

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан
факультету)

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

(підпис) Наталія ГРЕГІРЧАК
(прізвище та ініціали)

(підпис) Віктор СТАБНІКОВ
(прізвище та ініціали)

«___» _____ 2023 р.

«___» _____ 2023 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

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

на тему: «Біосинтез ціанкобаламіну *Propionibacterium shermanii*»

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

(прізвище, ім'я, по батькові повністю) **МОРОЗ ЯРОСЛАВ АНДРІЙОВИЧ** (підпис)

Керівник _____ **УДИМОВИЧ ВІКТОР МИКОЛАЙОВИЧ** (підпис)
(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

Консультанти _____ (підпис)
(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)
(прізвище та ініціали)

Рецензент ХАРЧЕНКО ЄВГЕН _____ (підпис)
(прізвище та ініціали)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 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 ” лютого 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МОРОЗА ЯРОСЛАВА АНДРІЙОВИЧА

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: Біосинтез ціанкобаламіну *Propionibacterium shermanii*

керівник роботи: УДИМОВИЧ Віктор Миколайович асис., д.ф.б.,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 12.06.2023

3. Вихідні дані до роботи Об'єм ферментера 5 м³ коефіцієнт заповнення – 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту, обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, біосинтез цільового продукту, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва, аналіз перспектив впровадження систем екологізації виробництва, нормативно-технічна документація використана під час проектування виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу Апаратурна та технологічна схема Біосинтез ціанкобаламіну *Propionibacterium shermanii*

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання _____ лютого 2023 року _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	03.03.2023 – 10.03.2023	
	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.03.2023 - 18.03.2023	
	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	20.03.2023- 25.03.2023	
	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	28.03.2023 - 04.03.2023	
	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	07.03.2023 – 12.03.2023	
	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	14.04.2023 – 20.04.2023	
	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	22.04.2023 – 29.04.2023	
	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	01.05.2023 – 15.05.2023	
	РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження систем екологізації виробництва	16.05.2023 – 24.05.2023	
	РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація використана під час проектування виробництва	24.05.2023 – 30.05.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Ярослав МОРОЗ _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Віктор УДИМОВИЧ _____
(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	7
1.1 Загальна характеристика вітаміну	7
1.2 Ціанокобаламін у фармацевтиці.....	8
1.3 Дія на організм	11
1.4 Дефіцит вітаміну	12
1.5 Використання вітаміну у косметології	14
1.6 Ціанокобаламін в тваринництві та ветеринарії	14
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	21
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	21
2.2. Морфолого-культуральні ознаки.....	22
2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки	23
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	24
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	28
3.1. Потреба у цільовому продукті	28
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	30
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	32
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	32
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	37
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	37
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	39
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	40
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.	40
5.1.1. Вибір умов і способу культивування	40
5.1.2. Вибір типу ферментера.....	41
5.1.3. Обґрунтування підготовки аераційного повітря та азоту.....	42

5.1.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	44
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	52
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	56
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	71
8.1. Мікробіологічний контроль	71
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	72
8.2.1. Концентрація біомаси	72
8.2.2. Концентрація ціанокобаламіну.....	73
8.2.3. Концентрація джерела Карбону	73
8.2.4 Концентрація джерела Нітрогену.....	75
РОЗДІЛ 9 Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва.....	76
9.1 Системи знешкодження рідких відходів	76
9.1.1. Фізико-хімічні методи	76
9.1.2. Біологічні методи	76
9.1.3. Мембранні технології	77
9.2 Системи знешкодження газоподібних відходів.....	77
9.3 Системи знешкодження твердих відходів	77
РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва.....	79
10.1 Основні положення щодо стандартизації в Україні	79
10.2 Державна система стандартизації	79
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	81

РЕФЕРАТ

В даній роботі проведено техніко-економічне обґрунтування біосинтезу вітаміну В₁₂ культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5, в результаті розрахунків було визначено річну потребу ціанокобаламіну для лікування дефіциту В₁₂ та В₁₂-дефіцитної анемії, яка складає 0,85 кг/рік.

Також розраховано необхідне технологічне обладнання та кількість стадій вирощування посівного матеріалу. В підсумку для виробничого біосинтезу 0,85 кг вітаміну В₁₂ культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 в рік, необхідно проводити виробничий синтез в ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу для виробничого синтезу буде відбуватись в чотири етапи та складається з отримання посівного матеріалу в колбах на качалці (2 шт), вирощування посівного матеріалу в інокуляторах 5 та 50 л та в посівному апараті об'ємом 500 л.

Розраховано необхідну площу для миття та дезінфекції приміщення, та обрано дезінфекційні засоби «Вернедор» та «Ексан Про Дез» через меншу кількість коштів, затрачених на загальну дезінфекцію виробничих приміщень. Миття обладнання буде відбуватись розчином каустичної соди та «ДЕЗОлайт», через менші економічні витрати.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, десяти розділів та списку використаної літератури (60 найменування). Загальний обсяг роботи – 87 сторінки, 10 рисунка, 15 таблиць, апаратурної та технологічної схем

Ключові слова: штам *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5, вітамін В₁₂, ціанокобаламін, *Propionibacterium*, мікробіологічний синтез, дефіцит В₁₂, В₁₂-дефіцитна анемія.

ВСТУП

Біотехнологія забезпечує виробництво лікарських засобів, харчових продуктів, створення трансгенних мікроорганізмів, рослин і тварин. Її досягнення використовуються майже у всіх галузях науки і техніки, адже саме біотехнологічні розробки допомагають створювати якісні та недорогі продукти.

Для підтримання нормальної життєдіяльності організму крім білків, жирів, вуглеводів, мінеральних речовин і води потрібні вітаміни. Вітаміни - це група додаткових речовин їжі, що належать до різних класів органічних сполук і за рідкісним винятком не синтезуються в організмі людини. Вони мають сильний і певною мірою специфічний вплив на процеси обміну, причому в дуже невеликих кількостях.

Усі життєві процеси протікають в організмі при безпосередній участі вітамінів. Вітаміни входять до складу більше 100 ферментів, що запускають величезне число реакцій, сприяють підтримці захисних сил організму, підвищують його стійкість до дії різних чинників довкілля, допомагають пристосовуватися до екологічної обстановки, що все погіршується. Вітаміни грають найважливішу роль в підтримці імунітету, тобто вони роблять наш організм стійкішим до хвороб. Вітаміни групи В активують білковий, жировий і вуглеводний обмін, тим самим беручи участь в кровотворенні і нормальному функціонуванні нервової тканини, зокрема вітамін В₁₂ має величезне значення в медицині. Продуцентами ціанокобаламіну можуть виступати представники родини *Propionibacterium*, так раніше було обрано для синтезу *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 який має суттєву перевагу перед іншими, оскільки характеризується вищою концентрацією вітаміну.

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</i>			
З	Ли	№ докум.	Підп	Д				
Розроб.	Мороз Я.А.				<i>ВСТУП</i>	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Удимович						5	87
Реценз.								
Н.								
Затверд.	Стабніков					<i>Кафедра БТМ /</i>		

*Новизною даної роботи є розроблення технологічної схеми з врахуванням геометричних об'ємів виробництва для синтезу ціанокобаламіну при культивуванні *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5.*

РОЗДІЛ 1.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІАНОКОБАЛАМІНУ

1.1. Загальна характеристика вітаміну

Ціанокобаламін, широко відомий як вітамін В12 є дуже незамінним вітаміном, завдяки тому, що він містить кобальт. Цей вітамін природним чином виробляється бактеріями і необхідний для синтезу ДНК і виробництва енергії в клітинах. Вітамін В12 має багато форм, включаючи форми ціано-, метил-, дезоксиаденозил- та гідроксикобаламіну [1].

Вітамін В12 хімічно ідентифікується з молекулярною формулою $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ і має молекулярну масу 1355,3 г/моль. Структура вітаміну В12 показана на рис.3.1. Він містить ядро корину і тетрапірольну кільцеву структуру з центральним іоном кобальту [2].

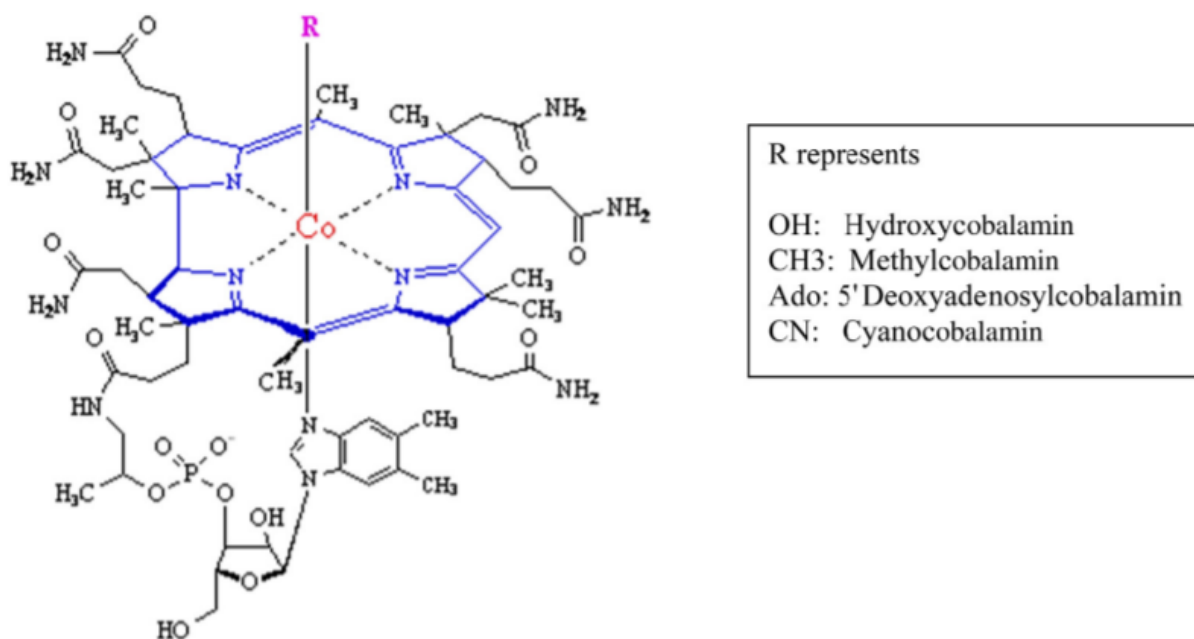


Рис.1.1. Структурна формула ціанокобаламіну [2]

Вітамін В12 не має запаху та смаку, має вигляд темно-червоних кристалів або червоного кристалічного порошку. Температура плавлення перевищує 300 °С, він розчинний у спирті і нерозчинний в ацетоні або хлороформі.

					НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ			
З	Ли	№ докум.	Підп	Д	РОЗДІЛ 1	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.	Мороз Я.А.						7	87
Перевір.	Удимович					Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н.								
Затверд.	Стабніков							

Розчини вітаміну стерилізують при температурі 100 С° протягом 30 хвилин так як при тривалому автоклавуванні вітамін руйнується. Ціанокобаламін відносно стабільний на світлі і при високих температурах. Водний розчин нейтральний з максимальною стабільністю в діапазоні рН 4,5–5,0. Він також гігроскопічний і під впливом повітря може поглинати до 12% води. Комерційно доступний вітамінний препарат містить ціанід як ліганд, але ціанід не присутній у природній формі вітаміну [2,3].

1.2. Ціанокобаламін у фармацевтиці

Ціанокобаламін необхідний для здоров'я людини. Він впливає на формування клітин крові та на правильну роботу нервової системи. Також впливає на стан інших тканин, що швидко оновлюються – імунної системи, шкіри та слизової шлунково-кишкового тракту. Позитивно впливає на обмін речовин, рух ліпідів і вуглеводів в організмі. У дітей сприяє зростанню та покращенню апетиту. Збільшує енергію. Покращує концентрацію, пам'ять та рівновагу [4,5].

Дефіцит вітаміну В12 може викликати анемію, а також злякисні та незворотні неврологічні ускладнення [4].

Ін'єкційна форма вітаміну В12 має вирішальне значення для лікування багатьох станів, таких як [4]:

- злякисна хвороба Аддісона Бірмера – специфічний тип анемії, що виникає внаслідок нестачі вітаміну В12;
- мегалобластна анемія;
- дефіцит вітаміну В12, що виникає внаслідок дієти без продуктів тваринного походження;
- втрата внутрішнього фактора Касл (глікопротеїну, який виділяється зі слизової оболонки шлунка і забезпечує всмоктування вітаміну В12 в кишечнику), спричинена резекціями шлунка;
- хронічний атрофічний гастрит;
- синдроми мальабсорбції після резекції клубової кишки;
- целиакія викликана непереносимістю глютену;

- тропічний литник — захворювання шлунково-кишкового тракту, що призводить до порушення всмоктування поживних речовин;
- хвороба Крона – запальне захворювання шлунково-кишкового тракту;
- синдром сліпої петлі.

Вітамін також використовується в тесті Шиллінга (засіб вивчення засвоєння вітаміну В12). Багаті джерела вітаміну В12 зазвичай доступні і споживаються в м'ясі та молочних продуктах. Звичайне харчування в більшості випадків забезпечує повне покриття потреби у вітаміні В12, а організм людини при нормальному функціонуванні має великий запас [4].

Вміст вітаміну В12 в деяких харчових продуктах зазначено в таблиці 3.1.

Таблиця 1.1.

Деякі харчові джерела кобаламіну [5]

Харчовий продукт	Вміст вітаміну в 100 г продукту, мкг
Печінка теляча	60
Телятина	3
Свинина	2
Баранина	2 – 3
Яйця	1,95
Грудка індички	1,6
Молоко коров'яче	0,4
Сир	1,05 – 2,2
Нирки телячі	25
Тріска	1,6
Кета	4,1
Скумбрія	12
Креветки	1,1
Мідії	12

Вітамін В12 зазвичай приймається всередину. Він доступний у різних формах, включаючи жувальні таблетки та жувальні таблетки, капсули, таблетки, порошки, смужки, краплі та рідини. Вітамін В12 також доступний у формі для ін'єкцій, як це зазначено вище, які вводиться підшкірно (в шкірний жир), внутрішньом'язово (у м'язи) або внутрішньовенно (у вени) [6]. Приклади лікарських форм ціанокобаламіну представлено на рис.1.2.



Рис.1.2. Приклади лікарських форм ціанокобаламіну [7-9]

У таблиці 1.2 наведено звичайний діапазон доз і рекомендована дієтична норма (РДН) вітаміну В12 для різних вікових груп. Людям з дефіцитом вітаміну В12 можуть знадобитися дози на рівні або вище РДН [6].

Таблиця 1.2.

Добова потреба у ціанокобаламіні в залежності від віку [6]

Вікова група, років		Ціанокобаламін, мкг/день	
		РДН	Звичайна доза
Діти	1-3	0,9	0,9-1000
	4-8	1,2	0,9-1000
Підлітки	9-13	1,8	0,9-1000
	14-18	2,4	1,4-1000
Дорослі	≥19	2,4	1,4-1000
Вагітні	14-50	2,6	1,4-1000
Годування груддю	14-50	2,8	1,4-1000

Вітамін В12, як правило, добре переноситься більшістю людей, якщо його приймати в рекомендованих кількостях. Побічні ефекти можуть включати легку діарею, свербіж, згустки крові, зміна кольору сечі та алергічні реакції [6].

Люди з хворобою Лебера (генетична хвороба очей) або ті, у кого є алергія або чутливість до кобальту або кобаламіну, повинні проконсультуватися зі своїм лікарем, перш ніж приймати добавки вітаміну В12 [6].

Люди з анемією повинні отримати рекомендацію свого сімейного лікаря, яке лікування їм підходить, перш ніж почати приймати будь-які вітамінні

добавки. Прийом добавок вітаміну В12 до того, як лікар поставив правильний діагноз, може ускладнити його діагностику типу анемії [6].

Вітамін В12 з харчових джерел може взаємодіяти з деякими ліками, включаючи інгібітори протонної помпи (наприклад, омепразол, пантопризол), блокатори Н2 (наприклад, фамотидин, ранітидин) і метформін. Вони можуть вплинути на засвоєння харчового В12 організмом, хоча це не є проблемою з добавками. Надмірне вживання алкоголю більше 2 тижнів також може зменшити всмоктування вітаміну В12. Слід уникати прийому комбінації вітаміну В12 і хлорамфеніколу (антибіотик), оскільки останній може знищити новоутворені клітини крові, які утворював вітамін В12. Вітамін С і добавки калію можуть зменшити дію вітаміну В12 [6].

У поєднанні з фолієвою кислотою (В9) вітамін В12 може виявитися найефективнішим засобом для відновлення життєвих сил. Вітамін В12 краще діє в організмі в комплексі з іншими вітамінами, наприклад А, Е і С. Але, в той же час даний вітамін може посилити алергічну реакцію на вітамін В1. Не рекомендується одночасна ін'єкція вітаміну В1, В3, В6 та В12, а також з пеніциліном, стрептоміцином [5].

Шкідливість вітаміну В12 для організму не виявлено, крім випадків передозування, що супроводжуються алергічними реакціями. Також необхідно враховувати індивідуальну реакцію на вітамін [5].

1.3. Дія на організм

При пероральному потраплянні в організм В12 зв'язується з білком слини – R-протеїном, який захищає його у шлунку від дії соляної кислоти. При вступі до шлунка, вітамін, звільнившись від R-протеїну, з'єднується з глікопротеїдом – внутрішнім фактором Касла, що проводить його через агресивну середовище шлункового соку, захищаючи його від травних ферментів, і навіть від мікрофлори кишечника. У поєднанні з глікопротеїдом В12 стає здатний проникнути через епітеліальні клітини клубової кишки і далі за допомогою транспортних білків крові (альфа-і бетаглобулінів) у вигляді

гідроксикобаламіну розноситься організмом і головним чином потрапляє в печінку [10].

Сам по собі кобаламін не активний, для включення себе в два основні процеси - окислення залишку жирних кислот і трансамінування амінокислоти гомоцистеїну з подальшим утворенням метіоніну - набуває двох коферментних форм: дезоксіденозин-кобаламін і метилкобаламін відповідно [10].

Дезоксіденозин-кобаламін бере участь у реакції ізомеризації – перенесення радикальної групи на місце водню, а водню на вільний зв'язок вуглецю. У реакціях окислення незамінних амінокислот (валін, ізолейцин, цистеїн і т.д.) це призводить до утворення великої кількості енергії у вигляді сукценіл-КоА, що використовується в циклі трикарбонових кислот [10].

Метилкобаламін допомагає утворенню метіоніну з гістидину. Метіонін є попередником таких незамінних речовин, як адреналін, креатин, карнітин та ін. Крім того, реакція утворення метіоніну сприяє утриманню фолієвої кислоти (Вітамін В9) усередині клітини [10].

Ціанокобаламін вводять інтраназально, перорально та парентерально. Зберігається вітамін в основному в печінці, але в кістковому мозку також міститься значна кількість поглиненого вітаміну В12. Цей вітамін проникає через плаценту та поширюється у грудне молоко. Ентерогепатична рециркуляція зберігає системні запаси. Період напіввиведення становить близько 6 діб (а в печінці в середньому 400 днів). Ліквідація відбувається головним чином через жовч. Однак надлишок ціанокобаламіну з організму екскретується і в незмінену вигляді із сечею [10].

1.4. Дефіцит вітаміну

Дефіцит вітаміну В12 може призвести до розвитку макроцитарної (мегалобластної) анемії. Основним її проявом є зменшення кількості еритроцитів у крові, але збільшення їх розміру – утворення макроцитів. Макроцити, як правило, мають більш коротку тривалість життя в порівнянні з нормальними еритроцитами та більше схильні до гемолізу, що призводить до втоми, слабкості та інших симптомів анемії [11].

Нестача вітаміну В12 загрожує ураженням нервової системи (фунікулярним мієлозом), що проявляється у вигляді поколювання в ногах та руках пацієнта (дистальні парестезії), розлад чутливості, підвищення сухожильних рефлексів [11].

Основні причини дефіциту вітаміну В12 в організмі [11]:

1. Недостатнє надходження. В12 накопичується переважно в печінці та селезінці. Оскільки запаси цього вітаміну в організмі досить великі, а виведення відбувається повільно, до створення значного дефіциту потрібно близько п'яти років недостатнього надходження їх у організм. Відповідно, групами ризику є голодуючі люди та вегетаріанці.

2. Порушення всмоктування. Дефіцит В12 іноді виникає при різних захворюваннях тонкої кишки, що порушують всмоктування цього вітаміну (целиакії, хвороби Крона, зниженні кислотності шлункового соку (ахлоргідрії)), а також при зменшенні реабсорбуючої поверхні після резекції тонкої кишки. Однак найчастіша причина дефіциту В12 – перніціозна анемія. Основу цього захворювання лежить вроджена нездатність шлунка секретувати речовину, необхідна для всмоктування вітаміну В12 в кишечнику.

3. Порушення утилізації. Різні захворювання печінки та нирок, а також зловживання алкоголем призводить до зниження накопичення та збільшення виділення вітаміну В12.

4. Збільшення потреби організму у вітаміні. При різних захворюваннях, що вимагають великої кількості вітаміну В12, наприклад, гемолітичної анемії, гіпертиреозі та альфа-таласемії.

Стани, які впливають на зниження рівня вітаміну В12 [11]:

- Перніціозна анемія.
- Втрата вітаміну при глистних інвазіях (широкий лентець).
- Вагітність (найчастіше в останньому триместрі).
- Повна або часткова гастроектомія.
- Атрофічний гастрит.
- Запальні захворювання кишківника.

- Хвороби кишечника, що супроводжуються порушенням всмоктування.
- Природжена відсутність транскобаламіну-2, через який порушується всмоктування та транспортування вітаміну В12.
- Туберкульоз клубової кишки.
- Лімфома тонкої кишки.

1.5. Використання вітаміну у косметології

Вважається, що вітамін В12 сприятливо впливає на стан волосся. Застосовуючи ціанокобаламін зовнішньо, можна надати гарний блиск і силу волоссю. Для цього радять використовувати аптечний вітамін В12 в ампулах, додаючи його в маски – як натуральні (на основі олій та натуральних продуктів), так і покупні [12-14].

Позитивний ефект вітаміну В12 спостерігається при його застосуванні на шкіру. Вважається, що він допомагає розгладити перші зморшки, надати тонус шкірі, оновити її клітини і захистити від шкідливого впливу зовнішнього середовища. Косметологи радять використовувати аптечний вітамін В12 з ампули, змішуючи його з жирною основою - чи то масло чи вазелін. В цілому, вітамін В12 для шкіри добре поєднується з косметичними маслами та вітаміном А. Проте перед застосуванням будь-якої косметичної речовини варто провести тест на наявність алергії або небажаної реакції шкіри [12,14,15].

1.6. Ціанокобаламін в тваринництві та ветеринарії

Вітамін В12 – єдиний водорозчинний вітамін, який в організмі тварин синтезується мікрофлорою кишечника, звідки надходить в органи, накопичуючись у найбільших кількостях у нирках, печінці, стінці кишечника та селезінці. Синтезом в кишечнику потреба організму в ціанокобаламіні повністю не забезпечує з продуктами тваринного походження [3].

Вітамін В12 не міститься в рослинних кормах, як низка інших вітамінів В-комплексу, а виробляється тільки шляхом зв'язування кобальту дріжджовим або бактеріальним синтезом. У раціон жуйних кобальт надходить переважно з рослинних кормів, куди надходить із ґрунту. Зміст кобальту в ґрунті сильно

коливається не тільки залежно від регіону і типу ґрунту (найбідніші кобальтом регіони з супісками, дерново-підзолистими і болотистими ґрунтами), а й від інших факторів. Наприклад, рослини поглинають кобальт із ґрунтів у меншій кількості у присутності деяких мінералів та їх сполук (марганець, вапно) [16].

Кількість опадів також знижує вміст кобальту в ґрунтах, вимиваючи його в нижчі шари. Тип та стан пасовищ також впливають на вміст кобальту. Злакові витягують із ґрунту кобальту менше, ніж бобові. Однорічні пасовища також бідні на кобальт, на відміну від багаторічних пасовищ [16].

Вітамін В₁₂ відрізняється більш високою активністю, ніж інші вітаміни групи В. Потреби у ньому у жуйних можна компенсувати за рахунок його введення вже на рівні мільйонної частки грама на кілограм. Роль кобаламіну в організмі жуйних дуже велика. Він є незамінним учасником енергетичних обмінів. Виконує каталітичні функції під час синтезу практично всіх незамінних амінокислот [16].

Нестача вітаміну В₁₂ може призвести до серйозних метаболічних порушень, що тягнуть за собою такі захворювання, як молочна лихоманка, кетози та ожиріння печінки. Це пов'язано з тим, що в організмі ВРХ синтезована в рубці пропіонова кислота - основний попередник для утворення глюкози, необхідного джерела молочного цукру та важливого учасника енергетичного обміну в тканинах тварини, що тісно пов'язана з вітаміном В₁₂ [16].

Навіть при підвищеному синтезі пропіонової кислоти мікрофлорою рубця жуйних дефіцит вітаміну В₁₂ погіршує засвоєння пропіонової кислоти організмом тварини, впливає на її акумуляцію в крові, що швидко призводить до енергетичного дефіциту, зниження рівня споживання корму, що у свою чергу призводить до зниження молочної продуктивності жиру в молоці [16].

Збільшення синтезу вітаміну В₁₂ мікрофлорою відбувається при дачі кормів із великим вмістом клітковини. Оптимальний вміст сирої клітковини в сухій речовині раціону не повинен перевищувати 22-25%, причому для

високопродуктивних корів 16-18% від цієї кількості повинна становити клітковина грубих кормів [16].

Збільшення вмісту вітаміну В12 у раціоні жуйних можна досягти декількома способами [16]:

- ін'єкційне введення препаратів ціанокобаламіну (але слід враховувати ймовірність виникнення при цьому ін'єкційного стресу) у дозі 5-10 мкг/кг маси тіла;
- додавання захищених форм вітаміну В12 у премікси чи комбікорми
- вводити в раціон сировину, багату на вітаміни групи В, зокрема В12, висівки, коренеплоди (особливо морква), дріжджі. Особливо це важливо у зимовий період.

Окрім жуйних виділяють й інших сільськогосподарських тварин. У свиней та курей ознаки В12 – недостатності виявляються лише при поїданні рослинних кормів та відсутності можливості поїдати екскременти. У свиней поряд із затримкою росту та погіршенням використання поживних речовин спостерігаються проноси, блювання, підвищена сприйнятливність до захворювань, ураження нирок та параліч задньої частини тулуба. Птахи реагують на нестачу вітаміну В12 підвищеною ембріональною смертністю на останньому тижні інкубації і тим самим зниженням відсотка виведення, погіршенням росту молодняку, запаленням слизової оболонки м'язового шлунка, а при тривалому дефіциті вітаміну – зниженням несучості. У жуйних ознаки недостатності вітаміну В12 з'являються лише за дефіциту кобальту. Поряд із різними порушеннями обміну речовин спостерігаються такі клінічні симптоми, як схуднення, втрати апетиту та підвищення смертності у потомства [17].

В таблиці 1.3 вказано норму вітаміну в комбікормі для різноманітних сільськогосподарських тварин.

Норми кобаламіну, який має міститись в 1 кг готового комбікорму [18]

Тип тварини	Кількість вітаміну, мкг/кг
Курчата	20-40
Курчата (молодняк)	10-20
Кури-несучки	15-25
Бройлери на відкормі	15-25
Індики на відкормі	15-30
Поросята	20-40
Свині на відкормі	10-20
Свиноматки	15-30

Гіповітаміноз В12 відзначають у кішок при захворюваннях підшлункової залози та печінки. Виснаження запасів цього вітаміну при таких патологіях може відбуватися внаслідок хронічної дизрексії або мелабсорбції, які призводять до зниження рівня засвоєння тварин кобаламіну. Дефіцит ціанокобаламіну може мати і вторинний характер у тих випадках, коли в організмі знижений синтез специфічного фактора, що забезпечує абсорбцію кобаламіну в кишечнику. У кішок цей глікопротеїн синтезується лише у підшлунковій залозі, тому всі захворювання цього органу можуть призвести до розвитку дефіциту вітаміну В12. Будь-які порушення кишкової бактеріальної мікрофлори можуть стати причиною зниження абсорбції кобаламіну, оскільки бактерії, що населяють кишечник, здатні утилізувати цей вітамін [19].

Сонливість, слабкість у кінцівках, відсутність апетиту, захворювання шкіри та проблеми з шерстю – це ознаки дефіциту вітаміну В12 для собак. Зазвичай нестача виникає внаслідок незбалансованої дієти або через вроджену неможливість засвоїти речовину з їжі. Дефіцит вітаміну, що зростає, призводить до виникнення і більш серйозних проблем зі здоров'ям. Починають розвиватися хвороби травної системи та знижується вага [20,21].

Приклад препаратів ветеринарного призначення показано на рис.1.3.



Рис.1.3. Приклади препаратів ветеринарного призначення, які містять вітамін В12 [22-24]

РОЗДІЛ 2.

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Синтез вітаміну В12 обмежений кількома бактеріями та археями. Але промислове культивування різних продуцентів кобаламіну все більше набирає обертів і нині використовується для задоволення щорічних потреб у всьому світі. Це пов'язано з тим, що даний процес виступає як альтернативний метод хімічного синтезу, який вимагає принаймні 60 кроків, що є доволі не економічно [1].

Велике промислове виробництво вітаміну В12 відбувається шляхом культивування біологічних агентів, переважно *Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium shermanii* або *Sinorhizobium meliloti*. Серед продуцентів кобаламіну наразі особливо виділяють різні штами *Propionibacterium*. Основна їх перевага полягає в тому, що вони здатні рости та синтезувати метаболіти на субстратах, що містять різні відходи виробництва, що значно підвищує економічну рентабельність біотехнологічних процесів [2,3].

Виробництво вітаміну В12 за допомогою штамів *Propionibacterium* можна розділити на дві фази: на першій фазі бактеріальні клітини слід культивувати в анаеробних умовах протягом перших кількох днів, щоб утворити попередник вітаміну В12, тобто кобінамід (проміжний продукт) в якому відсутня група DMВІ. На другій фазі біосинтез активного кобаламіну завершується аерацією культури протягом кількох наступних днів, коли синтезується потрібний ліганд і кон'югується з раніше створеним кобінамідом.

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</i>		
З	Ли	№ докум.	Підп	Д			
Розроб.		Мороз Я. А.			<i>РОЗДІЛ 2</i>		
Перевір.		Удимович					
Реценз.							
Н.							
Затверд.		Стабніков					
					Літ.	Арк.	Аркушів
						18	87
					<i>Кафедра БТМ</i>		

Також важливо підтримувати нейтральний рН і належну температуру (відповідно: рН 7,0 і температуру 30 °С) виробничого середовища для ефективного виробництва [3].

Стосовно використання різних субстратів, існує чимало інформації яка підтверджує цей факт. Наприклад, у 2020 році штам *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673 культивували на поживному середовищі, основою якого було рідкий кислотно-білковий залишок сої. Протягом 96 годин культивування було отримано 0,21 мг/л вітаміну В12. Це є доволі високий показник, зважаючи на те, що виробниче культивування проводили на відході соєвого продукту [4].

Дуже багато повідомлень про можливість вирощувати різні штами *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* та синтезувати кобаламін на відході виробництва біодизелю – гліцерині. Наприклад, при культивування штаму *P. freudenreichii* sp. *shermanii* 1 на оптимізованому поживному середовищі з чистим гліцерином протягом 168 годин вдалося одержати 2,11 мг/л вітаміну. Споживання гліцерину як субстрату становило більше 90%, що є дуже гарним показником [5,6].

Також, повідомляється про можливість культивування *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* DSM 20270 на рідкому залишку від тофу. Протягом двох днів культивування вдалось досягти кінцевої концентрації в 10 мг/л. Але, слід зауважити про особливість технології, в якій передбачається індукування світлом протягом всього часу культивування [7].

Окремо розглядають й можливі альтернативні штами, які можливо використовувати для промислового виробництва. Наприклад, у 2020 році визначали можливість штаму дріжджів *Yarrowia lipolytica* A-101 утилізувати гліцерин. Максимальна концентрація вітаміну, яку вдалось одержати, становила 62 мкг/л. Порівняно з минулими штамми, це дуже низький показник. Але зважаючи на те, що як основу середовище використовували гліцерин, як метод утилізації, при якому можна одержати ще й корисний продукт доволі не поганий варіант [8].

Отже, проаналізувавши літературу, можна впевнитись у можливості різних штамів *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* до надпродукції нашого цільового продукту. Тому, подальше порівняння будемо вести саме по цим бактеріям.

Порівняльна характеристика представлена в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика різних біологічних агентів для одержання кобаламіну

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г(мл)/л	Режим культивування	Концентрація вітаміну, мг/л	Джерело
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> OLP-5	Глюкоза – 20, Дріжджового екстракту – 10, Триптон – 10, Лактат натрію – 10, KH ₂ PO ₄ – 2, (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 4, FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0,005, 1 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01, MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,003, CaCl ₂ ·6H ₂ O – 0,01, NaCl – 0,01, CoCl ₂ ·6H ₂ O – 0,01, 5,6-Диметилбензімідазол (DMBI) – 0,01	72 год (анаеробно) 60 год (аеробно) pH=7 37° C	16,4	[9]
<i>P. shermanii</i> subsp. <i>shermanii</i> ATCC 13673	Глюкоза – 44, Триптон – 133, KH ₂ PO ₄ – 1, (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 4, FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0,006, CoCl ₂ ·6H ₂ O – 0,04, 5,6-Диметилбензімідазол (DMBI) – 0,07	48 год (анаеробно) pH=7 30° C	1,6	[10]

Закінчення табл.2.2.

<i>P. freudenreichii</i> T82	Фруктоза – 12,5, Сахароза – 12,5, Пептон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, L-цистеїн гідрохлорид - 0.4, K ₂ HPO ₄ – 1,5, KH ₂ PO ₄ – 2,5	60 год (анаеробно) 60 год (аеробно) pH=7 30° C	1,4	[11]
<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> 1	Гліцерин – 35,67 Гідролізат казеїну – 1,69 Пантотенат кальцію – 0,016 NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 0,001 5,6-Диметилбензімідазол (DMBI) – 0,016	168 год (аеробно) pH=7 30° C	3,97	[6]
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> DSM 20270	Рідкий залишок від тофу (замість води) Глюкоза – 10 CoSO ₄ ·7H ₂ O – 0,012 Вітамін B ₂ – 5 мкг/л	72 год (анаеробно) 24 год (аеробно) pH=6,8 30° C	10	[7]

Отже, при порівнянні усіх штамів видно два основних продуцента, які культивують найбільшу кількість вітаміну. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* DSM 20270 штам який росте на відходах виробництва соєвого сиру тофу. Але, як зазначалось вище, в його технології використовується індукування світлом, що ускладнює виробництво у промислових умовах. Окрім цього, неможливо передбачити склад поживних елементів у партії сироватки, що надходить, оскільки кожного разу вона буде різною, а отже й концентрація вітаміну також. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 росте на поживному середовищі визначеного складу і потребує доволі багато компонентів. Але, зважаючи на те, що окрім багатоскладового поживного середовища та зміни умов культивування більше нічого не потрібно, обираємо цей штам, оскільки

концентрація вітаміну є найвищою, а додаткових обробок в процесі культивування не потребується.

2.2. Морфолого-культуральні ознаки

P. shermanii (синонімічна назва *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) – молочні пропіонібактерії. Є нерухливими, не утворюють спор. За формою можуть бути плеоморфними паличками або дрібними коками. За розміщенням можуть зустрічатися поодинці, парами, короткими ланцюжками або згустками. За результатами фарбування по Граму є позитивними. Розміри клітин становлять 1-5 мкм [1-3].

Окремо зазначається вплив різних поживних середовищ на морфологічні особливості продуцента. Наприклад, при порівнянні агаризованих середовищ, де в першому основним компонентом є молоко, а в іншому соя, зазначається, що в молочному середовищі клітини зберігають свою кокоподібну форму, в той час як у середовищі з соєю клітини мають деформований характер (неправильної форми). Окрім цього, відрізняється товщина клітин, на першому середовищі вона є більшою [3,4].

На агарах утворюють колонії жовтого, оранжевого, червоного або коричневого кольору. У рідкому середовищі вони поведуться як важкі волокнисті гранули. Штами можуть рости на PYG середовищі, або ж на агаризованому середовищі для пропіонобактерій. Також є повідомлення про ріст на YEL-агарі [4-7].

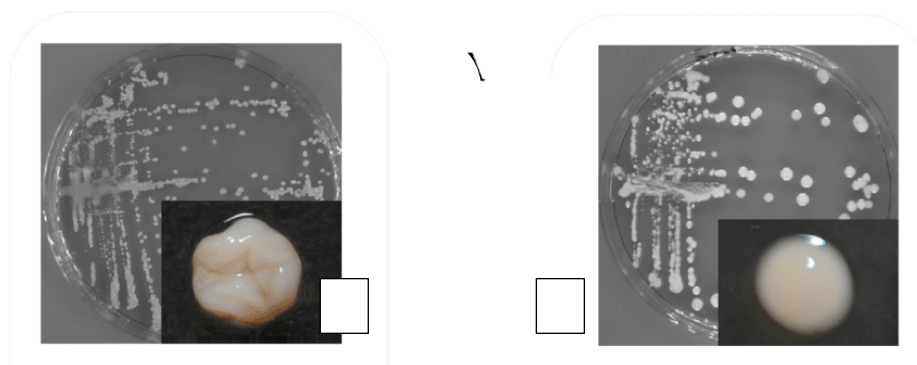


Рис.3.1. Колонії різних штамів *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* на YEL-агарі: А – штам CIRM BIA 228; Б – штам CIRM BIA 456 [7]

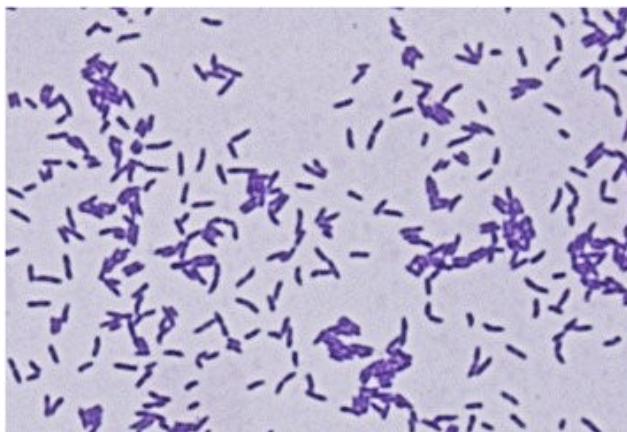


Рис.3.2. Колонії *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, пофарбовані за Грамом (збільшення в 100 разів) [8]

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки

P. shermanii – анаеробна бактерія. За температурним оптимумом – мезофіл. Наявність або відсутність кисню визначає форму бактерій. Оптимальний рН коливається близько 7,0 (діапазон 4,5–8,0), при якому вони характеризуються своєю здатністю виробляти пропіонову кислоту та вітамін В12. Демонструють підвищену швидкість росту навіть у наявності 6,5% NaCl [3].

Незважаючи на те, що бактерії є мезофільними, вони доволі стійкі до значно вищих температур і можуть виживати до 20 с при 70 °С (деякі штами витримують температуру до 76 °С протягом 10 с). Оптимальна температура для їх зростання - 30 °С [3].

Інгібуючий вплив виявляють такі фактори: висока кислотність, занижка/зависока температура, зависока концентрація солі та активність води. Адаптація до одного з вищезгаданих стресорів підвищує їх стійкість до інших параметрів [3].

Крім речовин, необхідних для їх росту (джерело вуглецю та азоту), вони також потребують належного підживлення мікроелементами (залізо, магній, кобальт, марганець, мідь, амінокислоти, вітаміни В7 і В5, L-цистеїну гідрохлорид). Наявність аспарагінової кислоти в навколишньому середовищі сприяє зростанню і підвищує ефективність їх ферментації та вироблення вуглекислого газу [3].

Основними джерелами вуглецю є сахариди (наприклад, глюкоза, лактоза, фруктоза, рибоза і галактоза) і органічні кислоти (молочна кислота). Отримують азот з пептидів, амінокислот, солей амонію та амінів. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* може використовувати кілька джерел вуглецю для отримання пропіонату разом з ацетатом, сукцинатом та діоксидом вуглецю (CO₂). Такими джерелами може бути гліцерин, еритріол, L-арабіноза, адоніт, галактоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-маноза, інозитол, арбутин, ескулін, лактоза, лактат та глюконат. На відміну від інших видів, бактерія здатна відновлювати піруват до пропіонату через цикл транскарбоксилази [3,9].

На твердому середовищі вони ростуть дуже повільно і тільки в строго анаеробних умовах, при температурі 30 °С. Їх зростання триває до 2 тижнів при культивуванні на лактатному середовищі з додаванням глюкози. Через це їх важко ідентифікувати та ізолювати [3].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

P. shermanii має наступний таксономічний статус [6]:

Домен *Bacteria*

Відділ *Actinobacteria*

Клас *Actinobacteria*

Порядок *Propionibacteriales*

Родина *Propionibacteriaceae*

Рід *Propionibacterium*

Вид *Propionibacterium shermanii*

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Вітамін В₁₂ знайшов практичне застосування в фармацевтичній промисловості. Ціанокобаламін необхідний для здоров'я людини. Він впливає на формування клітин крові та правильну роботу нервової системи. Також впливає на стан інших тканин, що швидко оновлюються – імунної системи, шкіри та слизової шлунково-кишкового тракту. Позитивно впливає на обмін речовин, рух ліпідів і вуглеводів в організмі. У дітей сприяє зростанню та покращенню апетиту. Збільшує енергію. Покращує концентрацію, пам'ять та рівновагу [5, 6]. Дефіцит вітаміну В₁₂ може викликати анемію, а також злоякісні та незворотні неврологічні ускладнення [5].

Ін'єкційна форма вітаміну В₁₂ має вирішальне значення для лікування багатьох станів, таких як [5]:

- злоякісна хвороба Аддісона-Бірмера – специфічний тип анемії, що виникає внаслідок нестачі вітаміну В₁₂;
- мегалобластна анемія;
- дефіцит вітаміну В₁₂, що виникає внаслідок дієти без продуктів тваринного походження;
- втрата внутрішнього фактора Касл (глікопротеїну, який виділяється зі слизової оболонки шлунка і забезпечує всмоктування вітаміну В₁₂ в кишечнику), спричинена резекціями шлунка;
- хронічний атрофічний гастрит;
- синдроми мальабсорбції після резекції клубової кишки;
- целіакія викликана непереносимістю глютену;

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.18 КР ПЗ</i>		
З	Ли	№ докум.	Підп	Д			
Розроб.	Мороз Я.А.				Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Удимович					26	87
Реценз.					<i>Кафедра БТМ</i>		
Н.							
Затверд.	Стабніков						

- тропічний литник — захворювання шлунково-кишкового тракту, що призводить до порушення всмоктування поживних речовин;
- хвороба Крона – запальне захворювання шлунково-кишкового тракту;
- синдром сліпої петлі.

Вітамін також використовується в тесті Шиллінга (засіб вивчення засвоєння вітаміну B_{12}). Багаті джерела вітаміну B_{12} зазвичай доступні і споживаються в м'ясі та молочних продуктах. Звичайне харчування в більшості випадків забезпечує повне покриття потреби у вітаміні B_{12} , а організм людини при нормальному функціонуванні має великий запас [5].

У поєднанні з фолієвою кислотою (B_9) вітамін B_{12} може виявитися найефективнішим засобом для відновлення життєвих сил. Вітамін B_{12} краще діє в організмі в комплексі з іншими вітамінами, наприклад А, Е і С. Але, в той же час даний вітамін може посилити алергічну реакцію на вітамін B_1 . Не рекомендується одночасна ін'єкція вітаміну B_1 , B_3 , B_6 та B_{12} , а також з пеніциліном, стрептоміцином [6].

Шкідливість вітаміну B_{12} для організму не виявлено, крім випадків передозування, що супроводжуються алергічними реакціями. Також необхідно враховувати індивідуальну реакцію на вітамін [6].

Через свої властивості дана речовина може використовуватись у **косметології**. Вважається, що вітамін B_{12} сприятливо впливає на стан волосся. Застосовуючи ціанокобаламін зовнішньо, можна надати гарний блиск і силу волоссю. Для цього радять використовувати аптечний вітамін B_{12} в ампулах, додаючи його в маски – як натуральні (на основі олій та натуральних продуктів), так і покупні [13-15].

Позитивний ефект вітаміну B_{12} спостерігається при його застосуванні на шкіру. Вважається, що він допомагає розгладити перші зморшки, надати тонус шкірі, оновити її клітини і захистити від шкідливого впливу зовнішнього середовища. Косметологи радять використовувати аптечний вітамін B_{12} з ампули, змішуючи його з жирною основою - чи то масло чи вазелін. В цілому, вітамін B_{12} для шкіри добре поєднується з косметичними маслами та вітаміном

А. Проте перед застосуванням будь-якої косметичної речовини варто провести тест на наявність алергії або небажаної реакції шкіри [13, 15, 16].

Вітамін В₁₂ – єдиний водорозчинний вітамін, який в організмі тварин синтезується мікрофлорою кишечника, звідки надходить в органи, накопичуючись у найбільших кількостях у нирках, печінці, стінці кишечника та селезінці. Синтезований у кишечнику вітамін не задовольняє повністю потребу організму в ціанокобаламіні тому його використовують в тваринництві та ветеринарії для запобігання формуванню дефіциту та його лікуванню [3].

Вітамін В₁₂ не міститься в рослинних кормах, як низка інших вітамінів В-комплексу, а виробляється тільки шляхом зв'язування кобальту дріжджовим або бактеріальним синтезом. У раціон жуйних кобальт надходить переважно з рослинних кормів, куди надходить із ґрунту. Вміст кобальту в ґрунті сильно коливається не тільки залежно від регіону і типу ґрунту (найбідніші кобальтом регіони з супісками, дерново-підзолистими і болотистими ґрунтами), а й від інших факторів. Наприклад, рослини поглинають кобальт із ґрунтів у меншій кількості у присутності деяких мінералів та їх сполук (марганець, вапно) [17].

Кількість опадів також знижує вміст кобальту в ґрунтах, вимиваючи його в нижчі шари. Тип та стан пасовищ також впливають на вміст кобальту. Злакові витягують із ґрунту кобальту менше, ніж бобові. Однорічні пасовища також бідні на кобальт, на відміну від багаторічних пасовищ [17].

Вітамін В₁₂ відрізняється більш високою активністю, ніж інші вітаміни групи В. Потреби у ньому у жуйних можна компенсувати за рахунок його введення вже на рівні мільйонної частки грама на кілограм. Роль кобаламіну в організмі жуйних дуже велика. Він є незамінним учасником енергетичних обмінів. Виконує каталітичні функції під час синтезу практично всіх незамінних амінокислот [17].

Нестача вітаміну В₁₂ в організмі тварини може призвести до серйозних метаболічних порушень, що тягнуть за собою такі захворювання, як молочна лихоманка, кетози та ожиріння печінки. Це пов'язано з тим, що в організмі ВРХ синтезована в рубці пропіонова кислота - основний попередник для утворення

глюкози, необхідного джерела молочного цукру та важливого учасника енергетичного обміну в тканинах тварини, що тісно пов'язана з вітаміном В₁₂ [17].

Збільшення вмісту вітаміну В₁₂ у раціоні жуйних можна досягти декількома способами [17]:

- ін'єкційне введення препаратів ціанокобаламіну (але слід враховувати ймовірність виникнення при цьому ін'єкційного стресу) у дозі 5-10 мкг/кг маси тіла;
- додавання захищених форм вітаміну В₁₂ у премікси чи комбікорми
- вводити в раціон сировину, багату на вітаміни групи В, зокрема В₁₂, висівки, коренеплоди (особливо морква), дріжджі. Особливо це важливо у зимовий період.

Окрім жуйних виділяють й інших сільськогосподарських тварин. При дефіциті вітаміну у свиней поряд із затримкою росту та погіршенням використання поживних речовин спостерігаються проноси, блювання, підвищена сприйнятливість до захворювань, ураження нирок та параліч задньої частини тулуба. Птахи реагують на нестачу вітаміну В₁₂ підвищеною ембріональною смертністю на останньому тижні інкубації і тим самим зниженням відсотка виведення, погіршенням росту молодняку, запаленням слизової оболонки м'язового шлунка, а при тривалому дефіциті вітаміну – зниженням несучості. У жуйних ознаки недостатності вітаміну В₁₂ з'являються лише за дефіциту кобальту. Поряд із різними порушеннями обміну речовин спостерігаються такі клінічні симптоми, як схуднення, втрати апетиту та підвищення смертності у потомства [18].

Розглянувши сфери застосування В₁₂, а саме застосування в фармацевтичній, косметичній та сільськогосподарській промисловостях, найбільш перспективною на сьогодні сферою є фармацевтична.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

В фармацевтичному секторі вітамін В₁₂ в основному використовується для лікування захворювань спричинених нестачею даної сполуки в організмі, а саме дефіциту В₁₂ та анемії (В₁₂-дефіцитної). На дані захворювання в основному впливає раціон харчування або вік. Розглядаючи статті можна дійти висновку що з збільшенням віку (на дефіцит вітаміну В₁₂ в основному страждають люди похилого віку) потреба організму в даній речовині збільшується а надходження вітаміну в організм зменшується, враховуючи що запасу даної речовини в організмі людини при припиненні його вживання вистачає на декілька років, то люди не завжди одразу можуть помітити проблему, в наслідок чого її виявлення відбувається в критичній формі.

Так на сьогодні не має точного значення кількості людей які страждають на дане захворювання, і значення коливається в діапазоні від 23 до 60 % [25], тому для зменшення ризиків та зручності розрахунків прийmemo значення, яке становить 25 % людей віком від 65 років. Згідно даних Державної служби статистики України кількість громадян віком від 65 років і старше на 2021 рік становило 7 211,2 тис. осіб [26]. Врахуємо прийнятий раніше відсоток захворювання для визначення кількості осіб, які страждають на дефіцит В₁₂:

$$7\,211\,200 \times 25\% = 1\,802\,800 \text{ осіб}$$

Як зазначалось раніше переважно виявлення даного захворювання відбувається в критичній формі, що в свою чергу передбачає введення 1 мг вітаміну кожен день впродовж 2 тижнів, для досягнення ремісії, та подальше введення 1-2 мг вітаміну від 1 разу на тиждень до 1 разу на місяць, для підтримання стабільного стану [27]. Враховуючи що тривалість лікування ціанокобаламіном та проведення повторних курсів залежать від перебігу захворювання та ефективності лікування, прийmemo що середня доза введення буде становити $(1 + 2) / 2 = 1,5$ мг вітаміну, а термін буде складати 11 місяців по 2 рази в місяць. Отже за рік одна людина прийматиме:

$$(2 \text{ тижні} \times 7 \text{ днів} \times 1 \text{ мг}) + (11 \text{ місяців} \times 2 \text{ рази} \times 1,5 \text{ мг}) = 47 \text{ мг.}$$

Теоретично визначена кількість людей які страждають на дефіцит вітаміну за рік використає наступну кількість вітаміну:

$$1\ 802\ 800 \text{ осіб} \times 47 \text{ мг} = 84\ 731\ 600 \text{ мг}$$

Враховуючи що для розрахунку потреби було обрано дефіцит В₁₂, можна до даної потреби додати В₁₂-дефіцитну анемію. Даний тип анемії спричинений порушенням синтезу ДНК в еритрокаріоцитах внаслідок дефіциту вітаміну В₁₂. Дане захворювання неможливо вилікувати повністю тому курс лікування проводиться протягом усього життя (в/м ін'єкції 2 рази на місяць). Точних статистичних даних кількості захворювань на дану хворобу немає, але є дані які демонструють що розповсюдженість даного захворювання серед населення в цілому становить 0,1% [28].

Згідно даних Інституту демографії та соціальних досліджень, станом на 1 січня 2023 року чисельність населення України становила від 28 млн до 34 млн, для подальших розрахунків приймемо найменший показник (28 млн) [29]. Отже, теоретична кількість людей які страждають на В₁₂-дефіцитну анемію становить:

$$28\ 000\ 000 \times 0,1 \% = 28\ 000 \text{ осіб.}$$

Курс лікування даної хвороби розподіляється на два етапи, перший це доведення до стадії ремісії та другий підтримання стабільного стану впродовж життя [27]. При виявленні хвороби необхідно пройти курс лікування який становить 4-6 тижнів для доведення стану ремісії, а в подальшому для підтримання стабільного стану необхідно вводити вітамін 2 рази на місяць.

Так як даних для точного розрахунку недостатньо приймемо, що 1 раз буде погіршення, або виявлення захворювання та подальше лікування, тобто необхідно буде пройти курс лікування 4-6 тижнів та в подальшому впродовж року кожен місяць по 2 рази.

$$(4+6) / 2 = 5 \text{ тижнів в середньому}$$

Під час даного курсу необхідно вводити препарат через день, тоді кількість введень препарату буде становити:

$$(5 \text{ тижнів} \times 7 \text{ днів}) / 2 = 35 \text{ днів} / 2 = 17,5, \text{ приймемо } 18 \text{ разів}$$

Для подальших розрахунків приймемо, що даний курс лікування зайняв півтора місяця, тоді для подальшого лікування в рік слід використовувати препарат ще:

$$12 - 1,5 = 10,5 \text{ місяців}$$

Як зазначалось для підтримання стабільного стану необхідно в місяць приймати препарат 2 рази, тоді кількість застосувань буде становити:

$$10,5 \times 2 = 21 \text{ раз}$$

Отже, сумарно за рік одна людина теоретично буде застосовувати препарат $21 + 18 = 39$ разів, для зручності подальших розрахунків приймемо що даний показник становить 40.

Норма вітаміну за один раз складає 100-200 мкг приймемо найбільший показник, тоді за одне введення препарату використовується 200 мкг ціанокобаламіну. Тоді за рік 1 людина використає

$$40 \text{ разів} \times 0,2 \text{ мг} = 8 \text{ мг ціанокобаламіну}$$

Розрахувавши потребу в вітаміні для однієї людини розрахуємо для теоретично визначеної кількості пацієнтів:

$$28\,000 \times 8 \text{ мг} = 224\,000 \text{ мг}$$

Визначивши потребу для лікування дефіциту B_{12} та B_{12} -дефіцитної анемії, сумарна потреба для лікування даних захворювань в рік буде становити:

$$84\,731\,600 \text{ мг} + 224\,000 \text{ мг} = 84\,955\,600 \text{ мг}, \text{ приймемо } 84\,956 \text{ г.}$$

Також необхідно врахувати конкуренцію на ринку, тому для подальших розрахунків приймемо, що теоретично можлива потреба яку можна задовольнити буде становити 1 % від загальної розрахованої потреби. Отже, теоретична річна потреба, яку можливо задовольнити становить:

$$84\,956 \text{ г} \times 1 \% = 849,56 \text{ приймемо } 850 \text{ г}$$

Визначивши річну потребу в вітаміні B_{12} , розрахуємо необхідну кількість культуральної рідини, при виробничому синтезі вітаміну за допомогою *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5, який синтезує за 132 год 16,4 мг/л вітаміну.

$$850 \text{ г} / 16,4 \text{ г/м}^3 = 51,8 \text{ м}^3, \text{ приймемо } 52 \text{ м}^3$$

Враховуючи втрати при виділенні цільового продукту, необхідна кількість культуральної рідини буде становити:

$$52 \text{ м}^3 / (1 - 0,3) = 74,3 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Визначивши приблизну річну потребу культуральної рідини, необхідно провести розрахунок кількості необхідної культуральної рідини за добу, прийнявши що кількість трудоднів становить 200 днів:

$$V_d = \frac{C}{T_{рд}} = \frac{74,3 \text{ м}^3}{200} = 0,372 \text{ м}^3/\text{добу}$$

За цикл кількість продукту ($V_{пц}$) буде становити:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,2 * 0,372 * 140}{24} = 2,6 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який складається з часу виробничого біосинтезу (132 год) та часу підготовки ферментера перед синтезом (8 год). K_1 це коефіцієнт запасу, який передбачає можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,2$.

2,6 м³ культуральної рідини ($V_{пц}$) можна отримати при вирощуванні продуцента в ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_r = 2,6 / 0,6 = 4,33 \text{ м}^3$$

Найближчий стандартний за об'ємом ферментер $V_r = 5 \text{ м}^3$.

Необхідно провести уточнення коефіцієнта заповнення:

$$K_{зап} = \frac{V_{пц}}{V_r} = \frac{2\ 600}{5\ 000} = 0,52,$$

дане значення задовольняє наші потреби, тому залишаємо його незмінним.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримуємо $V_{пц} = 2,6 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Під час отримання культуральної рідини необхідно передбачити втрати КР в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), які становлять 10%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1-E_{\text{ф}}} = \frac{2,6}{1-0,1} = 2,9 \text{ м}^3$$

Робочий об'єм ферментера складається з суми об'єму поживного середовища (ПС) $V_{\text{пс1}}$ та об'єму посівного матеріалу (ПМ) $V_{\text{пм1}}$.

Посівний матеріал готується в посівному апараті (ПА) та його об'єм дорівнює 10 % від об'єму поживного середовища який подається до ферментера:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 2,9 / (1 + 0,1) = 2,64 \text{ м}^3$$

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 2,9 - 2,64 = 0,26 \text{ м}^3$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для посівного апарату

Посівний матеріал готується у посівному апараті з робочим об'ємом $V_{\text{роб2}}$

$$V_{\text{роб2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{пм}}) = 260 / (1 - 0,1) = 289 \text{ л}$$

де $E_{\text{пм}} = 0,1$ – втрати культуральної рідини при вирощуванні посівного матеріалу в посівному апараті за рахунок краплевиносу частини культуральної рідини під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{\text{пс2}}$ та кількість посівного матеріалу який становить 10% від об'єму поживного середовища $V_{\text{пс2}}$

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб2}} / (1 + X_{\text{пм2}}) = 289 / (1 + 0,1) = 262,7 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 289 - 262,7 = 26,3 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму посівного апарату $V_{\text{па1}}$ використовуємо $V_{\text{роб2}}$ та $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{па1}} = V_{\text{роб2}} / K_{\text{зап}} = 289 / 0,6 = 481 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{\text{па}} = 500 \text{ л}$.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап } 2} = V_{\text{роб}2} / V_{\text{па}} = 289 / 500 = 0,58, \text{ що допустимо.}$$

Розрахунок ПС та ПМ для інокуляторів

Посівний матеріал для посівного апарата 500 л готується в інокуляторі з роб.об'ємом $V_{\text{роб}3}$

$$V_{\text{роб}3} = V_{\text{пм}3} / (1 - E_{\text{пм}3}) = 26,3 / (1 - 0,05) = 27,68 \text{ л,}$$

де $E_{\text{пм}3} = 0,05$ – це втрати КР при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі за рахунок краплевиносу частини КР під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу $V_{\text{пс}4}$ потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}3}$ та кількість посівного матеріалу, яка дорівнює 10% від об'єму поживного середовища $V_{\text{пс}3}$

$$V_{\text{пс}3} = V_{\text{роб}3} / (1 + X_{\text{пм}3}) = 27,68 / (1 + 0,1) = 25,16 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм}3} = V_{\text{роб}3} - V_{\text{пс}3} = 27,68 - 25,16 = 2,52 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму інокулятора $V_{\text{ін}1}$ використовуємо $V_{\text{роб}4}$ та $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{ін}1} = V_{\text{роб}3} / K_{\text{зап}} = 27,68 / 0,6 = 46,13 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 можна отримати при культивуванні в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін}1} = 50$ л.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап } 1} = V_{\text{роб}3} / V_{\text{ін}} = 27,62 / 50 = 0,55, \text{ що допустимо.}$$

Посівний матеріал для інокулятора об'ємом 50 л готується в інокуляторі з роб.об'ємом $V_{\text{роб}4}$

$$V_{\text{роб}4} = V_{\text{пм}3} / (1 - E_{\text{пм}3}) = 2,52 / (1 - 0,05) = 2,65 \text{ л,}$$

де $E_{\text{пм}3} = 0,05$ – це втрати КР при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі за рахунок краплевиносу частини КР під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу $V_{\text{пс}4}$ потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}3}$ та кількість посівного матеріалу, яка дорівнює 10% від об'єму поживного середовища $V_{\text{пс}3}$

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб4}} / (1 + X_{\text{пм4}}) = 2,65 / (1 + 0,1) = 2,41 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 2,65 - 2,41 = 0,24 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму інокулятора $V_{\text{ін1}}$ використовуємо $V_{\text{роб4}}$ та $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{ін2}} = V_{\text{роб4}} / K_{\text{зап}} = 2,65 / 0,6 = 4,4 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 можна отримати при культивуванні в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін1}} = 5 \text{ л}$.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап4}} = V_{\text{роб4}} / V_{\text{ін}} = 2,65 / 5 = 0,53, \text{ що допустимо.}$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для качалочних колб

Кількість посівного матеріалу, що готується в колбах на качалці $V_{\text{пм4}} = 0,24 \text{ л}$. Втратами при культивуванні в колбах нехтуємо, оскільки вони малі.

$$V_{\text{роб5}} = V_{\text{пм4}} = 0,24 \text{ л}$$

Для одержання посівного матеріала потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{\text{пс4}}$ та кількість посівного матеріалу, що дорівнює 10% від об'єму поживного середовища $V_{\text{пс5}}$

$$V_{\text{пс5}} = V_{\text{роб5}} / (1 + X_{\text{пм5}}) = 0,24 / (1 + 0,1) = 0,22 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм5}} = V_{\text{роб5}} - V_{\text{пс5}} = 0,24 - 0,22 = 0,02 \text{ л}$$

Для культивування використовуємо колби об'ємом $V_{\text{кол}} = 0,75 \text{ л}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зап}} = 0,2$

Кількість колб

$$N_{\text{к}} = V_{\text{роб5}} / V_{\text{кол}} \times K_{\text{зап}} = 0,24 / 0,75 \cdot 0,2 = 1,6 \text{ колби, отже, 2 колби}$$

Підсумовуючи можна зазначити, що процес одержання посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 для синтезу вітаміну B_{12} у ферментері об'ємом 5 м^3 і з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи.

**Об'єми апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та
виробничого біосинтезу**

№ ста дії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{г}, л$	Коефіцієнт заповнення , $K_{зап}$, частка	Робочий об'єм ферментер а, $V_{роб}, л$	Об'єм поживног о середовищ а, $V_{пм}, л$	Об'єм посівног о матеріал у, $V_{пм}, л$
1	0,750 × 2 колби	0,2	0,24	0,22	0,02
2	5	0,53	2,65	2,41	0,24
3	50	0,55	27,68	25,16	2,52
4	500	0,58	289	262,7	26,3
5	5 000	0,58	2 900	2 640	260

РОЗДІЛ 4

БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агенту

Ростовим субстратом для біосинтезу вітаміну В12 за допомогою *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* OLP-5 є глюкоза.

Так як у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [30] відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у штаму *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* OLP-5, тому для побудови шляху метаболізму глюкози обираємо серед наявних штамів один з яких *P. freudenreichii subsp. shermanii* CIRM-BIA1.

У бактерій *P. shermanii* функціонує шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса наводимо схему перетворення глюкози (рис 1).

Глюкоза за участю фосфат глюкокінази (КФ.2.7.1.63) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за дії глюкозофосфатізомерази (КФ.5.3.1.9) перетворюється на фруктозу-6-фосфат. Фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11) активує перетворення фруктозо-6-фосфат у фруктозу-1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на фруктозу-1,6-фосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією триозотіофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід-3-фосфат, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12) він перетворюється на гліцерат-1,3-фосфат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткіназа(КФ.2.7.2.3) переходить у гліцерат-3-фосфат.

Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат 3-фосфат індукує його перетворення на гліцерат 2-фосфат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат 2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват.

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</i>			
З	Ли	№ докум.	Підп	Д				
Розроб.	Яцюк Л.М.					Лит.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Удимович						38	89
Реценз.					<i>РОЗДІЛ 4</i>			
Н.								
Затверд.	Стабніков							
					<i>Кафедра БТМ</i>			40

Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

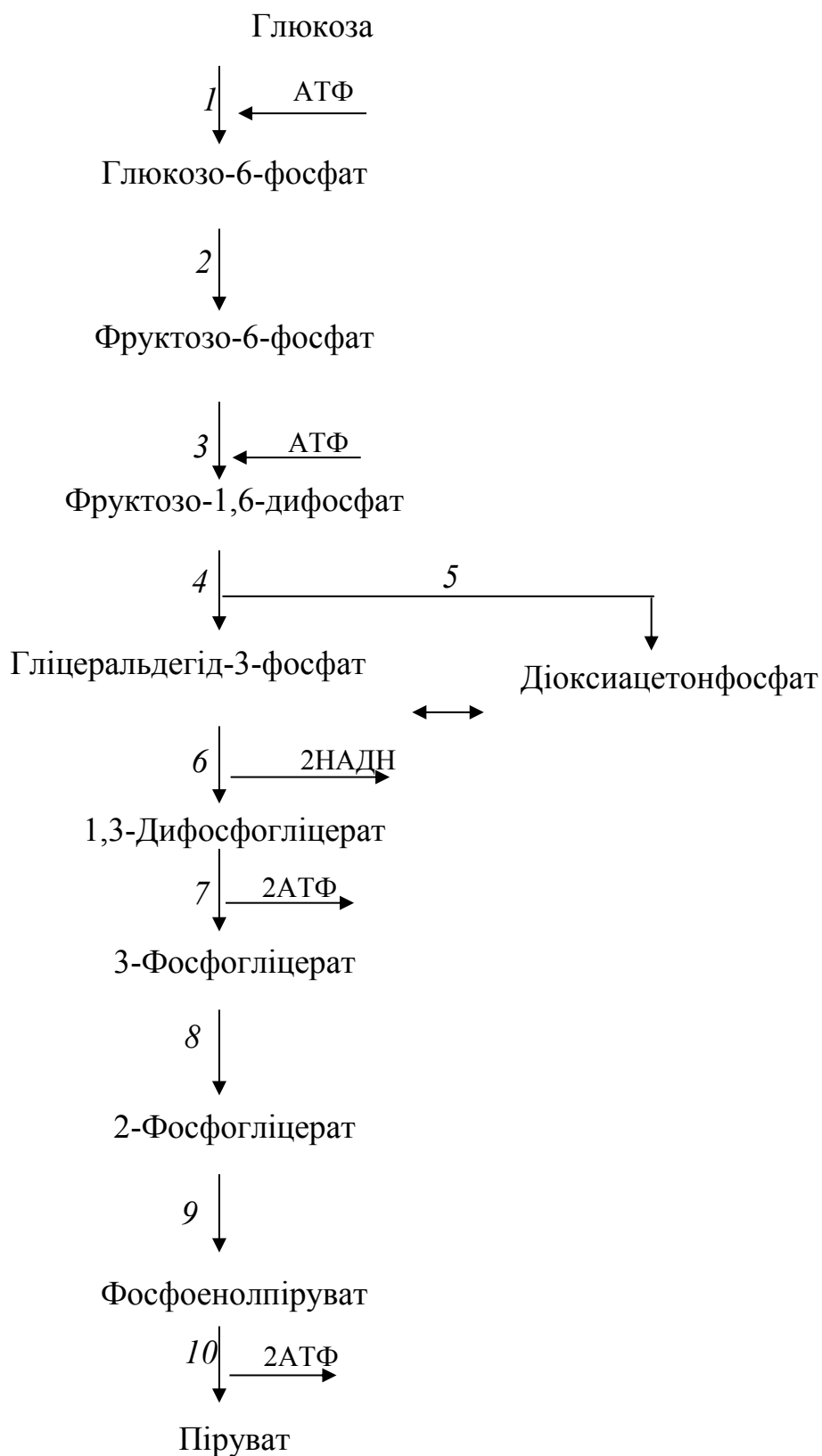


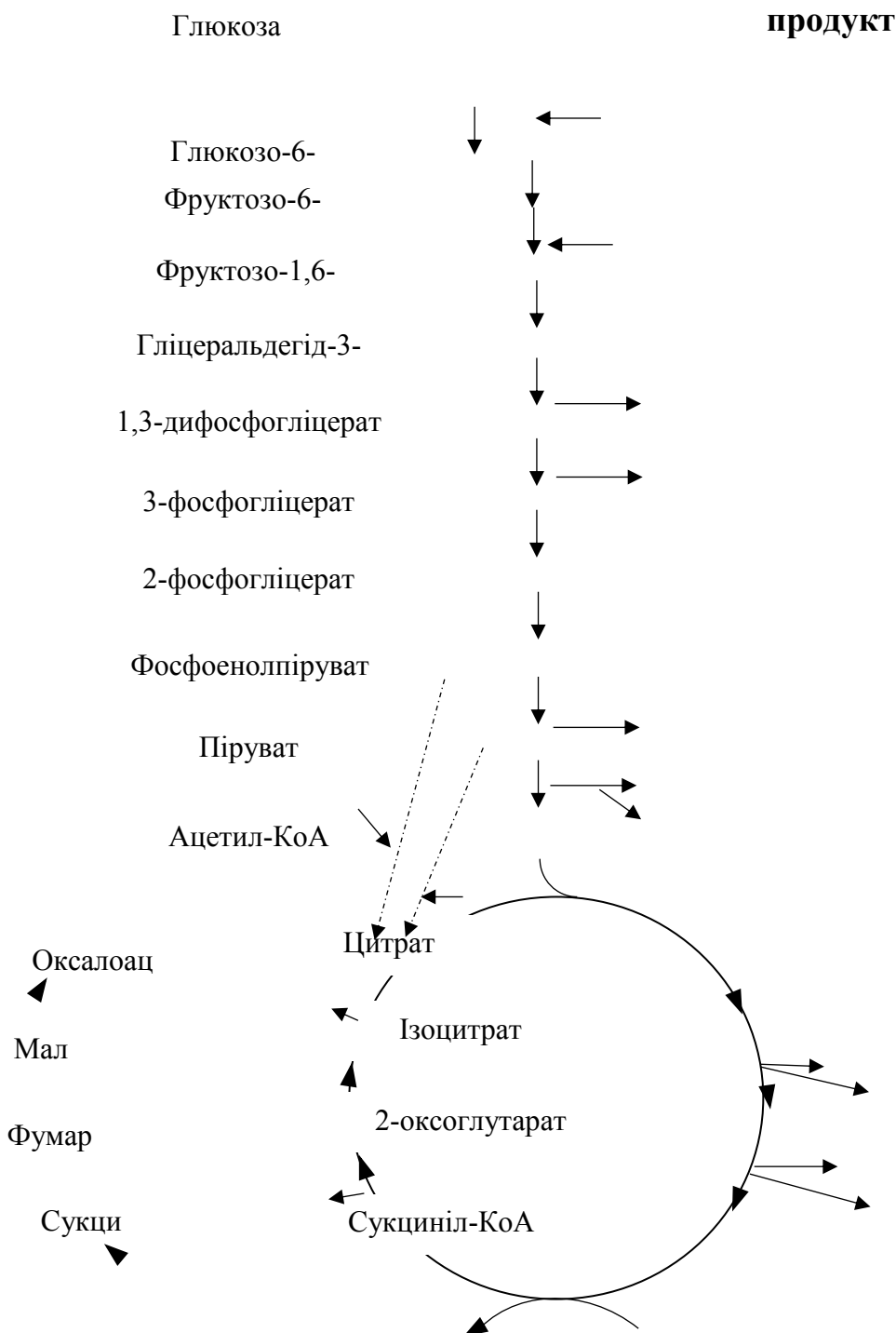
Рис.1.

freudenreichii subsp. *shermanii* CIRM-BIA1.

Катаболізм глюкози в *P.*

Ферменти: 1 – фосфат глюкокіназа (КФ.2.7.1.63); 2 – глюкозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13); 5 – триозотіофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 6 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа(КФ.2.7.2.3); 8 – гліцератфосфомутаза та фосфогліцератфосфомутаза (КФ.5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 10– піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт



РОЗДІЛ 5.

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Вибір умов і способу культивування

У попередньому розділі встановлено, що біосинтез ціанкобаламіну проходить за температури 37° С, а оптимальне значення рН становить 7. У зв'язку з цим, виникає можливість забруднення середовища культивування сторонньою мікрофлорою, що представлена мезофілами та нейтрофілами. Для усунення ризику контамінації слід передбачити умови асептики в ході проведення культивування штаму *Propionibacterium freudenreichii* subsps. *shermanii* OLP-5 – такий підхід не можна реалізувати при проведенні твердофазного способу вирощування продуцента вітаміну В₁₂, тому обираємо глибинний спосіб вирощування.

Разом з тим, технологія отримання вітаміну В₁₂ культивуванням *P. freudenreichii* subsps. *shermanii* OLP-5 передбачає культивування продуцента анаеробно протягом 72 годин, після чого штам OLP-5 вирощують в аеробних умовах протягом ще 60 годин. Тому забезпечують підготовку повітря для здійснення другого етапу біосинтезу ціанкобаламіну.

Слід відмітити, що асептичні умови забезпечуються шляхом стерилізації технологічного обладнання, комунікацій, повітря для аерації, титрувального агенту (лугу) та поживного середовища для культивування продуцента ціанкобаламіну. Запобігання забруднення сторонньою мікрофлорою проводять шляхом створення тиску подачею стерильного аераційного повітря.

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</i>			
З	Ли	№ докум.	Підп	Д	<i>РОЗДІЛ 5</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.	Мороз Я. А.							
Перевір.	Удимович						40	87
Реценз.						43		
Н.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Затверд.	Стабніков							

Безперервний спосіб культивування має свої переваги, однак культивування вітаміну В₁₂ проводять у періодичному режимі, адже даний вітамін синтезується у стаціонарній фазі росту продуцента. Також при періодичному культивуванні субстрат споживається максимально повно, що є економічно вигідним для даної технології.

Необхідним є підтримка рН середовища протягом усього процесу вирощування *P. freudenreichii* subsps. *shermanii* OLP-5 (кожні 7 годин) розчином луку, тому слід передбачити підготовку та стерилізацію відповідного титруючого агента (луку) для забезпечення рН на належному рівні. Для підкислення рН необхідно передбачити підготовку відповідного розчину кислоти.

Таким чином, процес одержання ціанкобаламіну *P. freudenreichii* subsps. *shermanii* OLP-5 має проходити глибинним періодичним способом із забезпеченням умов асептики за підтримки анаеробних (протягом перших 72 год) та аеробних (протягом останніх 60 год) умов під час біосинтезу даного вітаміну.

5.1.2. Вибір типу ферментера. Умови культивування та особливості продуцента ціанкобаламіну напряду впливають на вибір устаткування та обладнання для проведення технологічного процесу. Тому оскільки було встановлено оптимальний спосіб культивування та особливості штаму *P. freudenreichii* subsps. *shermanii* OLP-5, слід вибрати відповідний ферментер із всім необхідним оснащенням.

При вирощуванні інокуляту та для проведення останніх 60-ти годин виробничого біосинтезу вітаміну В₁₂ необхідним є забезпечення аерації. Тому ферментер має бути обладнаний барботером для подачі повітря та індикатором контролю розчиненого кисню в середовищі.

Оскільки кисень повинен розчинятись у середовищі, для інтенсифікації цього процесу ферментер має містити мішалку, яка б

працювала у відповідному режимі (200 об/хв). Для цього підходить турбінна промислова мішалка (МТЗ) (МТО). Її діаметр становить 400-500 мм, частота обертів до 400 об/хв, а потужність приводу складає 11-15 кВт [31].

Для контролювання рівня рН середовища з метою підтримки його в оптимальних межах (нейтральне значення) ферментер варто обладнати індикатором (датчиком) рН. У свою чергу, забезпечення температури вирощування 37 °С здійснюється внаслідок встановлення датчику температури та оснащення ферментеру сорочкою, у яку буде подаватись відповідний теплоносій.

Вищезазначеним параметрам відповідає промисловий ферментер компанії «Агромаш» з нержавіючої сталі з геометричним об'ємом 5000 л. Внутрішній шар ємності виконано із сталі AISI 316L, сорочка із сталі AISI 304, облицювання зі сталі AISI 430, термоізоляція виконана мінеральною ватою. Кришка та дно торосферичні з внутрішнім діаметром 1500 мм. Кришка приварна. Тиск у ферментері трохи більше 3 атм. Ферментер оснащено сорочкою, барботером з фільтром повітря, в кришці є патрубки для подачі титрувальних агентів та інших компонентів, а також необхідні датчики. В наявності промисловий контролер для роботи в автоматичному режимі із сенсорною панеллю [32].

Отже, для виробничого біосинтезу ціанкобаламіну за вирощування штаму *P. freudenreichii* subsps. *shermanii* OLP-5 вибираємо промисловий ферментер компанії «Агромаш» з нержавіючої сталі з геометричним об'ємом 5000 л (5 м³).

5.1.3. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря та азоту

Propionibacterium freudenreichii subsp. *shermanii* OLP-5 є факультативний анаероб, тобто він росте як за аеробних умов так і за анаеробних умов культивування, різниця даних умов впливає тільки на синтез кінцевого продукту, так за аеробних умов дана культура

представляє краще накопичення біомаси, а за анаеробних умов відбувається надсинтез ціанокобаламіну. В роботі [17] було проведено досліджено комбінування аеробного та анаеробного синтезу вітаміну, та було встановлено що найкращим варіантом є комбінування спочатку анаеробного синтезу і подальший перехід з часом на аеробний синтез. Отже для технологічного процесу отримання ціанокобаламіну використовуючи *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 необхідно забезпечити підготовку, як аераційного повітря (на стадії отримання посівного матеріалу в посівних апаратах та виробничий синтез), так і азоту який буде використовуватися для створення анаеробних умов культивування (на стадію виробничого синтезу).

Щоб отримати готове стерильне повітря необхідно провести наступні стадії:

- забір атмосферного повітря (відбувається за допомогою вертикальної труби з повітрозабірником у найвищій точці Н - 18 м);
- очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) (на тканинних фільтрах грубого очищення);
- стиснення повітря в компресорах (в результаті повітря нагрівається до температури 250 °С);
- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси» (для конденсації вологи);
- видалення конденсованої вологи у ресивері (зменшує пульсаційні рухи повітря, які негативно впливають на подальшу роботу фільтрів очищення повітря);
- стабілізація тиску та підігрівання до 30 °С;
- очищення в головному фільтрі, встановленому на вході до ферментаційного відділення (ступінь очищення $E=95\%$);
- очищення в індивідуальних фільтрах встановлених на ферментерах ($E=99,995\%$).

На стадіях підготовки азоту буде відбуватись подача азоту з балону на очищувач балонних газів та подальше проходження через індивідуальний фільтр для досягнення ступеню очищення 99,995%.

5.1.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробничий процес синтезу V_{12} культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5, відбувається впродовж 200 днів та відбувається в ферментері об'ємом 5 м^3 , з попереднім приготування посівного матеріалу в посівному апараті 500 л та інокуляторах 50 л та 5 л. Виробничий процес відбувається в наступних приміщеннях: цех виробничого синтезу V_{12} , цех отримання посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5, приміщення для вирощування культури в качалочних колбах та мікробіологічної лабораторії.

Схематичне зображення плану приміщення для виробничого процесу отримання V_{12} культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 наведено на рис.2.1. План враховує діаметри обладнання та відстань між апаратами (не менше 1 м) і від стін (1...1,5 м).

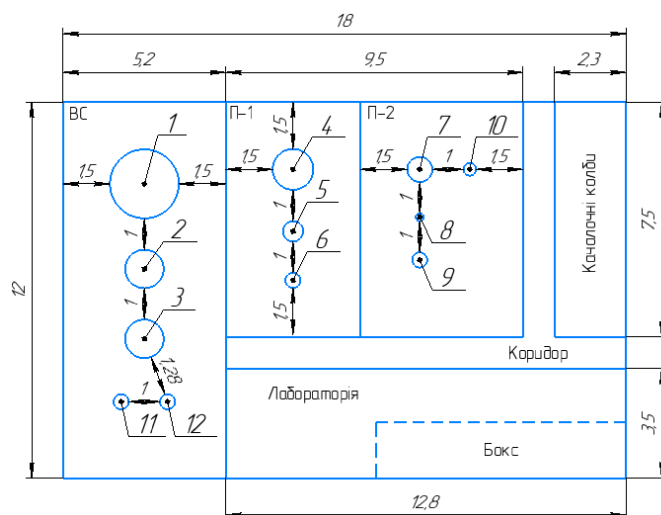


Рис. 2.1. Ескіз планування виробничих приміщень для виробництва V_{12} культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5

ВС – цех виробничого синтезу В₁₂, П-1 та П-2 – цех отримання посівного матеріалу *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5.

Габаритні розміри обладнання зображеного на рис.2.1 наведено в табл.5.1.

Таблиця 5.1

Габаритні розміри основного обладнання для отримання вітаміну В₁₂ культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5

Поз.	Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
1	Ферментер	5 000	2,2	5,7
2	Реактор-змішувач для приготування композиції 1	400	1,23	1,64
3	Реактор-змішувач для приготування композиції 2	400	1,23	1,64
4	Посівний апарат	500	1,3	2,5
5	Реактор-змішувач для приготування композиції 1	40	0,65	0,53
6	Реактор-змішувач для приготування композиції 2	10	0,48	0,37
7	Інокулятор-1	50	0,8	2,6
8	Реактор-змішувач для приготування композиції 1	5	0,25	0,3
9	Реактор-змішувач для приготування композиції 2	10	0,48	0,37
10	Інокулятор-2	5	0,4	0,5
11	Реактор-змішувач для приготування титрувальних агентів	10	0,48	0,37
12	Реактор-змішувач для приготування титрувальних агентів	10	0,48	0,37
	Всього	6 440 л		

Згідно даних наведених в табл.5.1, об'єм всього обладнання необхідного для синтезу В₁₂ культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 становить 6,44 м³. Окрім об'єму обладнання необхідно розрахувати площу на якій дане обладнання знаходиться (висота стін цеху виробничого синтезу вітаміну становить 12 м, а інших приміщень 6 м). Площа підлоги цеху виробничого синтезу вітаміну В₁₂ становить 12 м × 5,2 м = 62,4 м², а площа стін становить (12 м × 6 + 5,2 м × 12) × 2 = 268,8 м². Площа підлоги цехів отримання посівного матеріалу становить 9,5 × 7,5 = 71,25 м², а площа стін (9,5 × 3 + 7,5 × 3) × 2 = 102 м². Мікробіологічна лабораторія 12,8 × 3,5 = 44,8 м², а стін – (12,8 × 3 + 3,5 × 3) × 2 = 97,8 м². Площа підлоги приміщення з качалками дорівнює 2,3 × 7,5 = 17,25 м², а стін – (2,3 × 3 + 7,5 × 3) × 2 = 58,8 м², узагальнені дані площ виробничих приміщень наведено в табл.5.2

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу	62,4	268,8	331,2
Цех отримання посівного матеріалу	71,25	102	173,25
Мікробіологічна лабораторія	44,8	97,8	142,6
Приміщення з качалками	17,25	58,8	76,05
Загальна площа	195,7	527,4	

Кількість виробничих циклів отримання культуральної рідини для отримання вітаміну В₁₂ становить 29, так як миття виробничого обладнання відбувається перед кожним циклом та після останнього виробничого циклу, загальна кількість миття обладнання становить 30 разів. Для забезпечення чистоти приміщень, підлогу миють щодня, а саме 200 разів (кількість трудоднів становить 200). Окрім щоденного миття

підлоги в виробничих приміщеннях раз на місяць проводять генеральне прибирання, тобто 7 разів.

Загальна площа яку необхідно обробити за всі виробничі цикли наведено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва B₁₂ культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5

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	6,44	30	193,2
Підлога	195,7	200	39 140
Стіни, двері вікна	527,4	7	3 691,8

Загальне порівняння дезінфекційних засобів наведено в табл.2.4. Для порівняння мийних та дезінфікуючих засобів було обрано засоби які знаходяться в Державному реєстрі дезінфекційних засобів за 2021 рік [33].

Дезінфекційний засіб "ДЕЗолайт" з мийними властивостями, є універсальним засобом який підходить як для миття та дезінфекції обладнання та поверхонь. Основними діючими речовинами є дидецилдиметиламоній хлорид у межах 7,0 – 8,0 %, алкілдиметилбензиламоній хлорид у межах 6,0 – 7,0 %. Концентрація робочого розчину – 0,5 %, під час протирання норма витрат готового розчину становить 100 мл на 1 м² [34].

DESOVER SA4 - засіб мийний лужний пінний із дезінфікуючим ефектом на основі активного хлору, високопінний лужний засіб для дезінфекції та відбілювання приміщень. Діюча речовина: гіпохлорит натрію - 7%, робоча концентрація – 2% [35].

Миття обладнання буде відбуватись каустичною содою та універсальним засобом «ДЕЗОлайт», зміна засобу буде відбуватись кожні 2 місяці.

Для дезінфекції приміщень будемо використовувати два засоби, для зменшення ймовірності утворення резистентних штамів, а сам: «Вернедор» та «Ексан Про Дез».

Таблиця 5.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів під час виробництва вітаміну B₁₂ культивуванням *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єм 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
Каустична сода (NaOH) [36]	Обладнання	1 %	193,2	38 640	57	0,6	23 184
«ДЕЗОлайт» (ЧАС) [34]	Обладнання	0,5 %	193,2	38 640	370	1,8 5	71 484
«DESOVER SA4» (гіпохлорит натрію) [35]	Обладнання	2 %	193,2	38 640	101,4	2,0 28	78 361
«Фамідез Форте» (формальде	Стіни, підло	1 %	42 83 1,8	4 283, 18	419	4,1 9	17 94 7

гід, глютардіаль дегід) [37]	га, вікна , двері						
«Вернедор» (перекис водню, ЧАС) [38]	Стін и, підло га, вікна , двері	0,1 %	42 83 1,8	4 283, 18	473	0,4 73	2 026
«Ексан Про Дез» (ПАР, етанол, ялицева олія) [39]	Стін и, підло га, вікна , двері	1,5 %	42 83 1,8	4 283, 18	93,5	1,4 03	6 010

Примітка: ПАР – поверхнево-активні речовини, ЧАС - четвертинні амонійні сполуки.

5.1.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Штам *P. freudenreichii* subsps. *shermanii* OLP-5 культивують у середовищі, що має наступні компоненти, г/л:

Глюкоза – 20,

Дріжджовий екстракт – 10,

Триптон – 10,

NaC₃H₅O₃ – 10,

KH₂PO₄ – 2,

(NH₄)₂ HPO₄ – 4,

FeSO₄□₇H₂O - 0,005,

MgSO₄□₇H₂O – 0,01,

MnSO₄□H₂O – 0,003,

CaCl₂□₆H₂O – 0,01,

NaCl – 0,01,

CoCl₂□₆H₂O – 0,01,

5,6-Диметилбензімідазол (DMBI) – 0,01.

Виробниче культивування продуцента ціанкобаламіну реалізують у ферментері об'ємом 5 м³, коефіцієнт заповнення становить 0,6. Підготовку інокуляту здійснюють у чотири етапи (в колбах на качалці, інокуляторах 5, 50 та 500 л).

Поживне середовище для отримання інокуляту в колбах на качалках стерилізують у колбах в автоклаві через невеликі об'єми середовища (0,3 л). Композиції середовища для одержання посівного матеріалу в інокуляторах стерилізують безпосередньо в апаратах при доведенні рН до значень 4,0-4,5. Тому слід забезпечити підготовку 6%-го розчину соляної кислоти, а також 6%-го розчину натрій гідроксиду для подальшого доведення рН до значення 7, яке є оптимальним для культивування штаму OLP-5.

Таким чином, на наступному етапі слід визначитись зі способом приготування композицій вищевказаного поживного середовища та обладнанням, яке знадобиться в реалізації цих процесів. Вирахуємо відповідні кількості складових поживного середовища для кожного етапу культивування вітаміну В₁₂ (див. табл. 3.2).

Так, на основі таблиці 3.2 можна узагальнити, що титрувальні агенти для контролю рН в апаратах готують у реакторах по 10 л кожен, з яких кислоту та луг (що піддається стерилізації) подають у ферментери у відповідності зі значеннями рН середовища.

Глюкозу та дріжджовий екстракт готують та стерилізують (разом, зважаючи на однаковий режим стерилізації) у відповідних колбах для вирощування інокуляту в колбах на качалці та інокуляторі 5 л, а для вирощування посівного матеріалу в інокуляторах 50 і 500 л та для виробничого біосинтезу ціанкобаламіну використовують відповідні реактори. Аналогічно було розраховано і для композиції, що містить триптон, цей компонент готується та стерилізується окремо з огляду на відмінний від інших речовин режим стерилізації (див. табл. 3.2).

При вирощуванні інокуляту в колбах на качалках такі компоненти середовища як $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ та 5,6-Диметилбензімідазол (DMBI) треба готувати у вигляді запасного розчину, зважаючи на їх малі кількості. При вирощуванні культури в апаратах дані компоненти можна вводити напряму та стерилізувати разом з іншими солями, так як їх кількість буде достатньою для зважування на вагах з точністю до 0,01 г.

Розділ 6.

**СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ
ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ**

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою, яка забезпечує вилучення забруднюючих частинок
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр сітчастий, фільтроматеріал – гофровані ткани сітки з високолегованих сталей, корпус – із високолегованої сталі. Продуктивність – 1100 м ³ /год, стартовий опір – 50 Па. Розміри: 495*247*48 (мм). Клас очищення: G2/G3 (E = 90 %) [40]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий Tidy 25. Максимальний тиск – 7 бар, потужність – 18,5 кВт, продуктивність 3300 л/хв [41]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Кожухотрубний теплообмінник ОРЕКС-3-СТ з нержавіючої сталі. Робочий тиск – від 6 до 40 бар, діапазон робочих температур – від -60 до 400 ° С [42]
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер з нержавіючої сталі об'ємом 500 л (постачається разом з компресором) [43]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Паровий калорифер з нержавіючої сталі, виконаний на замовлення компанією ОПЕКС (Україна), продуктивність за повітрям – 400 л/хв [44]

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</i>			
3	<i>Ли</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підп</i>	<i>Дат</i>	<i>РОЗДІЛ 6</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Мороз Я.А.</i>						52	87
<i>Перевір.</i>	<i>Удимович</i>							5.
<i>Реценз.</i>								
<i>Н.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		

<i>Продовження табл. 2.1</i>			
Ф-7	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр кишенькового типу, фільтроматеріал – поліестер і мікрОВОлокно, корпус – із оцинкованої або нержавіючої сталі. Продуктивність – 800 м ³ /год, стартовий опір – 55 Па. Розміри: 287*287*600 (мм). Клас очищення: G4/F9 (E = 92 %) [45]
Р-8 Р-9 Р-13 Р-19	Реактор-змішувач	4	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Діаметр – 0,25 м, висота – 0,5 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв; потужність двигуна – 0,75 кВт [46]
Р-10 Р-11	Реактор-змішувач	2	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Діаметр – 0,152 м, висота – 0,310 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв [47]
Д-12 Д-14 Д-16 Д-18 Д-23 Д-26 Д-30 Д-34 Д-38 Д-41	Об'ємно-ваговий дозатор	10	Лічильник-дозатор для води продуктивністю від 10 до 400 л/хв. Робоча напруга – 6-30 В, номінальний струм – 6 А, максимальна потужність – 180 Вт [47].
Р-15 Р-17	Реактор-змішувач	2	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 40 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Діаметр – 0,4 м, висота – 0,75 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв; потужність двигуна – 0,75 кВт [48]
ІФ-20 ІФ-24 ІФ-27 ІФ-43	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр НЕРА, фільтроматеріал – міроскловолокно, корпус – із пластику, алюмінію, оцинкованої або нержавіючої сталі. Продуктивність – 1000 м ³ /год, стартовий опір – 250 Па, кінцевий опір – 650 Па. Розміри: 610*610*78 (мм). Клас очищення: E10-12/H13/H14/U15-17 (E = 99,995 %) [49]

<i>Закінчення табл. 2.1</i>			
Ін-21	Інокулятор	1	Пілотний ферментер з нержавіючої сталі геометричним об'ємом 5 л, виконаний на замовлення компанією Solaris Biotech. Оснащений сорочкою, барботером і мішалкою, ротаметром, датчиками рН, температури, рівня [50]
Н-22	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос низького тиску РТL05. Тиск на виході – до 4 бар, частота обертання – 20 об/хв, продуктивність – 5 л/год [51]
ПА-25	Посівний апарат	1	Пілотний ферментер з нержавіючої сталі геометричним об'ємом 50 л, виконаний на замовлення компанією Solaris Biotech. Оснащений сорочкою, барботером і мішалкою, ротаметром, датчиками рН, температури, рівня [50]
ПА-28	Посівний апарат	1	Пілотний ферментер з нержавіючої сталі геометричним об'ємом 0,5 м ³ , виконаний на замовлення компанією Solaris Biotech. Оснащений сорочкою, барботером і мішалкою, ротаметром, датчиками рН, температури, рівня [50]
ДЗ-29 ДЗ-33 ДЗ-37	Об'ємно-ваговий дозатор	3	Дозатор сипучих матеріалів ДВ-06 з об'ємом бункера 0,6 м ³ . Межі дозування – від 200 г до 50 кг. Розміри: 870*870*2100 мм. Дискретність – 0,005 г, гарантована точність зважування – 1 кг [52]
Р-31 Р-35 Р-39	Реактор-змішувач	3	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 400 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Діаметр – 0,8 м, висота – 2,55 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв; потужність двигуна – 2,2 кВт [46]
Н-32 Н-36 Н-40	Перистальтичний насос	3	Перистальтичний насос низького тиску РТL17. Тиск на виході – до 4 бар, частота обертання – 80 об/хв, продуктивність – 518 л/год [51]
Б-42	Балон для зберігання азоту	1	Балон з азотом
Фр-44	Ферментер	1	Пілотний ферментер з нержавіючої сталі геометричним об'ємом 5 м ³ , виконаний на замовлення компанією Solaris Biotech. Оснащений сорочкою, барботером і мішалкою, ротаметром, датчиками рН, температури, рівня [50]

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологічна схема отримання ціанокобаламіну за допомогою культури *Propionibacterium freudenreichii* subsps. *shermanii* OLP-5 передбачає використання допоміжних робіт (підготовка аераційного повітря, підготовка азоту, приготування та стерилізація титрувальних агентів для регуляції рівня рН поживного середовища та приготування і стерилізація поживного середовища) та самого технологічного процесу (отримання посівного матеріалу та виробничий біосинтез). В графічній частині проекту наведено технологічну та апаратурну схему отримання ціанокобаламіну.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 18 м використовуючи вертикальну трубу з повітрязабірником (ПЗ-1).

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря подають на фільтр грубого очищення (Ф-2), для видалення крупних частинок бруду та пилу (розмір часток до 1 мкм). Ступінь очищення – 90 %.

ДР 1.3. Подача повітря на компресор

Повітря після грубого очищення подається в компресор (К-3), де відбувається стиснення повітря до тиску 0,4 МПа та збільшення температури повітря до 250 °С.

					НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ		
З	Ли	№ докум.	Підп	Д	РОЗДІЛ 7		
Розроб.	Мороз Я. А.						
Перевір.	Удимович						
Реценз.							
Н.							
Затверд.	Стабніков				Літ.	Арк.	Аркушів
						56	87
					58		
					Кафедра БТМ		

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення вологи

На виході з компресора вміст вологи у повітрі збільшується, тому для видалення вологи повітря охолоджують до 18 °С у теплообміннику (Т-4). Далі повітря направляють до ресивера (Рс-5), для видалення зайвої вологи до вмісту $W=60\%$.

ДР 1.5. Підігрів повітря

Після видалення зайвої вологи повітря нагрівають у теплообміннику-нагрівачі (Т-6) до температури 30 °С, для уникнення можливості утворення конденсату на головному та індивідуальному фільтрі, $W=50\%$.

ДР 1.6. Тонке очищення повітря

Повітря, отримане після нагрівання, подають на головний фільтр очищення (Ф-7), ступінь очищення становить $E=95\%$.

ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах

Перед подачею повітря в посівні апарати та виробничий ферментер його пропускають через індивідуальні фільтри (ІФ-20, ІФ-24, ІФ-27, ІФ-43) для досягнення ступеня очищення $E=99,995\%$.

ДР 2. Підготовка азоту для виробничого біосинтезу

ДР 2.1. Подача азоту

Азот з балону (Б-42), в якому відбувається його зберігання, направляють до очищувача балонних газів, де відбувається очищення інертного газу до рівня не менше ніж 95%.

ДР 2.2. Очищення азоту в індивідуальному фільтрі

Після проходження очищувача балонних газів, азот подається в індивідуальний фільтр (ІФ-43), через який він надходить у виробничий ферментер (ТП 6.1).

ДР 3. Приготування титрувальних агентів для регулювання рівня рН поживного середовища

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

Для підкислення поживного середовища на виробничий біосинтез необхідно приготувати 6,66 л 6 % хлоридної кислоти, для цього реактор-змішувач об'ємом 10 л (Р-8) заповнюють 5,55 л питної води та при постійному перемішуванні вносять 1,11 л 36%-ї хлоридної кислоти, яка попередньо відміряна мірним циліндром.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація розчину 6-% їдкого натрію для підлуження поживного середовища

Для підлуження поживного середовища на виробничий біосинтез необхідно приготувати 6,66 л розчину 6%-го натрію гідроксиду. На технічних вагах формують наважку кристалічного їдкого натру, масою 400 г. Отриману наважку поміщають в реактор-змішувач об'ємом 10 л (Р-9) та вносять 6,06 л води питної, перемішують, після повного розчинення колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав де проводять стерилізацію впродовж 40 хв, при 131 °С (0,15 МПа).

ДР 4. Приготування і стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Для отримання посівного матеріалу необхідно приготувати 300 мл поживного середовища. В табл. 7.1 наведено вміст компонентів для приготування даного об'єму поживного середовища.

Таблиця 7.1

Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 300 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	10	3	1	150

Вода		150 (мл)		
Триптон	10	3	2	50
Вода		50 (мл)		
NaC ₃ H ₅ O ₃	10	3	3	50
MnSO ₄	0,02	0,006		
Вода		50 (мл)		
K ₂ HPO ₄	0,2	0,06	4	50
Вода		50 (мл)		
Всього:				300 мл

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції 1

За допомогою технічних ваг формують наважку дріжджового екстракту масою 3 г. Отриману наважку переносять в колбу об'ємом 0,5 л, додають 150 мл відміряної за допомогою мірного циліндра води питної та перемішують до повного розчинення компоненту, після розчинення колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав, де впродовж 30 хв відбувається стерилізація при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції 2

За допомогою технічних ваг формують наважку триптону масою 3 г. Отриману наважку переносять в колбу об'ємом 0,1 л, додають 50 мл відміряної за допомогою мірного циліндра води питної та перемішують до повного розчинення, після розчинення колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав, де впродовж 30 хв відбувається стерилізація при тиску 0,1 МПа (121 °С).

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції 3

За допомогою технічних ваг формують наважки лактату натрію масою 3 г та сульфату мангану – 0,006 г. Отримані наважки переносять в колбу об'ємом 0,1 л, додають 50 мл відміряної за допомогою мірного циліндра води питної та перемішують до повного розчинення, після розчинення колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав, де впродовж 40 хв відбувається стерилізація при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.1.4. Приготування і стерилізація композиції 4

За допомогою технічних ваг формують наважку гідрогенортофосфату калію масою 0,06 г. Отриману наважку переносять в колбу об'ємом 0,1 л, додають 50 мл відміряної за допомогою мірного циліндра води питної та перемішують до повного розчинення, після розчинення колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав, де впродовж 40 хв відбувається стерилізація при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 5 л

Для отримання посівного матеріалу необхідно приготувати 3 л поживного середовища. В табл. 7.2 наведено вміст компонентів для приготування даного об'єму поживного середовища.

Таблиця 7.2

Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 5 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	10	30	1	1,5
Вода		150 (мл)		
Триптон	10	30	2	0,5
Вода		50 (мл)		
NaC ₃ H ₅ O ₃	10	30	3	0,5
MnSO ₄	0,02	0,06		
Вода		50 (мл)		
K ₂ HPO ₄	0,2	0,6	4	0,5
Вода		50 (мл)		
Всього:				3 л

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції 1

За допомогою технічних ваг формують наважку дріжджового екстракту масою 30 г. Отриману наважку переносять в колбу об'ємом 5 л, додають 1,5 л відміряної за допомогою мірного циліндра води питної та перемішують до повного розчинення компоненту, після розчинення колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав, де впродовж 30 хв відбувається стерилізація при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції 2

За допомогою технічних ваг формують наважку триптону масою 30 г. Отриману наважку переносять в колбу об'ємом 1 л, додають 0,5 л відміряної за допомогою мірного циліндра води питної та перемішують до повного розчинення, після розчинення колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав, де впродовж 30 хв відбувається стерилізація при тиску 0,1 МПа (121 °С).

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції 3

За допомогою технічних ваг формують наважки лактату натрію масою 30 г та сульфату мангану – 0,06 г. Отримані наважки переносять в колбу об'ємом 1 л, додають 0,5 л відміряної за допомогою мірного циліндра води питної та перемішують до повного розчинення, після розчинення колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в автоклав, де впродовж 40 хв відбувається стерилізація при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.2.4. Приготування і стерилізація композиції 4

За допомогою технічних ваг формують наважку гідрогенортофосфату калію масою 0,6 г. Отриману наважку переносять в колбу об'ємом 1 л, додають 0,5 л відміряної за допомогою мірного циліндра води питної та перемішують до повного розчинення, після розчинення колбу закривають ватно-марлевым корком та поміщають в

автоклав, де впродовж 40 хв відбувається стерилізація при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 50 л

Для отримання посівного матеріалу на даній стадії необхідно приготувати 30 л поживного середовища. Через стерилізацію гострою парою потрібно врахувати конденсат який становить 10 %, тому початковий об'єм води, необхідний на приготування поживного середовища, буде становити 27,3 л. В табл. 7.3 наведено вміст компонентів для приготування даного об'єму поживного середовища.

Таблиця 7.3

Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 50 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 30 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	10	300	1	3,5
Вода		3,5 (л)		
Конденсат		0,35 (л)		0,35
Триптон	10	300	2	3,5
Вода		3,5 (л)		
Конденсат		0,35 (л)		0,35
NaC ₃ H ₅ O ₃	10	300	3	20,3
MnSO ₄	0,02	0,6		
K ₂ HPO ₄	0,2	6		
Вода		20,3 (л)		
Конденсат		2 (л)		2
Всього:				30 л

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції 1

За допомогою технічних ваг формують наважку дріжджового екстракту масою 300 г. Отриману наважку переносять в реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-10), додають 3,5 л води питної. В сорочку реактора подають

глуху пару нагріваючи розчин до температури 40 °С та вмикають перемішуючий пристрій (75 об/хв). Після повного розчинення в цьому ж реакторі проводять стерилізацію гострою парою впродовж 30 хв при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції 2

За допомогою технічних ваг формують наважку триптону масою 300 г. Отриману наважку переносять в реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-11), додають 3,5 л води питної. В сорочку реактора подають глуху пару нагріваючи розчин до температури 40 °С та вмикають перемішуючий пристрій (75 об/хв). Після повного розчинення в цьому ж реакторі проводять стерилізацію гострою парою впродовж 30 хв при тиску 0,1 МПа (121 °С).

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції 3

За допомогою технічних ваг формують наважки лактату натрію масою 300 г, сульфату мангану – 0,6 г та гідрогенортофосфату калію – 6 г. Отримані наважки переносять в реактор-змішувач об'ємом 10 л (Р-13), та за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-12) додають 7,3 л води питної та перемішують (75 об/хв) до повного розчинення, після розчинення солей вміст реактора подають в посівний апарат за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-23) додають 13 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій (75 об/хв) та вносять розчин 6% хлоридної кислоти (від ДР 2.1), для досягнення рівня рН 4,0. Після перемішування проводять стерилізацію гострою парою впродовж 40 хв при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 500 л

Для отримання посівного матеріалу на даній стадії необхідно приготувати 300 л поживного середовища. Через стерилізацію гострою парою потрібно врахувати конденсат який становить 10 %, тому початковий об'єм води, необхідний на приготування поживного

середовища, буде становити 273 л. В табл. 7.4 наведено вміст компонентів для приготування даного об'єму поживного середовища.

Таблиця 7.4

Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 500 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 300 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	10	3000	1	30
Вода		30 (л)		
Конденсат		3 (л)		
Триптон	10	3000	2	30
Вода		30 (л)		
Конденсат		3 (л)		
NaC ₃ H ₅ O ₃	10	3000	3	213
MnSO ₄	0,02	6		
K ₂ HPO ₄	0,2	60		
Вода		213 (л)		
Конденсат		21 (л)		
Всього:				30 л

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції 1

За допомогою технічних ваг формують наважку дріжджового екстракту масою 3 кг. Отриману наважку переносять в реактор-змішувач об'ємом 40 л (Р-15), за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-14) додають 30 л води питної. В сорочку реактора подають глуху пару нагріваючи розчин до температури 40 °С та вмикають перемішувач (75 об/хв). Після повного розчинення в цьому ж реакторі проводять стерилізацію гострою парою впродовж 30 хв при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції 2

За допомогою технічних ваг формують наважку триптону масою 3 кг. Отриману наважку переносять в реактор-змішувач об'ємом 40 л (Р-17),

за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-16) додають 30 л води питної. В сорочку реактора подають глуху пару нагріваючи розчин до температури 40 °С та вмикають перемішуючий пристрій (75 об/хв). Після повного розчинення в цьому ж реакторі проводять стерилізацію гострою парою впродовж 30 хв при тиску 0,1 МПа (121 °С).

ДР 4.4.3. Приготування і стерилізація композиції 3

За допомогою технічних ваг формують наважки лактату натрію масою 3 кг, сульфату мангану – 6 г та гідрогенортофосфату калію – 60 г. Отримані наважки переносять в реактор-змішувач об'ємом 10 л (Р-19), та за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-18) додають 8 л води питної та перемішують (75 об/хв) до повного розчинення, після розчинення солей вміст реактора подають в посівний апарат за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-26) додають 205 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій (75 об/хв) та вносять розчин 6% хлоридної кислоти (від ДР 2.1), для досягнення рівня рН 4,0. Після перемішування проводять стерилізацію гострою парою впродовж 40 хв при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу ціанокобаламіну в ферментері місткістю 5 м³

Для біосинтезу ціанокобаламіну в ферментері місткістю 5 м³ (Фр-44) необхідно приготувати 3 м³ поживного середовища. Через стерилізацію гострою парою потрібно врахувати конденсат, який становить 10 %, тому початковий об'єм води, необхідний на приготування поживного середовища, буде становити 455,5 л. В табл. 7.5 наведено вміст компонентів для приготування даного об'єму поживного середовища.

**Склад композицій при стерилізації компонентів для біосинтезу
ціанокобаламіну в ферментері місткістю 5 м³**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3 м ³ середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	60 000	1	300
Дріжджовий екстракт	10	30 000		
Вода		300 (л)		
Конденсат		30 (л)		30
Триптон	10	30 000	2	300
Вода		300 (л)		
Конденсат		30 (л)		30
NaC ₃ H ₅ O ₃	10	30 000	3	2 127
K ₂ HPO ₄	2	6 000		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	12 000		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005	15		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	30		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,003	9		
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,01	30		
NaCl	0,01	30		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,01	30		
5,6-Диметилбензімідазол	0,01	30		
Вода		2127 (л)		
Конденсат		213 (л)		
Всього:				

ДР 4.5.1. Приготування і стерилізація композиції 1

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-29) в реактор-змішувач об'ємом 400 л (Р-31) вносять 60 кг глюкози та 30 кг дріжджового екстракту та за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-30) додають 300 л води питної. В сорочку реактора подають глуху пару нагріваючи розчин до температури 40 °С та вмикають перемішувач (75 об/хв). Після

повного розчинення компонентів в цьому ж реакторі проводять стерилізацію гострою парою впродовж 30 хв при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4.5.2. Приготування і стерилізація композиції 2

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-33) в реактор-змішувач об'ємом 400 л (Р-35) вносять 30 кг триптонну та за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-34) додають 300 л води питної. В сорочку реактора подають глуху пару нагріваючи розчин до температури 40 °С та вмикають перемішуючий пристрій (75 об/хв). Після повного розчинення в цьому ж реакторі проводять стерилізацію гострою парою впродовж 30 хв при тиску 0,1 МПа (121 °С).

ДР 4.5.3. Приготування і стерилізація композиції 3

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-37) в реактор-змішувач об'ємом 400 л (Р-39) вносять 30 кг лактату натрію, 6 кг гідрогенортофосфату калію та 12 кг гідрофосфату амонію, а також за допомогою технічних ваг формують наважки сульфату заліза масою 15 г, сульфату магнію – 30 г, сульфату мангану – 9 г, хлориду кальцію – 30 г, хлориду натрію – 30 г, хлориду кобальту – 30 г та 5,6-диметилбензімідазолу – 30 г. які поміщають в реактор (Р-30), за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-38) додають 227 л води питної та одночасно вмикають перемішуючий пристрій (75 об/хв) і подають в сорочку реактора глуху пару для досягнення температури 40 °С.

Розчинивши компоненти отриманий розчин подають в ферментер і через об'ємно-ваговий дозатор (Д-41) додають 1,9 м³ води питної та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (*від ДР 2.1*), для отримання рівня рН 4,0. Врегулювавши рівень рН в ферментері проводять стерилізацію гострою парою впродовж 40 хв при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Зберігання колекційної культури *Propionibacterium freudenreichii* subsps. *shermanii* OLP-5 відбувається на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) при 5°C. Кожні 4 місяці проводять пересіви, всі роботи з культурою проводять в строго асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

В асептичних умовах за допомогою бактеріологічної петлі колекційну культуру розсівають методом виснажувального штриха на чашки Петрі з агаризованим середовищем (МПА) для отримання ізольованих колоній. Чашки ставлять у термостат, інкубують упродовж 72 год при 37 °C.

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу на агаризованих поживних середовищах

В асептичних умовах ізольовані колонії, отримані на попередній стадії (від ТП 5.2), пересівають бактеріологічною петлею у пробірки з агаризованим середовищем МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Інкубування здійснюється в термостаті при 37 °C впродовж 72 год.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

В колбу з стерильною композицією 1 в асептичних умовах вносять 50 мл стерильної композиції 2, 50 мл стерильної композиції 3 та 50 мл стерильної композиції 4, перемішують та розливають по 150 мл в дві стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

В пробірку з робочою культурою *P. freudenreichii* subsps. *shermanii* OLP-5 в асептичних умовах вносять 5 мл фізіологічного розчину для суспендування клітин. За допомогою піпетки відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з поживним середовищем. Для засіву

однієї колби використовують суспензію клітин, одержану з однієї пробірки.

Вирощування культури відбувається в колбах на качалці (200 об/хв) при 37 °С упродовж 72 год. Після завершення процесу культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ($X=9$ г/л). В асептичних умовах посівний матеріал з 2 колб переливають в стерильну засівну колбу об'ємом 0,5 л.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 5 л

В інокулятор об'ємом 5 л (Ін-21) вносять стерильну композицію 1 об'ємом 1,5 л, стерильну композицію 2 об'ємом 0,5 л, стерильну композицію 3 об'ємом 0,5 л та стерильну композицію 4 об'ємом 0,5 л. Об'єднавши композиції, через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 5.4).

Вирощування посівного матеріалу здійснюють при температурі 37 °С впродовж 72 год з витратою аераційного повітря 1 л/(л·хв) та частоті обертання мішалки 200 об/хв. Кожні 8 год, а також після завершення процесу культивування, відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ($X=9$ г/л).

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 50 л

В посівний апарат об'ємом 50 л (ПА-25) з простерилізованою композицією 3, самоплином подають стерильну композицію 1 (від ДР 4.3.1), стерильну композицію 2 (від ДР 4.3.2) та розчин 6% гідроксиду натрію для врегулювання рівня рН до 7,0. Об'єднавши композиції, за допомогою перистальтичного насоса (Н-22) в посівний апарат подають посівний матеріал (від ТП 5.5).

Вирощування посівного матеріалу здійснюють при температурі 37 °С впродовж 72 год з витратою аераційного повітря 1 л/(л·хв) та частоті

обертання мішалки 200 об/хв. Кожні 8 год, а також після завершення процесу культивування, відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ($X=9$ г/л).

ТП 5.7. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 0,5 м³

У посівний апарат об'ємом 0,5 м³ (ПА-28) з стерильною композицією 3 самоплином подають стерильну композицію 1 (від ДР 4.4.1) та стерильну композицію 2 (від ДР 4.4.2), додають 6%-ий розчин натрію гідроксиду (від ДР 2.2), для врегулювання рівня рН до 7,0. Після об'єднання композицій через трубу перетискування в посівний апарат подають посівний матеріал (від ТП 5.6).

Вирощування посівного матеріалу здійснюють при температурі 37 °С впродовж 72 год з витратою повітря 1 л/(л·хв) та при частоті обертання мішалки 200 об/хв. Кожні 8 год, а також після завершення процесу культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ($X=9$ г/л).

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез в ферментері місткістю 5 м³

У виробничий ферментер об'ємом 5 м³ (Фр-44) з стерильною композицією 3 за допомогою перистальтичних насосів (Н-32, Н-36) вносять стерильну композицію 1 та стерильну композицію 2, додають 6%-ий розчин натрію гідроксиду (від ДР 2.2), для врегулювання рівня рН до 7,0. Об'єднавши композиції та врегулювавши рівень рН починають виробничий синтез ціанокобаламіну. Вирощування культури відбувається до досягнення концентрації біомаси та концентрації ціанокобаламіну 18 г/л і 16,4 мг/л, відповідно, при температурі 37 °С впродовж 132 год, при постійному перемішуванні 200 об/хв та при безкисневих умовах, при подачі азоту впродовж 72 год від початку виробництва та при постійній

аерації протягом останніх 60 год культивування з витратою аераційного повітря 1 л/(л·хв).

Під час культивування кожні 12 год, а також після закінчення процесу культивування, відбирають проби культуральної рідини для визначення концентрації джерел вуглецю та азоту, біомаси, ціанокобаламін та для здійснення мікробіологічного контролю.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

Для контролю стерильності поживних середовищ пробу поживного середовища після стерилізації висівають на агаризовані середовища в чашках Петрі (МПА – для визначення бактерій, СА – для виявлення грибів). Висів здійснюють стерильною піпеткою. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами загортають у папір і поміщають у термостат для інкубації за температури 32-34 °С протягом 1-2 діб (МПА) та за 24-26 °С протягом 3-5 діб (СА). Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 24 години. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [53].

Мікробіологічний контроль чистоти культури реалізується шляхом висіву на чашки Петрі з агаризованими середовищами і наступним мікроскопіюванням. Пробу культуральної рідини висівають мікробіологічною петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з триптон-соєвим агаром (ТСА) або м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, а також з сусло-агаром (СА) для виявлення дріжджів та грибів [53].

Мікроскопіювання здійснюють за допомогою світлового мікроскопа з імерсійною системою. Для приготування препарату «роздавлена крапля» на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять краплину культуральної рідини. Краплю розподіляють по склу петлею, при цьому діаметр мазка має становити близько 1 см.

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.07КР ПЗ</i>			
З	Ли	№ докум.	Підп	Д				
Розроб.	Мороз Я. А.				<i>РОЗДІЛ 8</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Удимович						71	87
Реценз.						74		
Н.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Затверд.	Стабніков							

Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Після цього на сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини імерсійної олії та проводять мікроскопіювання зі збільшенням 90х (імерсійний об'єктив). По закінченню роботи ватою, змоченою етиловим спиртом, прибирають залишки олії з імерсійного об'єктива [53].

Propionibacterium freudenreichii subsp. *shermanii* OLP-5 – грампозитивні неспороутворювальні нерухомі бактерії різної форми (часто – булавоподібні, але також можуть бути кокоподібні або розгалужені) розміром 0,5-0,8*1-5 мкм. Клітини розташовуються поодиноці, парами, короткими ланцюжками або у вигляді «китайських ієрогліфів». На кров'яному агарі утворюють опуклі напівпрозорі блискучі колонії, які можуть мати забарвлення від кремового до червонуватого [54].



Рис. 4.1. Вигляд клітин бактерій *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* OLP-5 в скануючому електронному мікроскопі (x60000) та на кров'яному агарі

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Концентрація біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. У пробірці із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтують, після чого

вимірюють її оптичну густина при довжині хвилі 540 нм. Отримані дані перераховують за калібрувальним графіком [55].

8.2.2. Концентрація ціанокобаламіну

Концентрацію ціанокобаламіну визначають методом вискоєфективної рідинної хроматографії, використовуючи колонку RP-18 (з октадецильною нерухомою фазою, яка має розмір часточок 5 мкм) з УФ-детектором (371 нм). Як рухома фаза використовується суміш 0,25 М KH_2PO_4 і метанолу (25 %:75 %), яку подають зі швидкістю 0,8 мл/хв. Аналіз проводять за температури 40 °С. Попередня підготовка проби: центрифугування 5 мл культуральної рідини за 10000 g протягом 10 хв для відділення клітин. Об'єм інжекції проби в колонку: 100 мкл [56].

8.2.3. Концентрація джерела Карбону

Для визначення джерела Карбону (глюкози) використовують ензимний набір «Діаглюк-2», який є сумішшю глюкозооксидази, пероксидази та хромогену у фосфатному буфері та характеризується високою чутливістю, що дає змогу визначати 0,5—10 мкг глюкози в пробі об'ємом 4 мл, відтворюваністю результатів, а також широким діапазоном лінійності концентрацій — до 50 ммоль/л. Принцип методу ґрунтується на окисненні глюкози глюкозооксидазою до глюконової кислоти та перекису водню, який під дією пероксидази окиснює хромоген до кольорового продукту, оптична густина якого визначається фотометрично за довжини хвилі 450 нм і довжини світлового шляху 1 см. Об'єм проби для аналізу становить 4 мл. Перед аналізом пробу культуральної рідини об'ємом 5 мл центрифугують за 10000 g протягом 10 хв для відділення біомаси [57].

8.2.4. Концентрація джерела Нітрогену

Джерелами азоту є як органічні, так і неорганічні речовини, що наявні у поживному середовищі, тому визначають концентрацію загального азоту після мінералізації [58]. Пробу культуральної рідини об'ємом 5 мл центрифугують за 10000 g протягом 10 хв для відділення

біомаси, після чого 1 мл супернатанту відбирають у пробірку, в яку потім додають 4 мл води очищеної. Пробірку струшують, для аналізу відбирають 1 мл утвореного розчину (який має містити близько 2 мг азоту), який поміщають у колбу для спалювання. До розчину додають 4 г подрібненої суміші, що складається зі 100 г калію сульфату, 5 г міді сульфату і 2.5 г селену, та три скляні кульки. Додають 5 мл кислоти сірчаної таким чином, щоб вона змивала всі частки, що прилипли до шийки колби, і стікала по стінках колби. Вміст колби перемішують коловими рухами. Щоб уникнути великих втрат сірчаної кислоти, шийку колби закривають нещільно, наприклад, скляним грушоподібним корком з коротким запаяним відростком. Колбу нагрівають, поступово доводячи до кипіння з конденсацією пари сірчаної кислоти у шийці колби (при цьому необхідно стежити за тим, щоб верхня частина колби не перегрівалася). Нагрівання продовжують протягом 30 хв, після чого суміш охолоджують, розчиняють твердий залишок, додаючи до суміші обережно 25 мл води очищеної, знову охолоджують і приєднують до приладу для перегонки з водяною парою. Додають 30 мл розчину натрію гідроксиду концентрованого та негайно починають перегонку, пропускаючи пару крізь суміш. Близько 40 мл відгону збирають у приймач, що містить 20,0 мл 0,01 М розчину хлоридної кислоти і достатню кількість води очищеної для того, щоб кінець холодильника був занурений. Наприкінці перегонки приймач опускають таким чином, щоб кінець холодильника знаходився над поверхнею рідини. Не слід допускати, щоб на зовнішній поверхні холодильника залишалася рідина із вмісту приймача. Відгін титрують 0,01 М розчином натрію гідроксиду, використовуючи як індикатор змішаний розчин метилового червоного, до переходу забарвлення з червоно-фіолетового в зелене. Після закінчення відгонки кінець холодильника промивають зовні невеликою кількістю води, збираючи промивну воду у той самий приймач. Випробування повторюють, використовуючи замість

проби культуральної рідини 50 мг глюкози. Вміст азоту розраховують за формулою:

$$\text{Вміст азоту} = 0,01401(n_2 - n_1)/V \%,$$

де V – об'єм проби культуральної рідини, мл; n_1 – об'єм 0,01 М розчину натрію гідроксиду, витрачений на титрування розчину, одержаного після спалювання проби, мл; n_2 – об'єм 0,01 М розчину натрію гідроксиду, витрачений на титрування розчину, одержаного після спалювання глюкози, мл.

РОЗДІЛ 9

АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

9.1 Системи знешкодження рідких відходів

Системи знешкодження рідких відходів біотехнологічних виробництв є важливим елементом для забезпечення екологічної стійкості цих підприємств. Технології знешкодження відходів варіюються в залежності від типу виробництва і характеру відходів, але загальні підходи можуть включати наступні методи[59].

9.1.1 Фізико-хімічні методи

Ці методи включають обробку відходів за допомогою різних фізичних і хімічних процесів, таких як фільтрація, осадження, коагуляція, окиснення, нейтралізація і знежирення. Ці процеси допомагають видалити шкідливі речовини і забруднюючі речовини з відходів, роблячи їх менш небезпечними для навколишнього середовища[59].

9.1.2 Біологічні методи

Ці методи використовують живі організми, такі як бактерії, гриби або рослини, для очищення рідких відходів. Найпоширенішими методами є аеробне та анаеробне біологічне очищення. У аеробному процесі розклад відбувається за участю кисню, тоді як анаеробний процес відбувається без кисню. Біологічні методи ефективні у видаленні органічних забруднювачів[59].

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</i>			
<i>З</i>	<i>Ли</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підп</i>	<i>Д</i>	<i>РОЗДІЛ 9</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Мороз Я. А.</i>						76	87
<i>Перевір.</i>	<i>Удимович</i>							
<i>Реценз.</i>								
<i>Н.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		

9.1.3 Мембранні технології

Ці методи використовують спеціальні мембрани для фільтрації та розділення забруднень у відходах. Наприклад, обернена осмос і мікрофільтрація можуть бути використані для видалення розчинених речовин і суспендованих частинок з відходів[59].

9.2 Системи знешкодження газоподібних відходів

Методи очищення промислових викидів від газоподібних відходів за характером поділяються на:

- промивання викидів розчинниками, що не сполучаються із забруднювачами;
- поглинання газоподібних домішок твердими активними речовинами;
- промивання викидів розчинами реагентів, що вступають у хімічне з'єднання із забруднювачами;
- поглинання домішок шляхом застосування каталітичного перетворення;
- термічна обробка викидів;
- осаджування в електричних та магнітних полях; виморожування[60].

9.3. Системи знешкодження твердих відходів

На біотехнологічному виробництві існує кілька систем знешкодження твердих відходів, які використовують біологічні процеси для їх перетворення та зменшення негативного впливу на довкілля. Ось декілька прикладів таких систем:

1. **Біологічна стабілізація.** Цей процес використовує мікроорганізми для стабілізації твердих відходів, зменшення їх об'єму та неприємного запаху. Мікроорганізми розкладають органічні речовини у відходах, знижують вміст вологи і допомагають утворити

стабільну масу, яка може бути безпечно утилізована або використана для подальшого застосування.

2. **Біологічний піроліз.** Піроліз є процесом термохімічного розкладання органічних матеріалів при високих температурах без доступу повітря. Біологічна піроліз використовує біологічні катализатори або мікроорганізми для сприяння піролізу твердих відходів. Цей процес перетворює органічні відходи на продукти, такі як біогаз, біоолію або біохарчовий вугілля, які можуть бути використані для енергетичних або інших цілей.

Ці системи знешкодження твердих відходів на біотехнологічному виробництві допомагають зменшити відхід відходів на смітник і сприяють більш екологічно стійкому управлінню відходами[59].

РОЗДІЛ 10

НОРМАТИВНО ТЕХНОЛОГІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА

10.1. Основні положення щодо стандартизації в Україні.

Правові та організаційні засади стандартизації в Україні, що спрямовані на забезпечення єдиної технічної політики у цій сфері. Органи державної та галузевої служб стандартизації. Організація робіт з стандартизації в Україні. Основні положення державної системи стандартизації України. Об'єкти стандартизації. Категорії нормативних документів з стандартизації. Види стандартів. Національні стандарти. Міжнародні стандарти.

10.2. Державна система стандартизації. Стандарти на штрихове кодування. Роль уніфікації у виробництві. Нормоконтроль технічної документації. Техніко-економічна ефективність стандартизації. Закони України «Про стандартизацію та сертифікацію», «Про стандарти, технічні регламенти та процедури оцінки відповідності».

Виробництво фармацевтичної продукції забезпечується організацією технологічного процесу відповідно до НТД та технологічної нормативної документації (ТНД) на конкретний препарат або групу споріднених ЛЗ, що присутні у Державному реєстрі ЛЗ, в ДФУ розділ «Монографії». Основою ТНД є аналітична нормативна документація (АНД) або методи контролю якості (МКЯ) лікарського засобу які складаються на лікарську форму медичного препарату або АФІ.

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.07 КР ПЗ</i>				
З	Ли	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.	Мороз Я.А.					Літ.	Арк.	Аркушів	
Перевір.	Удимович В.М.						79	87	
Реценз.					<i>РОЗДІЛ 10</i>				
Н.									
Затверд.	Стабніков								
<i>Кафедра БТМ</i>								<i>82</i>	

НТД поділяють на такі категорії:

- Державна фармакопея (ДФ);
- Аналітична нормативна документація;
- Державні стандарти (ГОСТ, ДСТУ);
- Керівний нормативний документ (КД);
- Виробничі технологічні інструкції;
- Галузевий стандарт України(ГСТУ);
- Технічні умови України (ТУУ);
- Стандарти підприємств (СТП).

Виконання реалізується у відповідності з чинними законодавчими і нормативними документами міждержавного, державного та галузевого призначення.

1. ДСТУ 2636 -94 Загальна мікробіологія. Терміни та визначення.
2. ДСТУ 2881-94 Екологія мікроорганізмів. Терміни та визначення.
3. ДСТУ 2424-94 Промислова мікробіологія. Терміни та визначення.
4. ДСТУ 3803-98 Біотехнологія. Терміни і визначення.
5. ДСТУ ISO 9000 – 2001 Системи управління якістю. Основні положення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Vitamin B12. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00115>
2. Laird E., Molloy A. M. Water-Soluble Vitamins and Essential Nutrients. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. 2014. P. 1-16. doi: 10.1016/b978-0-12-801238-3.00233-6
3. Тарасюк М. Д., Петрожицкий А. С., Мушпаков В. Ю. Биологическая роль витамина B12. Материалы IV Международной научно-практической конференции «Химия в содружестве наук» (Беларусь, г. Горки, 17-19 мая 2016). С. 324.
4. студентовамагістрантовај Т. Vitamins. Pharmacognosy. ACADEMIC PRESS. 2017. P. 81–292. doi: 10.1016/B978-0-12-802104-0.00013-5
5. Витамин B12 (Кобаламин). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://calorizator.ru/vitamin/b12>
6. Vitamin B12. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pharmacy.londondrugs.com/NaturalProduct/GetNaturalProduct/vitamin-B12>
7. Цианокобаламін 0,02% розчин 1 мл ампули №10. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.add.ua/ua/cianokobalamin-0-02-1ml-10.html>
8. Витамин B12 (цианокобаламин) таб. 100мг №30. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://apteka.lekafarm.ru/katalog/vitamin-vitamin-b12-tsianokobalamin-tab-100mg-30-877763.html>
9. Витамин B12 (цианокобаламин). [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.eapteka.ru/goods/vitaminy_i_bad/vitaminy_i_mineraly/vitamin_v12/vitamin_b12_tsianokobalamin/

10. Цианокобаламин (Витамин В12). [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://biopax.ru/articles/tsianokobalamin_vitamin_v12/
11. Витамин В12 (цианокобаламин). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://helix.ru/kb/item/06-012>
12. Витамин В12. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://edaplus.info/vitamins/vitamin-b12.html>
13. Almohanna H. M., Ahmed A. A., Tsatalis J. P., Tosti A. The role of vitamins and minerals in hair loss: a review. *Dermatology and therapy*. 2019, 9(1): 51-70. doi: 10.1007/s13555-018-0278-6
14. Kaur S., Goraya J. S. Dermatologic findings of vitamin B12 deficiency in infants. *Pediatric dermatology*. 2018, 35(6): 796-799. doi: 10.1111/pde.13679
15. Кутасевич Я. Ф., Олейник И. А., Маштакова И. А. Значение витаминотерапии в лечении хронических дерматозов. *Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.* 2011, (4-С): 46-50.
16. Значение витамина В12 для показателей молочной продуктивности. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://agrovesti.net/lib/tech/cattle-tech/znachenie-vitamina-v12-dlya-pokazatelej-molochnoj-produktivnosti.html>
17. Морозова Е. А. Факторы, влияющие на содержание витамина в12 (кобаламина) в кормах и его значение в животноводстве. Материалы V Международной студенческой научно-практической конференции «Научно-исследовательская деятельность как фактор личностного и профессионального развития студентов» (Россия, г. Орёл, ФГБОУ ВО Орловский ГАУ, 21 апреля 2021 г). С. 16-18.
18. Вітамін В12. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://krebs-feed.com.ua/product/%D0%B2%D1%96%D1%82%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD-%D0%B212/>

19. Кузнецова К. А., Халина В. Н., Дюмин М. С. Роль витаминов в организме кошек. *Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ*. 2016, 4(7): 1-6.
20. Нужен ли дополнительный прием витамина В12 домашним питомцам. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.vetww.com/nujen_li_dopolnitelnyiy_priem_vitamina_b12_domashnim_pitomtsam/414.html
21. Можно ли давать собакам витамин В12? [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://midogguide.com/dog-breeds/can-you-give-b12-vitamins-to-dogs.html>
22. Ферровет+В12. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://agrovektor.com/physical_product/212839-ferrovetb12.html
23. Цианокобаламин. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pettown.ru/catalog/veterinarnaya-apteka/vitaminy-zhelezosoderzhashchie-preparaty/tsianokobalamin-vitamin-v12-100ml/>
24. Цианофор. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://vetrina.com.ua/product/czianofor-10ml-butafosfan-vit-v12-vetsintez/>
25. Дефіцит вітаміну В₁₂ і раціон харчування у людей літнього і старечого віку. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://pronut.medved.kiev.ua/index.php/ua/issues/2015/2/item/448-vitamin-b12-deficiency-and-a-diet-in-elderly-and-senile-age>
26. Населення [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2022/ds/nas_rik/nas_90-2021.xlsx
27. Інструкція Ціанокобаламін-Дарниця розчин д/ін. 0.5 мг/мл по 1 мл №10. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [амп.https://tabletki.ua/%D0%A6%D0%B8%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%B1%D0%B0%D0%BB%D0%B0%D0%](https://tabletki.ua/%D0%A6%D0%B8%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%B1%D0%B0%D0%BB%D0%B0%D0%)

BC%D0%B8%D0%BD-

%D0%B4%D0%B0%D1%80%D0%BD%D0%B8%D1%86%D0%B0/631
3/

28. Журавльова Л.В. Змістовий модуль 4: «Основи діагностики, лікування та профілактики основних хвороб крові та кровотворних органів». Методичні вказівки для студентів. Харків 2012.

29. Від 28 млн до 34 млн [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://suspilne.media/437526-vid-28-mln-do-34-mln-institut-demografii-nazvav-ciselnist-naselenna-v-ukraini-comu-taka-riznica/>

30. KEGG [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/kegg/>

31. Турбинная мешалка (МТЗ) (МТО) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://tdredoctober.com/catalog/peremeshivajushhee-oborudovanie/meshalka-turbinnay.html>

32. Ферментатор. Ферментёр. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.agromash-spb.ru/fermentator.html>

33. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2021 рік [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://data.gov.ua/dataset/1dddc0e9-25d8-4b9a-aec6-d31a5af44437/resource/698b11a0-4e82-4053-b498-b94cbe6e4e81/download/2021-reiestr-dezzasobiv-1-331.xlsx>

34. Інструкція антисептик дезінфекція [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.антисептика.com.ua/upl/admin_upload/ggms/dezolayt.doc

35. Засіб миючий лужний пінний з дезінфікуючим ефектом Dannev DESOVER SA4/F3 5 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://doautoplus.in.ua/ua/p1458155074-sredstvo-moyuschee-schelochnoe.html>

36. Каустична сода [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://prom.ua/ua/p694734755-kausticheskaya-soda-granula.html?&primelead=Mі43NA>
37. Фамідез® Форте [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://famidez.ua/index.php/produksiya/dezinfektsiya/instrumenty/famidez-forte>
38. Вернедор універсальний концентрат 5 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://panigarmonika.com.ua/uk/1072-vernedor-universalnij-koncentrat-5-1.html?utm_campaign=GMERCHANTCENTER&utm_source=google&utm_medium=Merchant&gclid=CjwKCAjwrdmhBhBBEiwA4Hx5g0_XA9jzby11_dQuYPLwQOfAvOtaGtjy6W82r_5gcRlj_65dwhos9xoCPasQAvD_BwE
39. Ексан Про Дез, антимикробна 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_spa_1_50_dom_i_sad&gclid=CjwKCAjwitShBhA6EiwAq3RqA63qo322zwd-kQ9lxX0Rgkv7Cgprp5peO33Fks4SGZzQUH8QMq1Q7RoCZ5YQAvD_BwE
40. Фільтр грубого очищення [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.technofilter.com.ua/types/mesh/>.
41. Компресор [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresori-seriyi-tidy-3-50>.
42. Теплообмінник-охолоджувач [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-oxolodzhuvachi/>.
43. Ресивер [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresori-seriyi-tidy-3-50>.

44. Теплообмінник-нагрівач [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://opeks.ua/ua/parovi-kaloriferi-nagrivachi>.
45. Фільтр тонкого очищення [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.technofilter.com.ua/types/hepa/>.
46. Апарати сталеві з механічним перемішуючим пристроєм [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroy_stvom_ua.php.
47. Stirred Pressure Autoclave Reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.amarequip.com/stirred-pressure-autoclave-reactor>.
48. Лічильник-дозатор для води [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1139912056-schetchik-dozator-dlya.html>.
49. Фільтр індивідуальний [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.technofilter.com.ua/types/hepa/>.
50. SIP and CIP Customisable Pilot and Industrial Scale Fermenters/Bioreactors [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.solarisbiotech.com/en/fermenters-bioreactors-pilot-industrial-customizable>.
51. Перистальтичні насоси [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://tapflo.ua/images/pt_ptl_ua_rev1_2019.pdf.
52. Дозатор сипучих матеріалів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://artmash.ua/product/dozator-sypuchih-materialov-06-kub-m>.
53. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.

54. 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.
55. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. / Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 217 с.
56. Thirupathaiyah Y., Rani C. S., Reddy M. S., Rao L. V. Effect of chemical and microbial vitamin B12 analogues on production of vitamin B12. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, 28(5): 2267-2271. doi: 10.1007/s11274-012-1011-8
57. Гончар М. В. Аналітичний набір “Діаглюк-2”. – Львів, 2006.
58. 19. Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
59. Управління та поводження з відходами. Частина 2. Тверді побутові відходи : навчальний посібник / Петрук В. Г., Васильківський І. В., Кватернюк С. М. та ін. – Вінниця : ВНТУ, 2015. – 100 с.
60. Методи захисту атмосфери : конспект лекцій. Одеса: ОДЕКУ, 2019. 89 с