес ферментації в ферментері 5 $м^3$ – 258 год. В процесі вирощування біологічного агента відбувається аерація з однаковою швидкістю 1 л/(л·хв), а отже кількість віпрацьованого повітря становитиме:

$$(2{,}58 \text{ л} + 26{,}8 \text{ л} + 283 \text{ л}) \times 1 \text{ л/(л×хв)} \times 24 \text{ год} \times 60 = 449{,}8 \text{ м}^3$$

$$3\,500 \times 1 \text{ л/(л×хв)} \times 258 \text{ год} \times 60 = 54\,180 \text{ м}^3$$

$449{,}8 \text{ м}^3 + 54\,180 \text{ м}^3 = 54\,629{,}8 \text{ м}^3$ загальний об'єм відпрацьованих газів.

Для очищення отриманого значення відпрацьованого повітря можна скористатись технологією з патенту [53], вона одночасно спроможна очищувати до 100 тис $м^3$ відпрацьованих газів, що в нашому випадку задовольняє наші потреби.

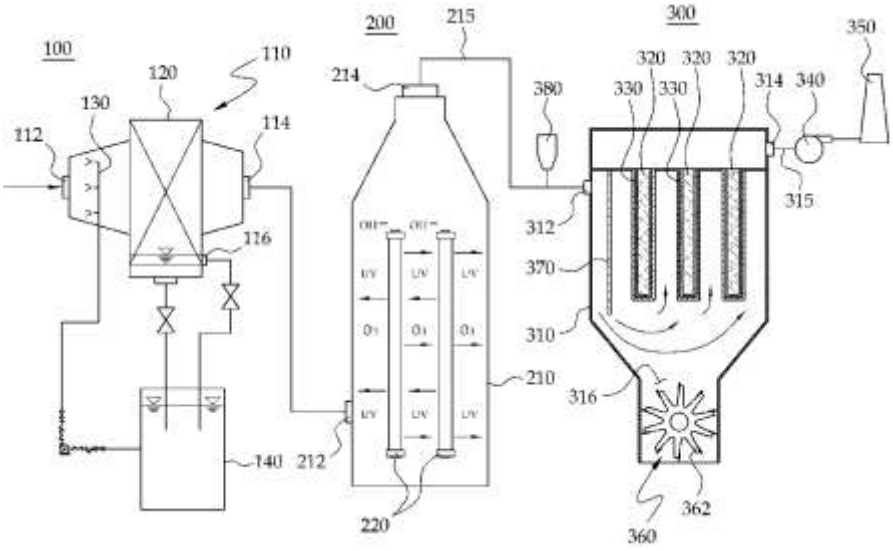



*Рис. 9.2.* **Схематичне зображення очищення газоподібних відходів**

Технологія описана в патенті [53] для очищення газів передбачає наявність пристрою вологого очищення (100), пристрою окиснення (200) та пристрою очищення сухого типу (300).

Пристрій вологого очищення складається з очисної камери вологого типу (110), яка передбачає наявність отвору для збирання відпрацьованих газів (112), для подальшого очищення газів випускним отвором (114) та розпилювальною насадкою (130) через яку у вхідний простір камери вологого очищення відбувається розпилення миючого розчину. Пристрій для окиснення складається з удосконаленої камери окиснення (210) та лампи ультрафіолевого випромінення (220). Очищувач сухого типу складається з очисної камери (310) сухого типу та великої кількості фільтруючих тканин (320).

# РОЗДІЛ 10
# АНАЛІЗ НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНОЇ ДОКУМЕНТАЦІЇ ТА НАУКОВО-ТЕХНІЧНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Зазвичай до виробництв обов'язковою є застосування нормативно-технічної документації, наш випадок не є виключенням, в якості цільового продукту біотехнологічного виробництва виступає пропіонова кислота, а враховуючи що дана речовина не є лікарським засобом, наявні вимоги для технологічного процесу будуть не такими жорсткими. Більш детально розглянемо нормативні-документи які можуть використовуватись при біотехнологічному синтезі пропіонової кислоти:

ДСТУ 3803-98 Біотехнологія. Терміни та визначення [54]

ДСТУ EN 12460:2019 Біотехнологія. Великосерійна технологія та виготовлення. Настанови щодо вибирання та встановлення устаткування відповідно до біологічного ризику (EN 12460:1998, IDT) [55]

ДСТУ EN 12683:2019 Біотехнологія. Змінені організми для використання в довкіллі. Настанови щодо складання характеристики генетично зміненого організму через аналізування тривкості зміни геному на молекулярному рівні (EN 12683:1998, IDT) [56]

ДСТУ EN 12689:2019 Біотехнологія. Настанови щодо оцінювання чистоти, біологічної активності та тривкості продуктів на основі мікроорганізмів (EN 12689:1998, IDT) [57]

ДСТУ ISO 7218:2014 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови щодо мікробіологічних досліджень (ISO 7218:2007,ISO 7218:2007/Amd 1:2013, IDT) [58]

ТУ 6-01-989-80 Пропионовая кислота

ДСТУ Б А.3.2-12:2009 Системи вентиляційні. Загальні вимоги [59]

ДСТУ prEN 1672-1-2001 Обладнання для харчової промисловості. Вимоги щодо безпеки і гігієни. Основні положення. Частина 1. Вимоги щодо безпеки (prEN 1672-1:1994, IDT). З поправкою [60]

ДСТУ 8828:2019 Пожежна безпека. Загальні положення [61]

ДСТУ 4312:2012 Протипожежна техніка. Системи газового пожежогасіння. Модулі ізотермічні. Загальні технічні умови [62]

ДСТУ ISO 11690-1:2005 Акустика. Практичні рекомендації щодо проектування малошумних робочих місць, обладнаних механізмами. Частина 1. Стратегія керування шумом (ISO 11690-1:1996, IDT) [63]

ДСТУ ISO 11690-2:2005 Акустика. Практичні рекомендації щодо проектування малошумних робочих місць, обладнаних механізмами. Частина 2. Заходи щодо керування шумом (ISO 11690-2:1996, IDT) [64]

ДСТУ 4462.0.01:2005 Охорона природи. Поводження з відходами. Терміни та визначення понять [65]

ДСТУ EN ISO 835:2018 Посуд лабораторний скляний. Піпетки мірні градуйовані (EN ISO 835:2007, IDT; ISO 835:2007, IDT) [66]

ДСТУ ISO 4787:2009 Посуд лабораторний скляний. Посуд мірний. Методи використання та перевіряння місткості (ISO 4787:1984, IDT) [67]

ДСТУ 3276-95 Посуд сталевий емальований. Загальні технічні умови. З поправкою [68]

ДСТУ ISO 1042:2005 Посуд лабораторний скляний. Колби мірні з однією позначкою (ISO 1042:1998, IDT) [69]

ДСТУ ISO 9001:2015. Системи управління якістю. Вимоги (ISO 9001:2015, IDT) [70]

ДСТУ ISO 14001:2015 Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосовування (ISO 14001:2015, IDT) [71]

ДСТУ ISO 14040:2013 Екологічне управління. Оцінювання життєвого циклу. Принципи та структура (ISO 14040:2006, IDT) [72]

## Список використаної літератури


1. Propionic Acid Market Outlook - 2026 [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.alliedmarketresearch.com/propionic-acid-market

2. Wang P., Wang Y., Liu Y. Novel in situ product removal technique for simultaneous production of propionic acid and vitamin B12 by expanded bed adsorption bioreactor. *Bioresource Technology*. 2012, 104: 652–659. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.047

3. Propanoic acid in Linstrom, Peter J.; Mallard, William G. (eds.); *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg (MD)

4. Cosmetic and Drug Preservation: Principles and Practice / Ed. Kabara J.J. — NY, 1984;

5. Food Chemicals Codex. — 6th edn. — Bethesda, 2008;

6. Health and Safety Executive. EH 40/2005: Workplace Exposure Limits. — Sudbury, 2005 (updated 2007);

7. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials / Ed. R.J. Lewis. — 11th edn. — NY, 2004.

8. Piwowarek, K., Lipińska. Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* strain T82. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017, 111(6) – 921–932. doi:10.1007/s10482-017-0991-7

9. Liu, Z., Ma, C. Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresource Technology*. 2012, 114 – 711–714. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.11

10. Wang, P., Jiao, Y. Novel fermentation process strengthening strategy for production of propionic acid and vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2014, 41(12) – 1811–1815. doi:10.1007/s10295-014-1513-5.

11. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.researchgate.net/figure/Nitrogen-content-and-cost-comparison-of-corn-steep-liquor-and-yeast-extract-in-dry-basis_tbl1_304365287

12. M. El Soda, S. Avd, etc. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), 2014

13. C. DeBordet, et Encyclopedia of Dairi Steences, 2002

14. Vorobjeva L.I., Khodjaev E.Y., Vorobjeva N.V., Propionic acid bacteria as probiotics, Microb. Ecol. Health Dis. 20 (2008) 109–112.

15. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Book Review. I*nt. J. of Syst. Bact.*, 1985, 408

16. Propionic Acid [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Prop%20acid%20report.pdf

17. Е 280 – Пропіонова кислота [Електронний ресурс] Режим доступу: https://uk.dobavkam.net/additives/e-280

18. Goldberg I. Rokem J. S. Organic and Fatty Acid Production, Microbial. *Encyclopedia of Microbiology*. 2009, 421–442. doi:10.1016/b978-012373944-5.00156-5

19. Періодичність перевірки температури зерна в складі [Електронний ресурс] Режим доступу: http://agro-business.com.ua/agro/zberihannia/item/17591-periodichnist-perevirki-temperaturi-zerna-v-skladi.html

20. Рекордний 2021 [Електронний ресурс] Режим доступу: https://latifundist.com/spetsproekt/956-rekordnij-2021--bilshe-100-mln-t-vrozhayu-mozhemo-zvikati-do-sotki-chi-tse-vinyatok

21. Обсяг виробництва, урожайність та зібрана площа сільськогосподарських культур за їх видами по регіонах [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2021/sg/ovuzpsg/ovuzpsg_1221.xls

22. Harvest 2021: Propionic acid supply issues impacting grain treatment [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.agriland.co.uk/farming-news/harvest-2021-propionic-acid-supply-issues-impacting-grain-treatment/

23. https://www.genome.jp/keggbin/show_pathway?org_name=xac&mapno=00500&mapscale=&show_description=show. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database.

24. Дезактин [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1187438859-dezaktin.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=CjwKCAjwitShBhA6EiwAq3RqA88Qyqv0MlkrbVwRbE5c7baPB0hYZGsDJfXS0hD3LLkMR0S7E38ayBoCPAIQAvD_BwE

25. Методичні рекомендації [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://atma.ua/download/?id=183

26. Ексан Про Дез, антимікробна дія [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p914551087-eksan-pro-dez.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_dom_i_sad&gclid=CjwKCAjwitShBhA6EiwAq3RqA63qo322zwd-kQ9lxX0Rgkv7Cgprp5peO33Fks4SGZzQUH8QMq1Q7RoCZ5YQAvD_BwE

27. Каустична сода [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p694734755-kausticheskaya-soda-granula.html?&primelead=Mi43NA

28. Keshav A., Wasewar K. L. Back extraction of propionic acid from loaded organic phase. Chemical Engineering Science. 2010, 65(9): 2751–2757. doi:10.1016/j.ces.2010.01.010

29. Wang P., Wang Y., Su Z. 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*. 2011, 166(4): 974–986. doi:10.1007/s12010-011-9485-7

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

31. Karp E. M., Cywar R. M., Manker L. P. Post-fermentation recovery of bio-based carboxylic acids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018. doi:10.1021/acssuschemeng.8b03703

32. Карлаш Ю. В., Омельчук Є. О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Ю. В. Карлаш, Є. О. Омельчук. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

33. Фільтр грубого очищення [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.technofilter.com.ua/types/mesh/.

34. Компресор [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresori-seriyi-tidy-3-50.

35. Теплообмінник-охолоджувач [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-oxolodzhuvachi/.

36. Ресивер [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresori-seriyi-tidy-3-50.

37. Теплообмінник-нагрівач [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://opeks.ua/ua/parovi-kaloriferi-nagrivachi.

38. Фільтр тонкого очищення [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.technofilter.com.ua/types/hepa/.

39. Фільтр індивідуальний [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.technofilter.com.ua/types/hepa/.

40. SIP and CIP CustomisablePilotandIndustrialScaleFermenters/Bioreactors [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.solarisbiotech.com/en/fermenters-bioreactors-pilot-industrial-customizable.

41. Перистальтичні насоси [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://tapflo.ua/images/pt_ptl_ua_rev1_2019.pdf.

42. Лічильник-дозатор для води [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1139912056-schetchik-dozator-dlya.html.

43.Апарати сталеві з механічним перемішуючим пристроєм [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php.

44.Stirred Pressure AutoclaveReactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.amarequip.com/stirred-pressure-autoclave-reactor.

45. Дозатор ваговий автоматичний [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://vesmaster.com.ua/images/dozators/doz4.html.

46. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс] : конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ – 2019. – 252 с.

47. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 368 с., ил.

48. Пирог Т.П., Антонюк М.М., Ігнатенко С.В. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 "Біотехнологія" ден. форми навч. — Київ : НУХТ, 2010. — 127 с.

49. Kuhn, J., Muller, H., Salzig, D., Czermak, P. A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2015, 18 (3): 252–255. doi: 10.1016/j.ejbt.2015.01.005.

50. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.researchgate.net/figure/Nitrogen-content-and-cost-comparison-of-corn-steep-liquor-and-yeast-extract-in-dry-basis_tbl1_304365287

51. Визначення вмісту амінного азоту [Електроннийресурс] Режимдоступу: https://studfile.net/preview/5193901/page:15/.

52. Pat. US20070045183A1 United States. Purified water reclamation process / Dee Murphy. Pub. 01.03.2007 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://patents.google.com/patent/US20070045183A1/en?q=(purification+water+waste)&oq=purification+water+waste

53. Pat. KR20100118643A Korean. Gas furifying system / 이인섭김헌. Pub. 08.11.2010 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://patents.google.com/patent/KR20100118643A/en?q=(industrial+scrubbers+for+cleaning+air+waste)&oq=+industrial+scrubbers+for+cleaning+air+waste

54. ДСТУ 3803-98 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://national_standards_ukr.academic.ru/20655/%D0%94%D0%A1%D0%A2%D0%A3_3803-98

55. ДСТУ EN 12460:2019 Біотехнологія. Великосерійна технологія та виготовлення. Настанови щодо вибирання та встановлення устаткування відповідно до біологічного ризику (EN 12460:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=84126

56. ДСТУ EN 12683:2019 Біотехнологія. Змінені організми для використання в довкіллі. Настанови щодо складання характеристики генетично зміненого організму через аналізування тривкості зміни геному на молекулярному рівні (EN 12683:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=84130

57. ДСТУ EN 12689:2019 Біотехнологія. Настанови щодо оцінювання чистоти, біологічної активності та тривкості продуктів на основі мікроорганізмів (EN 12689:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=84132

58. ДСТУ ISO 7218:2014 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови щодо мікробіологічних досліджень (ISO

7218:2007,ISO 7218:2007/Amd 1:2013, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=82219

59. ДСТУ Б А.3.2-12:2009 Системи вентиляційні. Загальні вимоги [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://ksv.do.am/GOST/DSTY_ALL/DSTY4/dsty_b_a.3.2-12-2009.pdf

60. ДСТУ prEN 1672-1-2001 Обладнання для харчової промисловості. Вимоги щодо безпеки і гігієни. Основні положення. Частина 1. Вимоги щодо безпеки (prEN 1672-1:1994, IDT). З поправкою [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=65272

61. ДСТУ 8828:2019 Пожежна безпека. Загальні положення [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=82138

62. ДСТУ 4312:2012 Протипожежна техніка. Системи газового пожежогасіння. Модулі ізотермічні. Загальні технічні умови [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=54571

63. ДСТУ ISO 11690-1:2005 Акустика. Практичні рекомендації щодо проектування малошумних робочих місць, обладнаних механізмами. Частина 1. Стратегія керування шумом (ISO 11690-1:1996, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=51154

64. ДСТУ ISO 11690-2:2005 Акустика. Практичні рекомендації щодо проектування малошумних робочих місць, обладнаних механізмами. Частина 2. Заходи щодо керування шумом (ISO 11690-2:1996, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=51155

65. ДСТУ 4462.0.01:2005 Охорона природи. Поводження з відходами. Терміни та визначення понять [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=51368

66. ДСТУ EN ISO 835:2018 Посуд лабораторний скляний. Піпетки мірні градуйовані (EN ISO 835:2007, IDT; ISO 835:2007, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=80548

67. ДСТУ ISO 4787:2009 Посуд лабораторний скляний. Посуд мірний. Методи використання та перевіряння місткості (ISO 4787:1984, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=26026

68. ДСТУ 3276-95 Посуд сталевий емальований. Загальні технічні умови. З поправкою [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=97976

69. ДСТУ ISO 1042:2005 Посуд лабораторний скляний. Колби мірні з однією позначкою (ISO 1042:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=53493

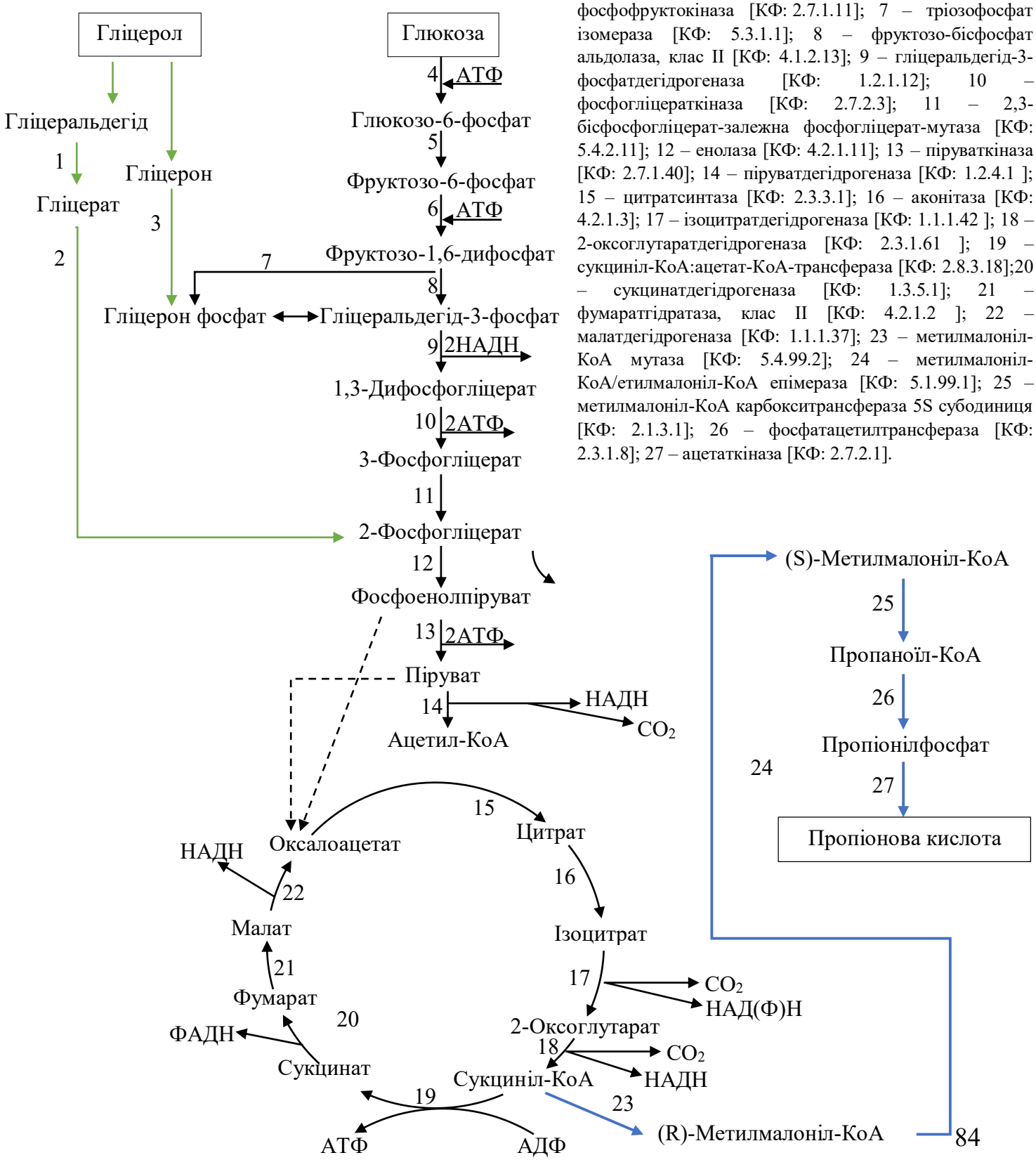
70. ДСТУ ISO 9001:2015. Системи управління якістю. Вимоги (ISO 9001:2015, IDT). [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://khoda.gov.ua/image/catalog/files/%209001.pdf

71. ДСТУ ISO 14001:2015 Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосовування (ISO 14001:2015, IDT). [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://quality.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2018/10/%D0%94%D0%A1%D0%A2%D0%A3-ISO_14001-2015-.pdf

72. ДСТУ ISO 14040:2013 Екологічне управління. Оцінювання життєвого циклу. Принципи та структура (ISO 14040:2006, IDT). [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=70997

# ДОДАТКИ

## Схема біотрансформації глюкози + гліцеролу в пропіонову кислоту




Ферменти:
1 – альдегіддегідрогеназа [КФ: 1.2.1.3]; 2 – гліцерат-2-кіназа [КФ: 2.7.1.165]; 3 – дигідроксиацетонкіназа [КФ: 2.7.1.121].4 – поліфосфатглюкокіназа [КФ: 2.7.1.63]; 5 – глюкозо-6-фосфат ізомераза [КФ: 5.3.1.9]; 6 – 6-фосфофруктокіназа [КФ: 2.7.1.11]; 7 – тріозофосфат ізомераза [КФ: 5.3.1.1]; 8 – фруктозо-бісфосфат альдолаза, клас II [КФ: 4.1.2.13]; 9 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа [КФ: 1.2.1.12]; 10 – фосфогліцераткіназа [КФ: 2.7.2.3]; 11 – 2,3-бісфосфогліцерат-залежна фосфогліцерат-мутаза [КФ: 5.4.2.11]; 12 – енолаза [КФ: 4.2.1.11]; 13 – піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40]; 14 – піруватдегідрогеназа [КФ: 1.2.4.1 ]; 15 – цитратсинтаза [КФ: 2.3.3.1]; 16 – аконітаза [КФ: 4.2.1.3]; 17 – ізоцитратдегідрогеназа [КФ: 1.1.1.42 ]; 18 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа [КФ: 2.3.1.61 ]; 19 – сукциніл-КоА:ацетат-КоА-трансфераза [КФ: 2.8.3.18];20 – сукцинатдегідрогеназа [КФ: 1.3.5.1]; 21 – фумаратгідратаза, клас II [КФ: 4.2.1.2 ]; 22 – малатдегідрогеназа [КФ: 1.1.1.37]; 23 – метилмалоніл-КоА мутаза [КФ: 5.4.99.2]; 24 – метилмалоніл-КоА/етилмалоніл-КоА епімераза [КФ: 5.1.99.1]; 25 – метилмалоніл-КоА карбокситрансфераза 5S субодиниця [КФ: 2.1.3.1]; 26 – фосфатацетилтрансфераза [КФ: 2.3.1.8]; 27 – ацетаткіназа [КФ: 2.7.2.1].