

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)

Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«___» _____ 2020 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«___» _____ 2020 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Культивування *Corynebacterium glutamicum* для одержання лейцину

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

Мусієнко Маргарита Сергіївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Нечипор Юрій Юрійович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М.
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Соломенко Л.І.
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній
роботі немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

(шифр і назва)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНИЙ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Мусієнко Маргарити Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема проекту (роботи) Культивування *Corynebacterium glutamicum* для одержання лейцину

керівник проекту (роботи) Нечипор Юрій Юрійович, асистент

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

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

2. Строк подання здобувачем проекту роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до проекту роботи біологічний агент: *Corynebacterium glutamicum*, цільовий продукт – лейцин.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту; РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування; РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту; РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми; РОЗДІЛ 6. Продуктовий розрахунок, матеріальний баланс, розрахунок технологічного обладнання; РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання; РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми; РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва; РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва; список використаної літератури, додатки.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) Апаратурна виробництва лейцину – 2 аркуші формату А1, 1 аркуш формату А2. Технологічна схема виробництва лейцину – 1 аркуш формату А1, 1 аркуш формату А2. Схема автоматизації ділянки кристалізації – 1 аркуш формату А3.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	08.05.2020	17.05.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	23.03.2020-30.03.2020	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	23.03.2020-30.03.2020	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	30.03.2020-7.04.2020	
4	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	7.04.2020-14.04.2020	
5	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	14.04.2020-24.04.2020	
6	РОЗДІЛ 6. Продуктовий розрахунок, матеріальний баланс, розрахунок технологічного обладнання	24.04.2020-1.05.2020	
7	РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання	1.05.2020-8.05.2020	
8	РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми	8.05.2020-17.05.2020	
9	РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	8.05.2020-17.05.2020	
10	РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва	8.05.2020-17.05.2020	
11	Оформлення пояснювальної записки	17.05.2020-22.05.2020	
12	Виконання графічної частини проекту	22.05.2020-27.05.2020	

Здобувач _____ Мусієнко МС.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Нечипор Ю.Ю.
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва лейцину з використанням нового, генно-інженерного штаму *Corynebacterium glutamicum* FA-1 який за 72 годин синтезує 18,55 г/л.

У даній роботі розраховано техніко-економічне обґрунтування річної потреби амінокислоти лейцину. Потужність виробництва лейцину становить 4543 кг за рік.

Технологічна схема виробництва лейцину включає допоміжні роботи (приготування миючих та дезінфікуючих розчинів, підготовку виробничих приміщень, обладнання та комунікацій, стерильного аераційного повітря, підготовка розчинів для післяферментаційних робіт, підготовку та стерилізацію піногасника, приготування та стерилізацію поживних середовищ), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, виробниче культивування в ферментері об'ємом 6,3 м³, зберігання культуральної рідини, відділення біомаси центрифугуванням, сорбції, концентрування на вакуум-випарній установці, кристалізації, та вакуум-сушінню).

Кваліфікаційна робота складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (79 найменувань), апаратурної схеми (3 листа формату A1), технологічної схеми (1 лист формату A1, 1 лист формату A2) та схеми автоматизації (1 лист формату A4). Загальний обсяг роботи – 154 сторінки, 10 рисунків, 26 таблиць.

Ключові слова: *Corynebacterium glutamicum* FA-1, лейцин, культивування, виділення, сировина, біосинтез, методи контролю.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	8
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	12
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	18
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	21
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	24
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	26
3.1. Потреба у цільовому продукті	26
3.2. Розрахунок потужності виробництва	29
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера	32
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	34
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	38
4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	38
4.2. Біосинтез лейцину за використання <i>C. glutamicum</i> FA-1.....	40
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	43
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	43
5.1.1. Обґрунтування способу культивування	43
5.1.2. Обґрунтування вибору типу ферментера та мішалки	45
5.1.3. Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря	46
5.1.4. Вибір миючих та дезінфікуючих засобів	49
5.1.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	57
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	58
5.2.1. Обґрунтування способу відділення клітинної біомаси від культуральної рідини	59

5.2.2. Обґрунтування очищення і концентрування розчинів.....	62
5.2.3. Обґрунтування способу сушіння амінокислоти	70
5.2.4. Обґрунтування товарної форми та упаковки	71
5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту	73
5.3.1. Обґрунтування очищення і концентрування розчинів	73
РОЗДІЛ 6. ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ	75
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	104
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	110
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	130
9.1. Мікробіологічний контроль	130
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	132
9.3. Визначення вологості порошку лейцину.....	136
9.4. Карта постадійного контролю	137
РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	143
10.1. Опис функціональної схеми автоматизації	143
10.2. Завдання на розробку схеми автоматизації	145
10.3. Специфікація на прилади та засоби автоматизації	146
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	147
ДОДАТКИ	

ВСТУП

Використання досягнень науки в біотехнології пов'язане з фундаментальними дослідженнями, які здійснюються на найвищому сучасному рівні. У будь-якому біотехнологічному процесі необхідна обов'язкова участь і взаємодія між собою мікроорганізмів (бактерії, гриби, дріжджі й т.д.) із субстратом (живильне середовище або речовина, що розкладається тим або іншим мікроорганізмом) [1].

Амінокислоти - структурні хімічні одиниці або "будівельні цеглинки", що утворюють білки. Вони на 16% складаються з азоту, що є основною хімічною відмінністю від двох інших найважливіших елементів живлення - вуглеводів і жирів. Важливість амінокислот для організму визначається тією величезною роллю, яку відіграють білки у всіх процесах життєдіяльності [2].

Будь-який живий організм складається з білків. Різноманітні форми білків беруть участь у всіх процесах, що відбуваються в живих організмах. У тілі людини з білків формуються м'язи, зв'язки, сухожилля, всі органи і залози, волосся, нігті; білки входять до складу рідин і кісток. Ферменти і гормони, що каталізують і регулюють всі процеси в організмі, також є білками. Вони синтезуються в організмі з амінокислот, які утворюються внаслідок розщеплення білків, що знаходяться в харчових продуктах. Таким чином, саме амінокислоти, а не самі білки є найбільш цінними елементами харчування [2].

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Мусієнко М.С.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевірів</i>		<i>Нечипор Ю.Ю.</i>					1	2
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н.Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

Бактерія *C. glutamicum* широко використовується в промисловості для виробництва амінокислот. Використання цієї бактерії для промислового виробництва сягає більш ніж 40 років. Вона не є патогенною, не утворює спори і має відносно невеликі вимоги до зростання [3].

Оскільки амінокислоту лейцин як сировину закупають закордоном, **актуальним** на сьогодні є вітчизняна розробка технології отримання та виділення амінокислоти мікробіологічним шляхом з використанням генно-інженерного штаму як високоефективного продуцента, який надалі буде використовуватися для медицини, як компонент лікарських засобів та харчової промисловості (харчова добавка) [4].

Лейцин - незамінна амінокислота, що відноситься до трьох розгалужених амінокислот. Діючи разом, вони захищають м'язові тканини і є джерелами енергії, а також сприяють відновленню кісток, шкіри, м'язів, тому їх прийом часто рекомендують у відновний період після травм і операцій. Лейцин також декілька знижує рівень цукру в крові і стимулює виділення гормону росту. Потреба організму - 16 мг/добу на 1 кг маси тіла [2].

Метою даного проекту є розробка виробництва (апаратурна і технологічна схеми) амінокислоти лейцину бактерією *Corynebacterium glutamicum* FA-1.

Новизною є використання штаму бактерії *Corynebacterium glutamicum* FA-1, який є продуцентом амінокислоти лейцину. Даний штам за 72 години ферментації на поживному середовищі здатен продукувати високу концентрацію лейцину, а саме 18,55 г/л [5]. Також новизною даного дипломного проекту є підбір сучасного апаратурного обладнання для процесу виділення та очищення цільового продукту, що забезпечує мінімальні його втрати.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Лейцин — одна з двадцяти канонічних протеїногенних α -амінокислот, що входять до складу білків в живих організмах. Має у своїй структурі один хіральний центр і може існувати у вигляді D- або L-оптичних ізомерів, а також у вигляді рацемату (суміші рівних кількостей D- і L-ізомерів). В живих організмах зустрічається у вигляді L-ізомера. Оскільки лейцин є α -амінокислотою - це означає, що він містить α -аміногрупу, групу α -карбонів та ізобутильну групу бічного ланцюга, що робить її неполярною аліфатичною амінокислотою [6].

Структурна формула амінокислоти (див *рис. 1.1*) та хімічною формула - $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

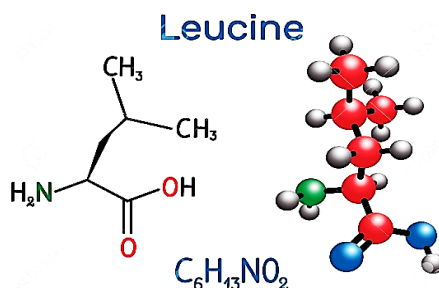


Рис. 1.1. Структурна та раціональна формула лейцину.

Безбарвний порошок з температурою плавлення 293 °C (чистий D- або L-ізомери) і 332 °C (D, L рацемат), густина - 1,293 г/см³. Молярна маса - 131,17 г/моль. Обмежено розчинний у воді, погано в етанолі, добре в розчинах лугів і кислот, не розчинний в діетиловому ефірі. константа дисоціації pK_a (COOH) = 2.36, pK_a (NH₃⁺) = 9.6. Ізоелектрична точка pI = 6.04 [7].

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту				Літ.	Арк.	Акрушів		
Розробив		Мусієнко М.С.										1	4
Перевірів		Нечипор Ю.Ю.											
Реценз.									Кафедра БТМ				
Н.Контр.													
Затверд.		Пирог Т.П.											

У плазмі крові людини в нормі міститься близько 2 мг L-лейцину, а його добова екскреція з сечею становить приблизно 14 мг. Він добре всмоктується при пероральному призначенні, проникає через гематоенцефалічний бар'єр і швидко включається в білки. Активний транспорт L-лейцину в клітини здійснюється специфічної L-системою, функціонування якої одночасно визначає надходження ароматичних амінокислот (тироzinу, фенілаланіну, триптофану) і метіоніну. Всі перераховані сполуки конкурують між собою в процесі перенесення всередину клітин [8].

Оскільки лейцин не синтезується в організмі людини, він повинен надходити з їжею. Добова потреба становить приблизно 42 мг на 1 кг ваги. У найбільших кількостях лейцин міститься в соєвому білку, а також в молочних білках: казеїні і сироватковому білку [9].

Можна виділити такі властивості лейцину [9]:

1. Перешкоджає процесам розпаду молекул білка. При вживанні лейцину на тлі силових тренувань можна знизити розпад білка. Це сприяє збереженню м'язової маси і перешкоджає катаболічним процесам.
2. Прискорює вироблення білка. Більш швидкий синтез білка сприяє підвищенню силових показників і нарощування м'язової маси.
3. Перешкоджає процесам розпаду глюкози. У ситуації стресу організм посилено виробляє кортизол. Даний катаболічний гормон бере участь у розпаді молекул глікогену.
4. Збільшує секрецію інсуліну. Лейцин впливає на секрецію інсуліну: в комбінації з іншими ВСАА (розгалуженими амінокислотами) дана амінокислота активізує викид даного гормону в плазму крові.
5. Підтримує процеси водного обміну. Показники альбуміну в складі крові безпосередньо залежать від незамінних амінокислот. Альбумін орієнтований на регуляцію водного обміну: низький рівень даної речовини може призводити до набряків.

В медицині лейцин використовують при терапії наступних захворювань: цироз печінки, різних формах дистрофії і психічних розладах. Забезпечує ріст організму, сприяє загоєнню ушкоджень шкіри і кісткової тканини, знижує

підвищений рівень цукру в крові при діабеті, сприяє зниженню рівня холестерину. Добавка застосовується для нормалізації метаболічних процесів в організмі. Рекомендується в якості імуностимулюючого засобу, продається без рецепта [9].

L-лейцин надає імуномодулюючий і імуностимулюючий ефект, має мембраностабілізуючу, гепатопротекторну дію, коригує дисліпідемії, активує синтез білків у печінці і її антитоксичну функцію, надає коригуючий вплив на амінокислотний дисбаланс, є активатором процесів біосинтезу сірковмісних амінокислот і родинних з'єднань з вираженим антиоксидантним ефектом, регулює співвідношення процесів синтезу та розпаду білків в організмі (інгібітор процесу розпаду білка), активує цикл сечоутворення, процеси азотистого обміну, перешкоджає розвитку інсулінорезистентності [8].

Фармакодинаміка. Лейцин – харчова амінокислота, здатна безпосередньо стимулювати синтез міофібрилярного м'язового білка. Цей ефект лейцину виникає внаслідок його ролі як активатора механічної мішені рапаміцину (mTOR), білкової кінази серин-треоніну, яка регулює біосинтез білка та ріст клітин. Активація mTOR лейцином опосередковується через Rag GTPases, зв'язування лейцину з лейцил-тРНК синтетазою, зв'язування лейцину з сестрином 2 та, можливо, іншими механізмами [10].

Метаболізм L-лейцину грає найважливішу роль в організмі людини. На відміну від інших амінокислот, що метаболізуються головним чином у печінці, L-лейцин утилізується в м'язах і нирках. Жирові та м'язові тканини використовують лейцин для утворення стеролів та інших з'єднань. Комбіноване використання лейцина в цих двох тканинах у сім разів більше, ніж в печінці. Утворені в процесі його катаболізму глютамінова кислота, глютамін і аланін є основними попередниками в реакціях глюконеогенезу [8].

Катаболізм L-лейцину відбувається шляхом трансамінування і окисного декарбоксилювання. Доведено, що L-лейцин регулює співвідношення процесів синтезу та розпаду білків в організмі, а метаболізм цієї амінокислоти тісно пов'язаний з функціонуванням глюкозоаланінового циклу. Концентрація L-лейцину в фізіологічних рідинах і тканинах істотно змінюється в залежності від гормонального статусу. Додаткове введення L-лейцину знижує в крові кількість

практично всіх незамінних амінокислот, при цьому швидкість окислення амінокислот в цілому збільшується. Утворений з L-лейцину α -кетозокапронат в умовах голодування або збільшення енергетичних витрат організму стає важливим субстратом для продукції енергії [8].

Незамінність L-лейцину для організму людини, його метаболічну дію (активація синтезу білка і ДНК, транспорту мРНК, інгібування протеолізу) і специфічна фармакологічна імуномодулююча активність його похідних підтверджують наявність імуностимулюючої ефекту. Доведено доцільність застосування L-лейцину при будь-яких катаболічних станах. Показано, що його введення сприяє збільшенню імунологічної активності лімфоцитів периферичної крові [8].

Результати імунологічних досліджень з оцінки імуномодулюючої дії L-лейцину доводять його стимулюючий ефект як щодо окремих компонентів імунної системи, так і внутрішніх чинників неспецифічної резистентності, а метаболічні наслідки його перорального застосування в цілому носять адаптивний характер. Адаптивний вплив відбуваються на різних рівнях (молекулярному, клітинному, тканинному). Очевидно, перераховані вище метаболічні наслідки реалізуються в імунокомпетентних клітинах і тканинах в якості одного з механізмів дії препарату на імунну систему [8].

Лейцин синтезується рослинами і мікроорганізмами з піровиноградної кислоти. Його кодони: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA і CUG. Входить до складу багатьох БАД. L-лейцин - харчова добавка E641 класифікується як підсилювач смаку [11].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

У промисловості ВСАА виробляються в основному за рахунок мікробної ферментації, використовуючи мутантні штами бактерій, такі як *Corynebacterium sp.* і *Escherichia sp.* Тому для ферментації необхідний виробник ВСАА з відмінною ферментацією для збільшення кінцевого титру та зниження собівартості виробництва.

На відміну від біосинтетичних шляхів інших амінокислот, біосинтетичний шлях ВСАА включає розгалужені та паралельні реакції, каталізовані ідентичними ферментами. Очевидно, що виробництво одного ВСАА часто супроводжується накопиченням двох інших ВСАА, оскільки однакові ферменти беруть участь у біосинтетичному шляху, тим самим знижуючи кінцевий титр і збільшуючи складність вилучення [12].

Конструювання сучасних продуцентів - це генетична перебудова метаболізму, яка призводить до перетворення бактерій в біохімічну машину, метаболізм якої підпорядкований одній меті - продукції бажаної амінокислоти з мінімальними витратами на всі інші життєво важливі процеси до клітки. Оптимізуються наступні процеси: споживання з середовища джерел вуглецю і азоту, центральний метаболізм (гліколіз, пентозофосфатний шлях, цикл Кребса), власне шлях біосинтезу цільового продукту, експорт цільової амінокислоти з клітин в культуральну рідину [13].

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Мусієнко М.С.</i>			<i>РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірів</i>		<i>Неципор Ю.Ю.</i>					1	14
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н.Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

Крім того, блокуються шляхи можливої деградації цільової амінокислоти, а також її попередників, усуваються транспортні білки, здатні виділяти в середовище попередники цільового продукту, і, навпаки, посилюється експресія білків, що імпортують з середовища молекули попередників, що виділилися в нього. Для вирішення цих завдань змінюється експресія відповідних генів від повного блокування їх активності до надекспресії, включаючи пошук проміжного оптимального рівня експресії [13].

Продуцентами лейцину крім *Corynebacterium glutamicum* FA-1 є також штам *Corynebacterium glutamicum* T-3, та штами *Escherichia coli* H-9072, *Escherichia coli* 103. Порівняння характеристик цих організмів наведено в *табл. 2.1*.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів амінокислоти лейцину

Продуцент	Склад поживного середовища (% , г/л)	Умови культивування	Вихідна концентрація лейцину (г/л)	Література
<i>Corynebacterium glutamicum</i> FA-1	Глюкоза - 30,0; кукурудзяний екстракт - 25,0; CaCO ₃ - 20,0; дріжджовий екстракт - 10; цитрат натрія - 10,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 5,0; сечовина - 2,0; KH ₂ PO ₄ × 3H ₂ O - 1,30; метіонін - 0,40; MgSO ₄ × 7H ₂ O - 0,40; MnSO ₄ × H ₂ O - 0,01.	pH = 7,0; t = 30 °C; Період культивування – 72 год.	18,55	<i>Feng L., Xu J. and Zhang W.</i> Improved L-Leucine Production in <i>Corynebacterium glutamicum</i> by Optimizing the Aminotransferases // <i>Molecules</i> . – 2018 – Vol 23 – P. 1-13. doi:10.3390/molecules23092102.
<i>Corynebacterium glutamicum</i> T-3	Глюкоза - 20,0; амоній сірчаноокислий - 10,0; KH ₂ PO ₄ - 1,0; сечовина - 2,5; MgSO ₄ × 7H ₂ O - 0,05; MnSO ₄ × 4H ₂ O - 0,01 мг; FeSO ₄ × 7H ₂ O - 0,01 мг; біотин - 0,1 мг; тіамін - 0,4 мг; агар - 20.	pH = 7,0-7,2; t = 31±1,0 °C; 250 об / хв Період культивування – 84 год.	13,6	Патент № ВУ 6679. Якимович Н. Н., Гринько В. Н., Якимович И.В. и др. Штамм бактерий <i>Corynebacterium glutamicum</i> Ac-1 - продуцент l-лейцина, 2004 г.

Продовження табл. 2.1

<i>Escherichia coli</i> H-9072	Глюкоза - 0,5%, NH ₄ Cl - 0,2%, K ₂ HPO ₄ - 0,3%, NaH ₂ PO ₄ - 0,6%, MgSO ₄ - 0,01%, CaCl ₂ - 20 мг / л, агар - 2%.	pH = 7,2; t = 33 °C; Період культивування – 72 год.	3,9	Patent № USA 5744331. <i>Nakano et al.</i> Process for producing l-leucine, 1998.
<i>Escherichia coli</i> 103	Глюкоза – 6; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1,5; K ₂ HPO ₄ – 0,15; MgSO ₄ × 7H ₂ O - 0,1; тіамін – 100 мкг/л; CaCO ₃ - 2,0.	t = 32 °C; 250 об / хв Період культивування – 48 год.	1,7	Патент № RU 2140450. <i>Гусятинер М.М., Луниц М.Г., Иваноская Л.В.</i> Штамм бактерий <i>Escherichia coli</i> продуцент l-лейцина (варианты), 1999 г.

Виходячи з даних, які наведені в таблиці, можна відмітити переваги та недоліки кожного з продуцентів:

- *Corynebacterium glutamicum* T-3 – недоліком є досить великий період культивування (84 год), потреба у підтримуванні вищої температури культивування та менша вихідна концентрація лейцину (13,6);
- *Escherichia coli* H-9072 – недоліком є потреба у підтримуванні вищої температури, та дуже мала вихідна концентрація лейцину (3,9);
- *Escherichia coli* 103 – недоліком є менша вихідна концентрація продукту (1,7) та вища температура культивування, але перевагою є менша тривалість культивування (48 год).

Проте така порівняльна характеристика технологічного процесу (див. табл. 2.1) є недостатньою. На наступному етапі вибору біологічного агента необхідно порівняти вартість поживних середовищ для культивування всіх чотирьох продуцентів (табл. 2.2). Дані наведені у табл. 2.2, засвідчують, що середовище для культивування *C. glutamicum* FA-1 є найдорожчим за вартістю (24,2 грн за 1 л) у порівнянні з середовищами для культивування *C. glutamicum* T-3 (18,6 грн за 1 л), *E. coli* H-9072 (17,3 грн за 1 л) та *E. coli* 103 (0,42 грн за 1 л). Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, розраховували умовну вартість 1 г цільового продукту, та кількість утворених клітин за годину (табл. 2.3).

Отже, на підставі порівняння різних літературних даних, підрахунку вартості компонентів поживного середовища для культивування та підрахунку умовної вартості 1 г продукту було вирішено, що доцільніше буде використовувати культуру *C. glutamicum* FA-1 біосинтезу амінокислоти лейцину. Концентрація цільового продукту, синтезована цією бактерією вища (18,55 г/л) за інші представники, умовна вартість 1 г цільового продукту також майже найменша (1,30 грн/г) та кількість утворених клітин за годину є найвищою (0,26) за інші.

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *C. glutamicum* FA-1, *C. glutamicum* T-3, *E. coli* H-9072, *E. coli* 103.

Таблиця 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3, 4, 5, 6)*
<i>C. glutamicum</i> FA-1	Глюкоза – 30	50	1,5	1
	Кукурудзяний екстракт - 25,0	220	5,5	1
	CaCO ₃ - 20,0	25	0,5	1
	Дріжджовий екстракт - 10	1600	16	2
	Цитрат натрію - 10,0	40	0,4	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄ - 5,0	21	0,1	3
	Сечовина -2,0	25	0,05	4
	KH ₂ PO ₄ × 3H ₂ O - 1,30	47	0,006	3
	Метіонін - 0,40	220	0,09	1
	MgSO ₄ × 7H ₂ O - 0,40	65	0,03	1
	MnSO ₄ × H ₂ O - 0,01	30	0,0003	1
Вартість 1 л середовища – 24,2 грн.				
<i>C. glutamicum</i> T-3	Глюкоза – 20	50	1	1
	агар - 20	810	16,2	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 10,0	21	0,21	3
	KH ₂ PO ₄ - 1,0	120	0,12	1
	сечовина - 2,5	25	0,06	4
	MgSO ₄ × 7H ₂ O - 0,05	65	0,003	1
	FeSO ₄ × 7H ₂ O - 0,01	20	0,0002	1
	біотин - 0,1	720	0,07	1
	тіамін - 0,4	2380	1	1
Вартість 1 л середовища – 18,6 грн.				
<i>E. coli</i> H-9072	Агар - 20	810	16,2	3
	Глюкоза – 5	50	0,25	1
	NH ₄ Cl- 2	16,5	0,03	5
	K ₂ HPO ₄ – 3	192	0,6	1
	NaH ₂ PO ₄ - 6	25	0,2	6
	MgSO ₄ - 0,1	93	0,009	1
	CaCl ₂ – 0,02	27	0,0005	1
Вартість 1 л середовища – 17, 3 грн.				

<i>E. coli</i> 103	Глюкоза – 6	50	0,3	1
	CaCO ₃ - 2,0	25	0,05	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 1,5	21	0,03	3
	K ₂ HPO – 0,15	192	0,03	1
	MgSO ₄ × 7H ₂ O – 0,1	65	0,007	1
	тіамін – 0,0001	2380	0,0002	1
Вартість 1 л середовища – 0,42 грн.				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на квітень 2020 р.: 1.

<http://www.prom.ua>, 2. <http://agar.com.ua>, 3. <http://www.flagma.ua> 4.

<https://agreemarket.com.ua>, 5. <https://snabhim.com.ua>, 6. <http://chem.macrochem.ua>

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні *C. glutamicum*

FA-1, *C. glutamicum* T-3, *E. coli* H-9072 та *E. coli* 103.

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація лейцину, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утворених клітин, за год
<i>C. glutamicum</i> FA-1	24,2	18,55	1,30	72	0,26
<i>C. glutamicum</i> T-3	18,6	13,6	1,37	84	0,16
<i>E. coli</i> H-9072	17,3	3,9	4,44	72	0,05
<i>E. coli</i> 103	0,42	1,7	0,25	48	0,035

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Поживне середовище повинно містити всі елементи, з яких складається клітина, і в тому вигляді, в якому мікроорганізми зможуть їх поглинати. До складу бактеріальної клітини входять відповідні хімічні елементи, зазначені в процентах щодо сухої маси речовини: вуглець - 50; кисень - 20; азот - 10-14; водень - 8; фосфор-3; сірка, калій - 1; магній, кальцій - 0,5; залізо - 0,2. Вони представляють собою 10 основних елементів, необхідних мікроорганізмам. Інші елементи становлять приблизно 0,3 [20].

Окрім 10 головних елементів мікроорганізмам також необхідні другорядні біоеlementи, які містяться як правило у водопровідній воді. В цілому поживні середовища, які використовують для культивування, мають відповідати наступним мінімальним умовам: у складі повинні бути всі необхідні елементи, з яких формується клітина, і також повинні бути в такій формі, в якій культура здатна буде їх засвоїти. Отже, дане середовище містить усі необхідні елементи для культивування.

Для виробничого біосинтезу *C. glutamicum* FA-1 використовується середовище наступного складу [5] (г/л):

- Глюкоза = 30,0;
- Кукурудзяний екстракт = 25,0;
- CaCO_3 = 20,0;
- Дріжджовий екстракт = 10;
- Цитрат натрію = 10,0;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 5,0;
- Сечовина = 2,0;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ = 1,30;
- Метіонін = 0,40;
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,40;
- $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ = 0,01.

Концентрація цільового продукту – 18,55 г/л.

В статті не вказаний вихід біомаси, отже умовно візьмемо його за 1 г/л. Це число відповідає середньому показнику при культивуванні амінокислот.

Лейцин – $M_r(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2) = 131,17$ г/моль.

Джерелом вуглецю у даному середовищі виступає глюкоза.

Розраховуємо вміст вуглецю:

Глюкоза – $M_r(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = 180$ г/моль. За пропорцією визначаємо скільки вуглецю міститься в 30 г глюкози:

$$30 \text{ г} - 180 \text{ г/моль}$$

$$x - 6 \times 12$$

$$x = 72 \times 30 / 180 = 12 \text{ г вуглецю в } 30 \text{ г глюкози.}$$

Розраховуємо загальну кількість вуглецю в цільовому продукті:

Лейцин – $M_r(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2) = 131,17 \text{ г/моль}$. За пропорцією визначаємо скільки вуглецю міститься в 18,55 г лейцину:

$$18,55 \text{ г} - 131,17 \text{ г/моль}$$

$$x - 6 \times 12$$

$$x = 72 \times 18,55 / 131,17 = 10,2 \text{ г вуглецю в } 18,55 \text{ г лейцину.}$$

Біомаса становить 1 г, для отримання якої необхідно 1 г вуглецю, 0,5 г з яких піде на холосте окиснення. Отже, для отримання 1 г/л біомаси та синтезу 18,55 г/л лейцину необхідно вуглецю: $1 + 10,2 = 11,2 \text{ г вуглецю}$. В даному середовищі достатня кількість вуглецю.

Джерелом азоту в даному середовищі виступає $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Розраховуємо вміст азоту:

$M_r(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 132 \text{ г/моль}$. За пропорцією визначаємо скільки азоту міститься в 5 г сульфат амонію:

$$5 \text{ г} - 132 \text{ г/моль}$$

$$x - 14 \times 2$$

$$x = 28 \times 5 / 132 = 1,06 \text{ г азоту в } 5 \text{ г сульфат амонію.}$$

Розраховуємо загальну кількість азоту в цільовому продукті:

Лейцин – $M_r(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2) = 131,17 \text{ г/моль}$. За пропорцією визначаємо скільки азоту міститься в 18,55 г лейцину:

$$18,55 \text{ г} - 131,17 \text{ г/моль}$$

$$x - 14 \times 2$$

$$x = 28 \times 18,55 / 131,17 = 3,96 \text{ г азоту в } 18,55 \text{ г лейцину.}$$

В даному випадку біомаса становить 1 г/л, для отримання якої необхідно 0,1 г азоту (10% азоту в клітині). Отже, для отримання 1 г/л біомаси та синтезу 18,55 г/л лейцину необхідно азоту: $0,1 + 3,96 = 4,06 \text{ г азоту}$. У цій солі не вистачає

достатньої кількості азоту, але в середовищі присутній дріжджовий екстракт, який містить нуклеотиди, амінокислоти та пептиди.

Джерелом фосфору в даному середовищі виступає $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$.

Розраховуємо вміст фосфору:

$M_r (\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}) = 190$ г/моль. За пропорцією визначаємо скільки азоту міститься в 1,5 г дигідроортофосфату калію водневого:

$$1,5 \text{ г} - 190 \text{ г/моль}$$

$$x - 31$$

$x = 31 \times 1,5 / 190 = 0,24$ г фосфору в 1,5 г дигідроортофосфату калію водневого.

Оскільки біомаса 1 г/л, для отримання якої необхідно 0,03 г азоту (3% фосфору в клітині).

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Вид *Corynebacterium glutamicum* є добре вивченою ґрунтовою бактерією і представляє велике значення в галузі біотехнології, зокрема, для ферментативного виробництва L-амінокислот для харчової та кормової промисловості [14].

Синоніми: *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium lactofermentum*, *Brevibacterium chang-fua*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium glutamigenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium saccharolyticum*, *Brevibacterium seonmiso*, *Brevibacterium taipei*, *Micrococcus glutamicus*, *Brevibacterium thiogenitalis*, *Micrococcus maripuniceus* [14].

Вид *C. glutamicum* вперше він був виявлений в Японії і описаний С. Киносита і його співробітниками в 1958 році під назвою *Micrococcus glutamicus*. У 1962 році Окумура та інші назвали його *Brevibacterium flavum*. Пізніше в 1967 Абе і його співробітники перемістили його в жанр *Corynebacterium*. *C. glutamicum* був вперше виявлений в якості продуцента глютамату. Ще в 1950-х роках штами, які накопичують глютамат в культуральному середовищі, були

виділені. Один з них, M534, раніше таксономічески званий «*Micrococcus glutamicus*» і депонований як ATCC 13032 і NCIMB 10025, був позначений як штаб *C. glutamicum*. У 1960-х і в 1970-х роках кілька штабів, що накопичують глутамат, були виділені незалежно, включаючи «*Brevibacterium lactofermentum*» ATCC 13869, «*B. flavum*» ATCC 14067, «*C. acetoacidophilum*» ATCC 13870, «*C. crenatum*» AS1 .542, «*C. pekinense*» AS1.299 і «*B. tianjinese*» T6-13. Згідно з попередніми повідомленнями і нашим недавнім дослідженням, всі ці штаби повинні бути класифіковані як види *C. glutamicum* на основі загальних ідентичних послідовностей 16S рДНК [14].

Бактерія має форму палички з роздутими кінцями в формі молотка або ключки (рис 2.1.). У нього є хромосома і кільцевий плазмодій. Розмір 1-1,5x0,6-0,8 мкм, нерухомі, грампозитивні. Спор не утворюють.



Рис.2.1. Електронна мікрофотографія *C. glutamicum*

Містить каталазу, розкладає вуглеводи через ферментативний обмін. Через 3-5 діб росту при стандартній температурі на МПА утворює колонії діаметром 2-4 мм, жовтувато-кремові, поверхня гладка, форма опукла, край рівний та однорідна структура (рис 2.2.) [15].



Рис.2.2. Колонії *C. glutamicum*

Для вирощування рекомендуються температури 30 °С і рН 7,4 - 7,5. *C. glutamicum* розщеплює вуглеводи в процесі бродіння. *C. glutamicum* може

використовувати багато джерел вуглецю для свого зростання і постачання енергією: моносахариди, такі як глюкоза, фруктоза і рибоза; дисахариди, такі як сахароза, маноза і мальтоза; спирти, такі як інозитол або етанол, і органічні кислоти, такі як піровиноградна кислота, пропіонова кислота, молочна кислота, оцтова кислота і глюконова кислота, а також деякі амінокислоти, такі як L-глутамат і L-глутамін. Виробничі процеси з *C. glutamicum* здійснюються з використанням цукрів, отриманих з крохмалю (глюкоза) або патоки (сахароза і фруктоза) [15].

C. glutamicum не може використати кілька дешевих і, отже, цікавих джерел вуглецю, або тому, що відсутня вся необхідна генетична структура, або відсутній достатній рівень експресії генів. Таким чином, конструювання рекомбінантних штамів з метою використання додаткових джерел вуглецю є важливою частиною метаболічної інженерії цієї бактерії [15].

Через розмаїття наявності поживних речовин і джерел вуглецю, *C. glutamicum* налічує 127 білків, пов'язаних з регулюючою функцією в транскрипції, яка в свою чергу, пов'язана з контролем метаболізму. Із загальної структури *C. glutamicum* слід виділити будову її клітинної стінки, однієї з найбільш унікальних частин. Крім пептидогліканового шару, клітинна стінка складається з короткої ланцюга міколових кислот, поряд з парою інших незвичайних ліпідів (мезодіамінопімелових кислот і арабін-галактанових полімерів) [14].

Хоча більшість бактерій, що належать до сімейства *Corynebacteriaceae*, є патогенними, деякі з них, включаючи *C. Glutamicum* - нешкідливі. Останні, відомі як non-diphtheria corynebacteria (CND), є коменсальними або сапрофітними, які можуть бути присутніми у людей, тварин і ґрунту. Поки біосинтетичний шлях ВСАА характеризується в кишкової палиці, *Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* та інших штамів [14].

Штам *C. glutamicum* FA-1 - це високопродуктивний штам, який використовується для отримання L-лейцину. Штам FA-1 є ауксотрофним для L-ізолейцину, що знижує вплив L-ізолейцину на продукцію L-лейцину.

Розроблений *C. glutamicum* FA-1 для збільшення продукції L-лейцину за рахунок оптимізації амінотрансферази. Вперше AspB (аспартат амінотрансфераза) характеризується активністю синтезу L-лейцину. Згодом ароматичну амінотрансферазу TyrB та передбачувані аспартатні амінотрансферази, продукти гена aspC, yhdR, uwfG були клоновані, експресовані та охарактеризовані для активності синтезу лейцину. Тільки TyrB зміг синтезувати L-лейцин, а продукція L-лейцину становила $18,55 \pm 0,42$ г / л. Два ймовірні гени амінотрансферази з розгалуженим ланцюгом, ybgE та CalvE, також були клоновані та експресовані. Продукти обох генів ефективно функціонують у біосинтезі ВСАА [5].

Штам, що продукує L-лейцин, *C. glutamicum* FA-1 був отриманий із штаму дикого типу *C. glutamicum* ATCC 13032, який був мутанізований біологічною селекційною системою плазми атмосферної та кімнатної температури (ARTP) (Si Qing Yuan Biotechnology Co., ТОВ, Пекін, Китай). Цей штам був резистентним до α -аміномасляної кислоти та α -тіазолілаланіну та ауксотрофний до L-метіоніну та L-ізолейцину. Гени амінотрансферази tyrB та aspC були отримані від *E.coli*, ген aspB був похідний із генів *C.glutamicum*, ybgE, yhdR та uwfG, отриманих від *B.subtilis*, а CalvE - похідним від *C. Acetobutylicum* [5].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Згідно першого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій (фенотипова систематика) [20]:

- Царство: *Procaryotae*
- Відділ: *Firmicutes*
- Клас: *Thallobacteria*
- Порядок: -
- Родина: -
- Рід: *Corynebacterium*
- Вид: *glutamicum*

Згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій (філогенетична класифікація) [21]:

- Домен: *Bacteria*

- Відділ: *Actinobacteria*
- Клас: *Actinomycetales*
- Ряд: *Corynebacterineae*
- Родина: *Corynebacteriaceae*
- Рід: *Corynebacterium*
- Вид: *glutamicum*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Лейцин - одна з незамінних амінокислот, які не синтезуються клітинами тварин і людини і надходять в організм у складі білків їжі. Лейцин входить до складу всіх природних білків. Лейцин відноситься до трьох розгалужених амінокислот. Амінокислоти з розгалуженими боковими ланцюгами (англ. *branched-chain amino acids, BCAA*) - група протеїногенних амінокислот із розгалуженим аліфатичним бічним ланцюгом. До них належать також ізолейцин і валін. Діючи разом, вони захищають м'язові тканини і є джерелами енергії, а також сприяють відновленню кісток, шкіри, м'язів, тому їх прийом часто рекомендують у відновний період після травм і операцій [18].

Основними функціями амінокислоти є участь у забезпеченні азотистої рівноваги, в обміні білків і вуглеводів. Необхідний для побудови і розвитку м'язової тканини, синтезу протеїну організмом, для зміцнення імунної системи. Знижує вміст цукру в крові і сприяє якнайшвидшому загоєнню ран і зрощення кісток. Запобігає перевиробництву серотоніну та наступ втоми, пов'язане з цим процесом [18].

Біологічно активні харчові добавки, що містять лейцин, застосовуються в комплексі з валіном і ізолейцином. Їх слід приймати з обережністю, щоб не викликати гіпоглікемії (рівень глюкози периферичної крові опускається нижче мінімальної межі 3,5 ммоль / л) [18].

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування		
Розробив	Мусієнко М.С.						
Перевірив	Нечипор Ю.Ю.						
Реценз.							
Н.Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		
					Літ.	Арк.	Акрушів
						1	13

Надлишок лейцину може збільшити кількість аміаку в організмі. Нестача лейцину може бути обумовлена незадовільним харчуванням, або нестачею вітаміну В6, також відсутність або нестача лейцину призводить до зупинки росту, падіння маси, порушень обміну речовин, при гострій недостатності до загибелі організму [18].

Один з продуктів розпаду лейцину в організмі - β -окси- β -метилглутарова кислота (у вигляді ацилкофермента А), є важливим проміжним з'єднанням при біосинтезі холестерину і ін. стероїдів. Лейцин разом з глутаміновою кислотою, метіоніном і ін. амінокислотами застосовується для лікування хвороб печінки, анемії, а також при деяких психічних захворюваннях [18].

Ця незамінна амінокислота також бере участь в секреції гормону росту (соматотропного гормону, соматотропіну). Секреція гормону росту особливо висока в період статевого дозрівання. Соматотропін впливає на ріст кісток, хрящів, сухожилів, зв'язок і м'язів, в меншій мірі - вісцеральних органів. Соматотропін гальмує зростання жирової клітковини [18].

Рівень білка плазми крові альбуміну залежить від концентрації ВСАА в крові. Зменшення концентрації лейцину, ізолейцину і валіну призводить до падіння в плазмі рівня альбуміну. Це, в свою чергу, означає, що осмотичний тиск крові падає. Така ситуація може призвести до затримки рідини і набряків. Таким чином, ВСАА підтримують і водний обмін в організмі. Добова потреба людини в лейцині становить 4-6 г [18].

Ще однією анаболічною властивістю лейцину є його здатність стимулювати секрецію інсуліну. Лейцин володіє найбільшим інсуліногенним ефектом в порівнянні з двома іншими амінокислотами ВСАА (ізолейцином і валіном). Інсулін - гормон, безпосередньо бере участь в транспорті глюкози і амінокислот в клітини.

Таким чином, надходження достатньої кількості амінокислот безпосередньо підсилює синтез білка і стимулює ріст клітин. Підвищення рівня інсуліну в плазмі крові зменшує до того ж секрецію катехоламінів і кортизолу, що володіють вираженою катаболічною дією [18].

У період, коли природний шлях поповнення прогресуючих дефіцитів основних поживних речовин виключений або гранично обмежений, особливе значення в комплексі лікувальних заходів має повне парентеральне харчування (ППХ), спрямоване на збереження метаболічного гомеостазу та підтримання функцій життєво важливих органів і систем організму. З цих позицій ППХ можна розглядати як фармакотерапію метаболічних порушень в постагресивному періоді і єдиний шлях забезпечення енергопластичних потреб організму, що вимагають наявності спеціально підібраних композицій поживних речовин [19].

Парентеральне харчування з використанням розчинів амінокислот в медичній практиці застосовується при гіпопротеїнемії різного походження (внаслідок вираженої втрати білка і неможливості та / або різкому обмеженні прийому їжі природним шляхом):

- до і після великих хірургічних втручань, зокрема операцій на шлунково-кишковому тракті, в щелепно-лицевій ділянці;
- при черепно-мозкових травмах;
- при опіковій хворобі;
- тривалі та глибокі непритомні стани;
- тривала діарея, нестримне блювання та ін.

На сьогодні застосування препаратів для парентерального живлення є невід'ємною частиною комплексу лікувальних заходів, так як без застосування нутритивної підтримки не може бути подоланий стрес, викликаний хворобою і операцією. Про це свідчать проведені дослідження, за результатами яких встановлено, що своєчасне призначення препаратів для парентерального живлення хворим у післяопераційний період дозволяє знизити частоту ранових інфекцій на 15-40%, зменшити тривалість штучної вентиляції легенів, скоротити терміни перебування в реанімаційній відділеннях та стаціонарі, знизити післяопераційну летальність на 8-15%, підвищити комфортність перебування в стаціонарі і якість життя пацієнта. Враховуючи актуальність проблеми, метою наших досліджень був аналіз асортименту лікарських засобів для

парентерального живлення, що представлені на вітчизняному фармацевтичному ринку [20].

У зв'язку з тим, що Лейцин лише входить до складу препаратів, а не використовується як самостійний продукт, рахуємо дозу компонента у препараті. Розрахунок дози компонента здійснений таким чином: препарат призначають дорослим внутрішньовенно краплинно зі швидкістю 15-25 крапель на хвилину (45-75 мл на годину). При частковому парентеральному харчуванні добова доза становить 400-800 мл протягом 5 діб, при повному – 400-1200 мл щоденно до відновлення ентерального харчування. Кількість лейцину у 1 мл препараті становить 9,8 мг. Згідно цього, взято середню дозу 800 мл, і пораховано як $9,8 \times 800 = 7840 \text{ мг} = 7,87 \text{ г}$ лейцину на добу.

Основні захворювання та розрахунок річної потреби амінокислоти у рахунку захворювань і кількості хворих в Україні наведено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Вихідні дані та розрахунок річної потреби лейцину

Лікування (не основний препарат)	Доза компонент а на добу (в г) [21]	Тривалість прийому, днів	Кількість компонент а (в г) на 1 людину	Кількість хворих в Україні на 2018 рік	Загальна кількість компонента на рік, кг
Операції на щелепно-лицьовій ділянці	7,87	5-10	59,02	1009212 [22]	59563,7
Операції на шлунково-кишковому тракті (стома)	7,87	5-10	59,02	47 тис. [23]	2773,9
Опікова хвороба	7,87	5-10	59,02	80 тис. [24]	4721,6
Гіпопаратиреоз	7,87	5-10	59,02	224150 [25]	13229,3
Черепно-мозкові травми	7,87	5-10	59,02	179320 [26]	10583,5
Всього 90872 кг					

3.2 Розрахунок потужності виробництва

Потреби фармацевтичного ринку України в лікарських засобах для парентерального харчування до недавнього часу задовольнялися в основному за

рахунок імпортованих препаратів. У зв'язку з цим починаючи з 2000 р. фахівцями ТОВ «Юрія-Фарм» проведено комплекс науково-дослідних робіт і налагоджений випуск лікарського препарату для парентерального харчування, який був зареєстрований в Україні 10.12.2001 р (реєстраційне свідоцтво № Р.12.01 / 04036) під торговою назвою Амінол [20].

Амінол представляю собою збалансовану суміш 13 амінокислот, з яких 8 - незамінні. Амінокислоти при повільному внутрішньовенному введенні добре засвоюються. За умови адекватного забезпечення енергетичних потреб організму амінокислоти включаються в біосинтез білків, сприяють позитивному азотистого балансу і усувають білковий дефіцит. Найважливішим правилом парентерального харчування є створення позитивного балансу азоту в організмі для підтримки необхідної інтенсивності білкового обміну. Амінол також забезпечує виконання основної вимоги, що пред'являється до амінокислотних препаратів для парентерального харчування: обов'язковий вміст незамінних амінокислот, які не синтезуються в організмі людини [20].

Клінічні дослідження препарату проводили з 1 по 20 листопада 2000 року в Головному військовому клінічному госпіталі Міністерства оборони України, в клініці урології та нефрології. Застосування Амінолу у 55 хворих протягом перших 4-5 днів після резекції шлунка або кишечника сприяло поліпшенню загального стану в післяопераційний період, підвищення вмісту білка в плазмі крові на 51,5%, альбуміну - на 49,2%, рівня гемоглобіну в крові - на 7%. Амінол випускається у формі розчину для внутрішньовенного введення в скляних флаконах 100, 200 і 400 мл [20].

Роботу з ввезення зразків в Україні і сертифікації якості фармацевтичних активних субстанцій в органах державного контролю виконали фахівці ЗАТ «МУЛЬТІФАРМА» (м.Київ). Це підприємство також здійснює поставки в Україну вихідної сировини для серійного виробництва Амінолу і є оптовим продавцем препарату [20].

Унаслідок аналізу структури асортименту засобів для парентерального живлення за фірмами-виробниками встановлено, що її основну частку складають препарати іноземного виробництва (рис. 3.1).

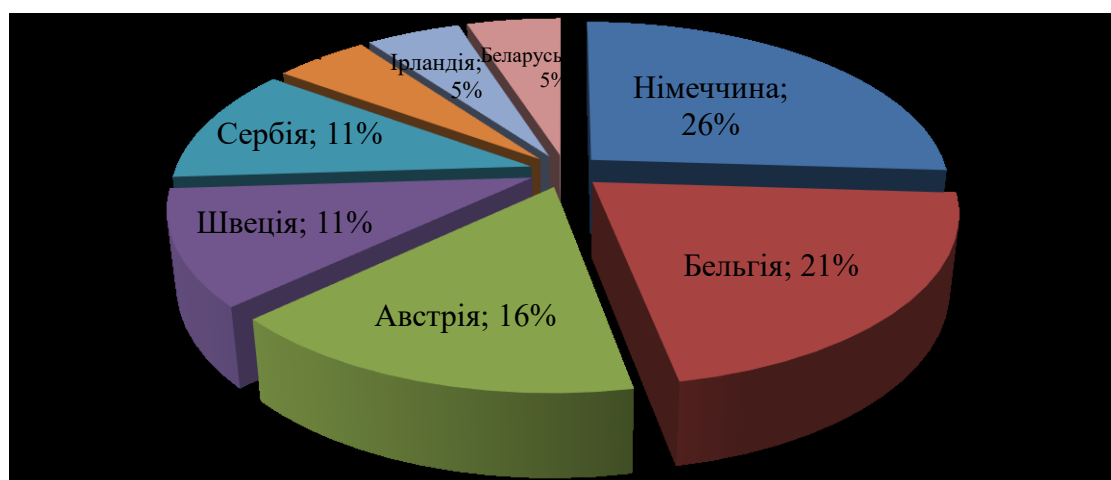


Рис. 3.1. Виробники парентеральних лікарських препаратів, які містять у своєму складі Лейцин, представлені на фармацевтичному ринку України [21]

Як видно з рис. 3.1, закордонні фірми займають 90 % українського фармацевтичного ринку в цій області. Найпопулярніші фірми-виробники серед них: Хемофарм АД, Сербія, Фрезениус Каби ГмбХ, Австрія/Германия, Б. Браун Мельзунген АГ, Германия, Берлин-Хеми АГ, Германия, Бакстер С.А., Бельгія.

Присутні на фармацевтичному виробництві препарати іноземного виробництва мають високу ціну, що в умовах обмеженого фінансування закладів охорони суттєво обмежує їх застосування. Субстанція лейцину на території України не виробляється, тому розробка вітчизняних засобів для парентерального живлення може бути перспективним напрямком та є необхідною умовою для впровадження цільових програм їх імпортозаміщення [20].

За даними ринку України за 2018 р., вітчизняний препарат займає 5 % ринку. Тому при розрахунку річної потреби амінокислоти з урахуванням ринку України було прийнято охоплення ринку в 5% (1 препарат).

Розрахунок потреби амінокислоти з урахуванням тенденцій ринку України наведено у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Розрахунок річної потреби амінокислоти з урахуванням тенденцій ринку України

Захворювання (профілактика)	Кількість препарату (в г) на 1 людину	Кількість хворих в Україні на 2018 рік	Кількість хворих, яка лікуватиметься вітчизняним препаратом (5 %)	Загальна кількість Лейцину на рік при охопленні ринку на 5 %, кг
Операції на щелепно-лицьовій ділянці	59,02	1009212	50460	2978,1
Операції на шлунково- кишковому тракті (стома)	59,02	47 тис.	2350	138,7
Опікова хвороба	59,02	80 тис.	4000	236,1
Гіпопаратиреоз	59,02	224150	11200	661
Черепно-мозкові травми	59,02	179320	8966	529,2
				Всього 4543 кг

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.

Для забезпечення амінокислотою хворого населення України, необхідно отримувати 4543 кг амінокислоти Лейцину в рік.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини необхідно отримати за один цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

З даних статті відомо, що в культуральній рідині після концентрування міститься 18,55 г/л. Така концентрація досягається за $T_{\text{ф}} = 72$ год культивування [5].

Для проведення подальших розрахунків приймемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 72 + 10 = 82 \text{ год},$$

де $T_{\text{ф}}$ – час культивування (72 год); $T_{\text{по}}$ – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год),

стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));

K_1 – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) прийmemo $K_1 = 1,2$. Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{CB} = 0,1$. Мінімально можлива кількість робочих днів - 30; максимальна - 330 днів.

Приймаємо кількість робочих трудоднів 300 ($T_{рд}$). При кількості трудоднів рівному 300, кількість продукту на добу (V_d) становитиме:

$$G_d = \frac{G_{нт}}{T_d} = \frac{4534}{300} = 15,14 \text{ кг/добу}$$

Кількість продукту за цикл:

$$G_{ц} = \frac{G_d \times T_{цф}}{24} = \frac{15,14 \cdot 82}{24} = 51,73 \text{ кг/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один виробничий цикл:

$$V_{кр} = \frac{K_1 \times G_{ц} \times CP_{гп}}{P_{кр} \times (1 - E_{CB})} = \frac{1,2 \cdot 51,73 \cdot 0,95}{18,55 \times (1 - 0,1)} = 3,53 \text{ м}^3$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на 60 днів:

$$N_{ц} = \frac{G_{нт}}{G_{ц}} = \frac{4543}{51,73} = 87,82 \text{ циклів}$$

Приймаємо 88 циклів.

При отриманні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які будуть становити 10%. Таким чином кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\phi} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{3,53}{1 - 0,1} = 3,92 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{ф}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{3,92}{1 + 0,1} = 3,56 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{ф}}$ – доза посівного матеріалу для ферментера (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф1}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{пс1}} = 3,92 - 3,56 = 0,36 \text{ м}^3 = 360 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{\text{зф}} = 0,65$ його приблизний геометричний об'єм складе:

$$V_{\text{гф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{K_{\text{зф}}} = \frac{3,92}{0,65} = 6,03 \text{ м}^3$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{\text{нф}} = 6,3 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{\text{зф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{V_{\text{нф}}} = \frac{3,92}{6,3} = 0,62$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданого значення (0,5-0,7), геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{гф}} = 6,03 \text{ м}^3$. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{нф}} = 6,3 \text{ м}^3$.

Оскільки кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від всього об'єму поживного середовища, необхідно визначити кількість посівного матеріалу для інших стадій.

Для одержання $0,36 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплєвиносу через колектор, що становлять 10%.

Таким чином кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{пмф1}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{0,36 \text{ м}^3}{1 - 0,1} = 0,4 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа1}} = \frac{V_{\text{пс2}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{0,4 \text{ м}^3}{1 + 0,1} = 0,364 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф2}} = V_{\text{пс2}} - V_{\text{пспа1}} = 0,4 - 0,364 = 0,036 \text{ м}^3 \text{ або } 36 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{пс2}} = 0,4 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпа2}} = \frac{V_{\text{пс2}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{0,4}{0,65} = 0,62 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{нпа}} = 0,63 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{пс2}}}{V_{\text{нпа}}} = \frac{0,4}{0,63} = 0,3$$

Для одержання $0,04 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{пмф2}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{0,036 \text{ м}^3}{1 - 0,1} = 0,04 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа2}} = \frac{V_{\text{пс3}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{0,04 \text{ м}^3}{1 + 0,1} = 0,0364 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф3}} = V_{\text{пс3}} - V_{\text{пспа2}} = 0,04 - 0,00364 = 0,03636 \text{ м}^3 \text{ або } 3,6 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{пс3}} = 0,04 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпа3}} = \frac{V_{\text{пс3}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{0,04}{0,65} = 0,062 \text{ м}^3$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 100 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому приймаємо 1 посівний апарат на замовлення на 80 л.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{пс3}}}{V_{\text{нна}}} = \frac{0,04}{80} = 0,5$$

Для одержання 3,6 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{пмф3}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{3,6}{1 - 0,1} = 4 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа3}} = \frac{V_{\text{пс4}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{4}{1 + 0,1} = 3,64 \text{ л}$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф4}} = V_{\text{пс4}} - V_{\text{пспа3}} = 4 - 3,64 = 0,36 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{пс4}} = 4 \text{ л}$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпа4}} = \frac{V_{\text{пс4}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{4}{0,65} = 6,2 \text{ л}$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 10 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому обираємо інокулятор на 8 л.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{пс4}}}{V_{\text{нна}}} = \frac{4}{8} = 0,5$$

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{\text{пм4}} = 0,4 \text{ л}$ можна одержати культивуванням у колбах. Для цього використовують колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 500 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{\text{пск}} = \frac{V_{\text{колб}}}{1 + X_{\text{кол}}} = \frac{0,5}{1 + 0,05} = 0,48 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, л:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{колб}} - V_{\text{пск}} = 0,5 - 0,48 = 0,02 \text{ л} = 20 \text{ мл}$$

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{400}{500 \times 0,2} = 4$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу амінокислоти Лейцину у ферментері об'ємом 6,3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,65 буде проходити у чотири етапи (рис. 3.2)

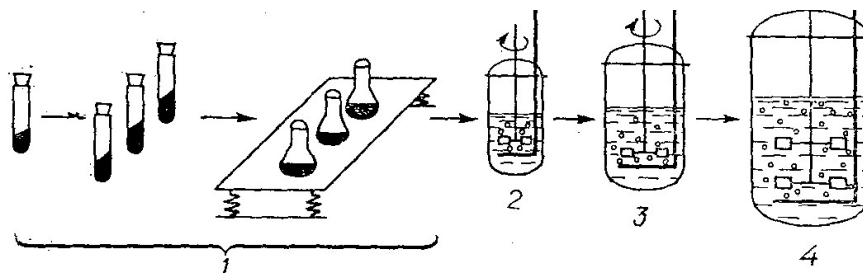


Рис. 3.2. Схема приготування посівного матеріалу:

1 – вирощування в лабораторії (на скошеному агаризованому середовищі в пробірках і на рідкому поживному середовищі в колбах); 2 – вирощування в посівному апараті об'ємом 8 л. ; 3 – вирощування в посівному апараті об'ємом 80 л.; 4 – вирощування в посівному апараті об'ємом 630 л.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Для біосинтезу лейцину ростовим субстратом у поживному середовищі є глюкоза. Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [дод. 3], катаболізм глюкози відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз), про що свідчить наявність ключового ферменту 6-фосфоглюкокінази (КФ.2.7.1.11). Наведено схему перетворення даного вуглеводу (рис. 4.1).

Глюкоза за участю глюкокінази (КФ 2.7.1.2) перетворюється на α -D-глюкозо-6-фосфат, яка за дії глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на β -D-фруктозо-6-фосфат. 6-фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення у β -D-фруктозо-1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозобісфосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β -D-фруктозо-1,6-фосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроацетонфосфат, який під дією тріозофосфат ізомерази (КФ 5.3.1.1) також перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. Далі під дією гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на D-гліцерат-1,3-фосфат, який у свою чергу під дією фосфогліцерат кінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфо-D-гліцерат. Дія 2,3-біфосфогліцерат-залежної фосфогліцерат мутази (КФ 5.4.2.11) на 3-фосфо-D-гліцерат індукує його перетворення на 2-фосфо-D-гліцерат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфо-D-гліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Мусієнко М.С.</i>			<i>РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевірив</i>		<i>Нечипор Ю.Ю.</i>					1	5
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н.Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

Після цього піруват залучається до наступних перетворень, кінцевим продуктом яких є Ацетил-КоА, який надалі йде у цикл трикарбонових кислот [дод 4].

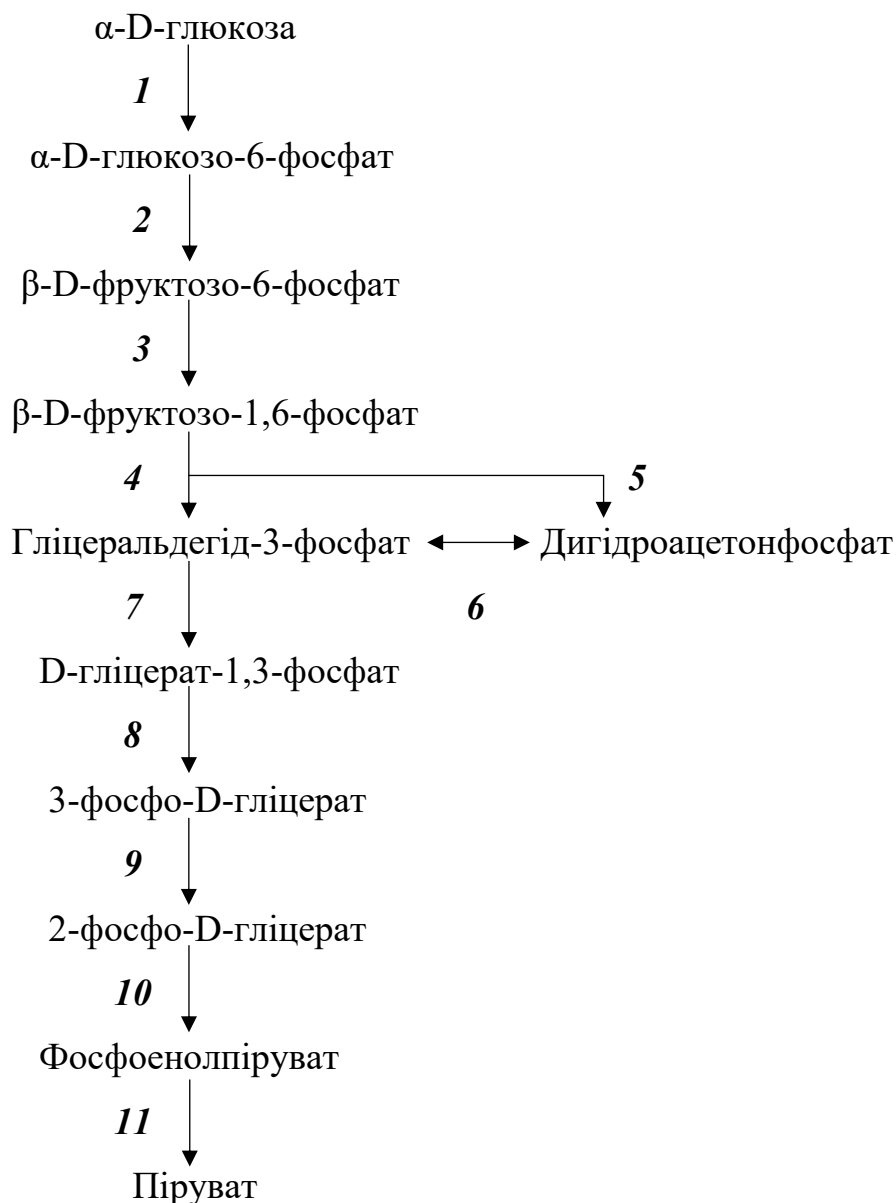


Рис 1. Катаболізм глюкози у *C. glutamicum* FA-1

Ферменти:

1 – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); **2** – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); **3** – 6-фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11); **4** – фруктозобісфосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); **5** – триозофосфат ізомераза (КФ 5.3.1.1); **6** – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); **7** – гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); **8** – фосфогліцераткіназа (КФ

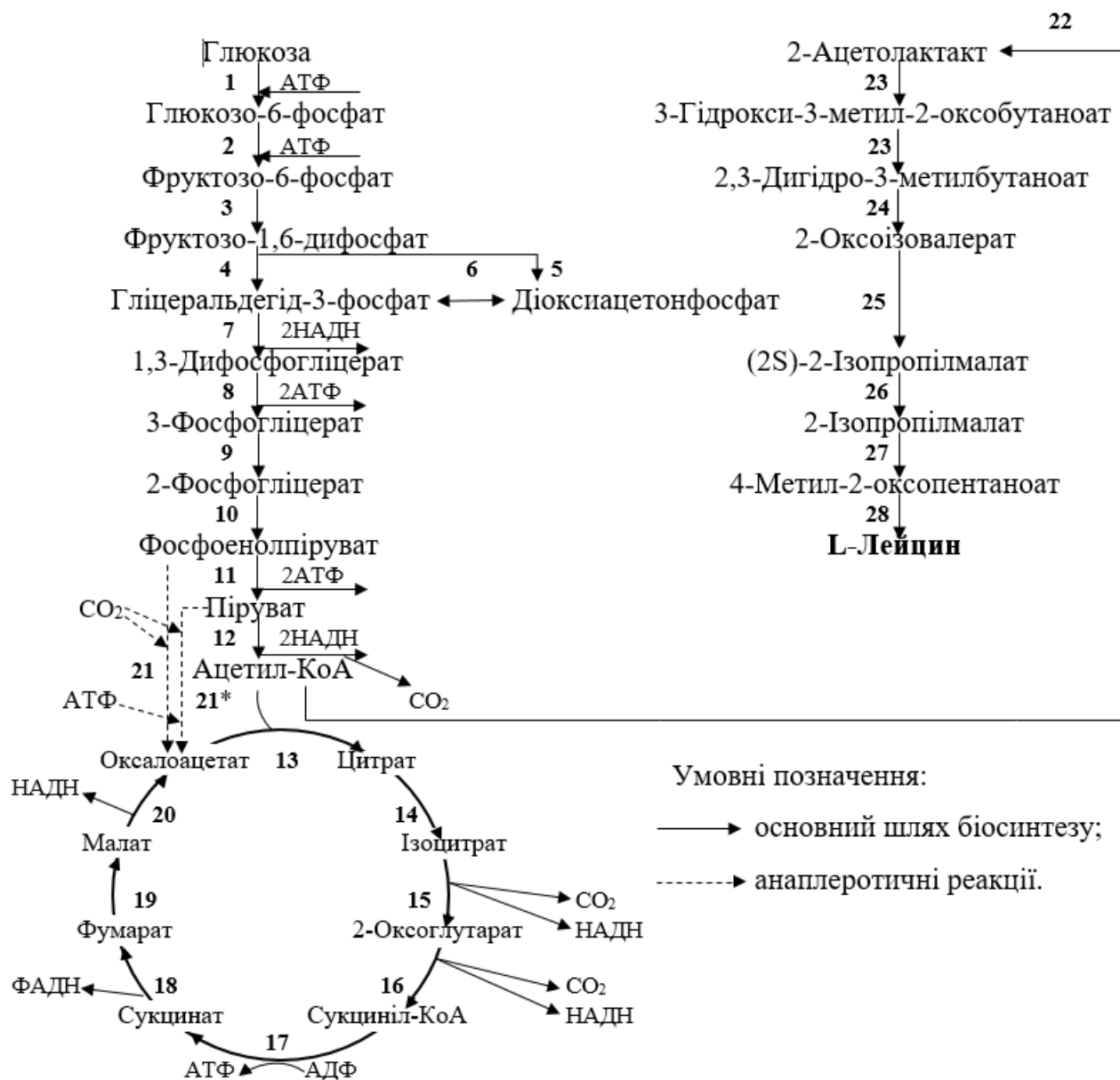
2.7.2.3); **9** – 2,3-біфосфогліцерат-залежна фосфогліцерат мутаза (КФ 5.4.2.11); **10** – енолаза (КФ 4.2.1.11); **11** – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Вихідною сполукою для синтезу лейцину є 2-ацетолактат, який у свою чергу утворюється з Ацетил-КоА під дією ацетолактат синтази великої субодиниці (КФ 2.2.1.6). Далі під дією кетолово-кислотної редуктоізомерази (КФ 1.1.1.86) перетворюється на 3-гідрокси-3-метил-2-оксобутаноат, який у свою чергу під дією кетолово-кислотної редуктоізомерази (КФ 1.1.1.86) перетворюється на 2,3-дигідрокси-3-метилбутаноат. За допомогою дигідроксикислотної дегіддратази (КФ 4.2.1.9) 2,3-дигідрокси-3-метилбутаноат переходить у 2-оксоізовалерат, який під дією 2-ізопропілмалат-синтази (КФ 2.3.3.13) переходить у (2S)-2-ізопропілмалатсинтазу. Далі під дією 3-ізопропілмалатдегідратази великої субодиниці (КФ 4.2.1.33) перетворюється у 2-ізопропілмалат. Після, під дією 3-ізопропілмалатдегідрогенази (КФ 1.1.1.85) 2-ізопропілмалат переходить у 4-метил-2-оксопентаноат. Останнім етапом є перетворення 4-метил-2-оксопентаноат у L-лейцин за допомогою амінотрансферази з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42) [дод].

Для поповнення у клітині запасів оксалоацетату як проміжного продукту біосинтезу функціонують анаплеротичні реакції – карбоксилування пірувату та фосфоенолпірувату за участі ферментів фосфоенолпіруваткарбоксилази (КФ 4.1.1.31) та піруваткарбоксилази (КФ 6.4.1.1).

Схема біосинтезу лейцину *C. glutamicum* FA-1, починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату



ферменти: 1 - глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 - глюкозо-6-фосфатізомереза (КФ 5.3.1.9); 3,6-фосфофруктокіназа 1 (КФ 2.7.1.11); 4, 5 - фруктозобіфосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13); 6 - триозофосфатізомереза (КФ 5.3.1.1); 7 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 - 2,3-біфосфатзалежна фосогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11), фосогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 10 - енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 12 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 13 - цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 14 - аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 15 -

ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 16 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 17 - сукциніл-КоА синтетаза, альфа-субодиниця (КФ 6.2.1.5); 18 - сукцинатдегідрогеназа, цитохром b 556 субодиниця; 19 - фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 20 - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 21 - фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31); 21* - піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1); 22 - ацетолактат синтаза великої субодиниці (КФ 2.2.1.6); 23 - кетолово-кислотна редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86); 24 - дигідроксикислотна дегіддратаза (КФ 4.2.1.9); 25 - 2-ізопропілмалат-синтаза (КФ 2.3.3.13); 26 - 3-ізопропілмалатдегідратаза великої субодиниці (КФ 4.2.1.33); 27- 3-ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.85); 28 - амінотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42).

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Спосіб вирощування повинен бути вибраний виходячи з фізіологічних і біохімічних характеристик продуцента. *S. glutamicum* FA-1 - є аеробним штамом, тому для його культивування необхідно забезпечити подачу аераційного повітря, здійснюваного в ферментері за допомогою барботера, та перемішуючий пристрій для інтенсифікації масообмінних процесів [27].

У біотехнологічній промисловості використовують декілька способів культивування – поверхневий та глибинний. При глибинному культивуванні запаси кисню в поживному середовищі відновлюються шляхом подачі аераційного повітря. Швидкість поглинання кисню збільшується зі збільшенням інтенсивності перемішування. Під час росту біомаси мікроорганізми зазвичай споживають більше кисню, ніж при надмірному синтезі цільового метаболіту. Оптимальним для зростання біомаси є концентрація кисню 50-60% від повного насичення, для біосинтезу цільових метаболітів - 10-20% [27].

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>		<i>Мусієнко М.С.</i>			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми <i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Перевірив</i>		<i>Нечипор Ю.Ю.</i>					
<i>Реценз.</i>							
<i>Н.Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>					
					<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
						1	5

При культивуванні амінокислоти кращим є глибинний метод в ферментерах. Тож вибираємо глибинний, оскільки цей метод має ряд очевидних переваг, а саме: дозволяє зменшити виробничі площі; виключає важку ручну роботу; поліпшує гігієну праці; спрощує механізацію та автоматизацію виробництва. При глибинному методі культивування поживні речовини середовища використовуються більш раціонально, що дозволяє значно зменшити промислові відходи і отримати продукт з меншим вмістом домішок [28].

Поверхневий спосіб має ряд недоліків: конструкція використовуваного обладнання недосконала, невелика механізація технологічних процесів, нераціональне використання часу для проходження всіх чотирьох етапів розвитку [29].

Виробництво лейцину може проходити як безперервно, так і періодично. Періодичний метод культивування мікроорганізмів найбільш часто використовують в промисловості і складається з підготовки компонентів поживних середовищ, їх стерилізації та самого процесу культивування, який починається після одразу посіву стерильною живильного середовища [29]. Також біосинтез лейцину здійснюється в періодичному процесі, оскільки максимальний синтез амінокислот відбувається в стаціонарній фазі росту мікроорганізму-продуцента. При періодичному способі вирощування в ферментер завантажують весь обсяг живильного середовища. Ріст мікроорганізмів здійснюється в оптимальних умовах протягом певного часу, після чого процес зупиняють, зливають вміст ферментера і виділяють цільовий продукт [27].

У режимі безперервного культивування культура постійно перебуває в експоненційній фазі, що не дозволяє отримати максимальну концентрацію в культуральній рідині. Тому тривале перебування продуцента в фазі експоненціального зростання, яке спостерігається при безперервному культивуванні є недоцільним [28].

Бактерії *C. glutamicum* FA-1 є мезофілами, оптимальна температура для культивування становить – 30 °С, а оптимальне значення рН - 7, тож можливий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами. Для запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск.

Отже, культивування штама-продуцента лейцину *C. glutamicum* FA-1 здійснюється в аеробних умовах, глибинним методом у періодичному режимі протягом 72 годин.

5.1.2. Обґрунтування вибору типу ферментеру та мішалки

Головним апаратним елементом будь-якого біотехнологічного процесу культивування є біореактор - ферментер. Біореактори призначені для вирощування мікроорганізмів, накопичення біомаси, синтезу цільового продукту [30].

Обладнання для аеробної глибинної ферментації більш складні як конструктивно, так і з точки зору експлуатації. Основне завдання, що виникає при їх конструюванні, полягає в забезпеченні досить високої інтенсивності масообмінного та енергетичного обміну клітин з навколишнім середовищем. Клітини мікроорганізмів здатні утилізувати O₂ тільки в розчиненому стані, таким чином необхідно постійно підтримувати його концентрацію в культурі на рівні, оптимальному для конкретного виробника. Окрім цього, концентрація клітин і розчиненого субстрату повинна бути рівномірною по всьому об'єму ферментера [30].

Таким чином перемішування також є одним з основних чинників, що забезпечує необхідний гідродинамічний стан в апараті. Однак надмірне перемішування може призвести до механічного пошкодження мікроорганізмів [30].

Також ферментери можна розділити на два типи: без подачі стерильного повітря (для анаеробів) і з його подачею (для аеробів) [30].

Враховуючи фізіолого-біохімічні ознаки штама-продуцента обираємо ферментер і необхідне оснащення для нього. Для культивування *C. glutamicum* FA-1 необхідною є аерація середовища. Тому необхідно

використовувати ферментер, обладнаний барботером. Ферментер повинен бути оснащений мішалкою, щоб забезпечити розчинення кисню у всьому обсязі середовища і інтенсифікувати масоперенос. Для контролю рН середовища ферментер повинен бути оснащений відповідним датчиком, який відображає значення рН.

Біореактори з механічним перемішуванням найчастіше використовуються, через те що вони дозволяють досить легко змінювати технологічні умови і забезпечувати ефективну подачу повітря в клітини, що визначає характер росту мікроорганізмів і їх біосинтетичну здатність [27].

Через те, що в процесі біосинтезу міцелій не утворюється, біомаса не злипалися, метаболіти, які підвищують в'язкість середовища, не накопичуються, а процес не вимагає дуже інтенсивного масопереносу, пропонується використовувати найдешевший і простий перемішувач - лопатевий.

Під час біосинтезу виділяється досить велика кількість тепла завдяки активності мікроорганізмів і завдяки роботі мішалки. Тепло, що виділяється при рості мікроорганізмів, регулюється теплообмінниками різної конструкції. Використання зовнішньої оболонки (рубашки) технологічно сприятливіше, оскільки введення додаткових структур в середу ферментера ускладнює промивку та стерилізацію ферментера. Таким чином для забезпечення постійної температури культивування ферментер оснащується сорочкою та датчиком для контролю температури [27].

5.1.3. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Аероб *C. glutamicum* потребує культивування в аераційних умовах. Відповідно в технологічній схемі необхідно передбачити стадії підготовки аераційного повітря. Головною вимогою, що пред'являється до аеруючого повітря є стерильність, під якою мається на увазі повна відсутність мікрофлори. Через те, що втрати аераційного повітря будуть досить великі, стадії його підготовки доцільно здійснювати в окремих будівлях – компресорних відділеннях.

Культура мікроорганізмів у глибинних умовах вимагає постійної подачі стерильного повітря у ферментер, для аерації культуральної рідини. Повітря яке подається до ферментатора, не тільки доставляє кисень до вирощувальної культури, але й виводить газоподібні продукти метаболізму та тепло, яке виділяється продуцентом під час розвитку [31].

Використовуються методи очищення газом або застосування антисептиків, підвищення або зниження температури, ультрафіолетове випромінювання, іонізуюче випромінювання тощо. Використання цих методів свідчить про їхню ненадійність, оскільки спори та конідії мають досить високу стійкість до високих температур та іонізуючого випромінювання. Повітря, що подається для аерації, повинно бути 99,9999% очищеним від домішок та мікроорганізмів до 1 мкм [32].

Підготовка аераційного повітря складається з таких стадій:

- *збір атмосферного повітря* здійснюється за допомогою вертикальної труби від забору повітря у найвищій точці $H \sim 13$ м (висота даху будівлі = 7,2 м, висота підлоги ~ 8 м разом з похилою покрівлею з будівлі ~ 10 м, витяг повітря повинен проводитись на 2 - 3 м над найвищою точкою) будівлі, де знаходиться обладнання для стиснення та очищення повітря. Всмоктувальне повітря повинно проходити через пристрої, які очищають його від механічних домішок і вологості. Відносна вологість повітря, яка надходить у компресор, не повинна перевищувати 65%. При високій вологості всмоктуваного повітря необхідно забезпечити сушку [33];

- *очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення*. Грубі фільтри призначені для видалення більшості забруднень, які потрапляють в систему після проходження фільтрів і попередньо очищеного компресора, а також продовжують термін експлуатації тонких фільтрів, які виконують основний процес стерилізації при стадії фільтрації. Обираємо фільтр типу картриджа, продуктивність - $550 \text{ м}^3/\text{хв}$. [30]

Можуть бути використані такі фільтруючі матеріали: скловата, скловолокно, бавовна, нетканий волокнистий шар поліетиленових волокон тощо. В якості фільтруючого матеріалу ми вибираємо скляну вату, а у верхні шари

укладаємо бавовну. Склона вата служить передфільтром і запобігає карамелізації бавовни під час стерилізації. Такі фільтруючі матеріали мають досить високу продуктивність, і тому двоступеневе очищення повітря проводиться в одному пристрої. Фільтр грубої очистки стерилізують гарячою (гострою) парою протягом 2 годин при тиску 0,4 МПа. Після стерилізації фільтр сушать стерильним гарячим повітрям [34].

Після проходження повітря через фільтри грубого очищення воно стискається. Стиснення повітря відбувається в компресорі (повітря нагрівається до температури 120 - 200 °С). Після стиснення повітря його охолоджують до температури 25-30 °С, де конденсується волога. Для цього використовують водяний теплообмінник типу «труба в трубі» [31].

Потім конденсовані волога та пари масла, що потрапляють в ресивер з компресора видаляються. Крім цього приймач зменшує пульсації руху повітря, що може негативно вплинути на роботу фільтрів очищення повітря. Цей процес відбувається в ємності з великим об'ємом. Після видалення вологи повітря нагрівається до температури 45-50 °С парою у відповідних теплообмінниках [29];

■ *очищення повітря на фільтрах тонкого очищення.* Для фіксації забруднень, які проходять через інші фільтри, а також усіх можливих забруднень, які потрапляють у систему з випадкових причин, необхідні тонкі фільтри та стерилізація. З структурної точки зору дрібнодисперсні фільтри багато в чому схожі на грубі фільтри, лише набагато менші і використовують більш ефективні фільтруючі матеріали [35].

У мікробіологічній промисловості для очищення та стерилізація повітря застосовують фільтри марки ФТО. Ці фільтри заповнені спеціальною стійкою гідрофобною тканиною, яка повністю очищає повітря від мікроорганізмів. Фільтри випускаються різних типів - від ФТО-60 до ФТО-1000. Цифри вказують на продуктивність повітря в м³/год. Марка фільтра вибирається відповідно до продуктивності ферментатора. Фільтруючий елемент фільтра ФТО-750 має діаметр 360 мм і висоту 600 мм. При навантаженні 750 м³/год опір фільтра

становить 274-294 Па. Фільтри тонкого повітря забезпечують майже 100% очищення та стерилізацію повітря. Їх гарячою (гострою) парою в технологічному зв'язку з фільтром ферментера не виймаючи фільтруючі елементи з корпусу фільтра [35].

- *очищення повітря в індивідуальних фільтрах.* Повітря від фільтрів тонкого очищення через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів, встановлених на ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E=99,9999\%$.

Для очищення повітря використовується мембранний фільтр Microfluor II виробництва фірми CUNO. Випускаються у вигляді фільтропатронів довжиною від 5 до 40 дюймів, мініфільтропатронів довжиною 2,5 і 5 дюймів, а також у вигляді капсулів (готових фільтраційних пристроїв із пластику) висотою 2,5, 5, 10, 20 і 30 дюймів [36]. Перед кожним інокулятором, посівним апаратом та виробничим ферментером встановлюється фільтр, який дозволяє очищати повітря від частинок діаметром 0,2 мкм. Фільтр стерилізують гарячою (гострою) парою в технологічному зв'язку з фільтром ферментера [31].

Очищення відпрацьованого повітря відбувається таким чином: відпрацьоване повітря через колектори подається на аналогічні головні фільтри для очищення та знешкодження.

5.1.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Зважаючи на те, що оптимальними умовами росту продуцента амінокислоти *C. glutamicum* FA-1 є температура 30 °C, процес культивування має проходити в асептичних умовах, щоб мінімізувати ризик контамінації сторонньою мікрофлорою.

Виробництво лейцину здійснюється упродовж 300 днів. Таке виробництво передбачає підготовку даного обладнання: ферментер об'ємом 6,3 м³, посівні апарати об'ємом 630, 80, 8 л, збірники для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, качалки, а також бокс та лабораторне устаткування. Слід врахувати, що ферментер на 6,3м³ та збірник відповідного

об'єму – ємнісні обладнання, яке встановлюється на валах та потребує розміщення обслуговуючого майданчика.

На *рис. 5.1* наведено приблизний план приміщення.

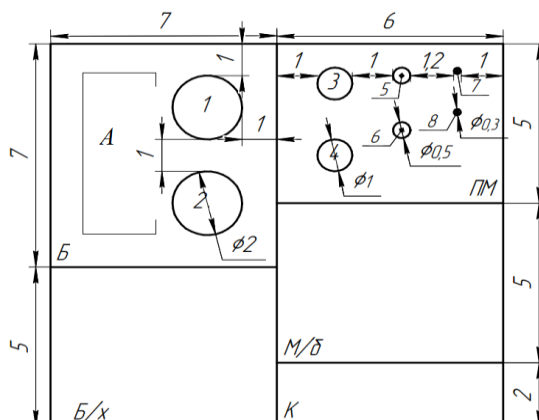


Рис. 5.1. План виробничого приміщення для виробництва амінокислоти лейцину *C. glutamicum* FA-1

Б – цех виробничий біосинтез; *А* – місце для зняття кришки ферментера та збірника при демонтажі обладнання; *ПМ* – цех вирощування посівного матеріалу; *М/б* – мікробіологічна лабораторія; *Б/х* – біохімічна (технологічна) лабораторія; *К* – приміщення з качалками.

Отже, виробництво включатиме наступні цехи: цех виробничого біосинтезу та цех вирощування інокуляту, кімната з колбами на качалках, мікробіологічна лабораторія, де знаходяться холодильники, термостати, бокс, автоклав, сухожарові шафи, та біохімічна (технологічна) лабораторія, яка оснащена апаратурою для проведення різноманітних видів контролю (рН-метр, хроматограф, ФЕК тощо) та ваги для приготування поживних середовищ.

Оптимальна площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить (враховуючи місце на майданчику обслуговування для вивантаження кришки ферментера та збірника) 49 м^2 ($7 \times 7 \text{ м}$), площа стін – $((7 \times 2,5) + (7 \times 2,5)) \times 2 = 70 \text{ м}^2$, загальна площа – $42 + 65 = 119 \text{ м}^2$.

Габаритні розміри основного обладнання наведено у *табл. 5.1*.

Таблиця 5.1

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва амінокислоти лейцину *C. glutamicum* FA-1

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер ¹	6300	3,6	12,96
Реактор-змішувач для ферментеру ² (1), 1 шт	2000	1,5	2,5
Реактор-змішувач для ферментеру ³ (2), 1 шт	2500	1,7	3,1
Посівний апарат ⁴	630	1,2	1,78
Реактор-змішувач для посівного апарата ⁵	160	0,7	1,4
Реактор-змішувач для посівного апарата ⁶	320	1	1,7
Інокулятор ⁷ (1) 1 шт.	40	0,8	1,5
Реактор-змішувач для інокулятора ⁸ (1)	16	0,6	1
Реактор-змішувач для інокулятора ⁹ (2)	30	0,65	1,2
Інокулятор ¹⁰ (2) 1 шт.	8	0,35	1
Всього	12044		

Примітка*. 1-<https://www.morebeer.com/products/speidel-6300l-fddfas-sealed-red-wine-fermenter-pulseair-system-gatestyle-manway-motorized-ejection.html>; 2 <https://promvit.com.ua/reaktor-2000-l/>; 3-<https://promvit.com.ua/rekonstrukciya-reaktora-obemom-2500-litrov/>; 4-<http://labm.ru/index/apparaty-s-petoshchimi-ustroystvami/fermenter-inokulyator-emkostyu-630-l/>; 5-<https://promvit.com.ua/reaktor-160/>; 7-<http://www.agro-mash.ru/bioreaktor.html>; 8-<https://promvit.com.ua/reaktory-30-l-dlya-zhlf-v-ispolnenii-ex/>; 9-<http://donaulab.ru/components/laboratornye-reaktory/>; 10-<https://www.diam.ru/lab/bioreaktory-bakterialnye/infors-labfors-5-bakterialnyj-20-36-75-13-l/>

Виходячи з даних наведених у *таблиці 5.1*, загальний об'єм апаратів та реакторів-змішувачів становитиме 12,044 м³.

Кількість виробничих циклів для синтезу амінокислоти становить 88. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 89 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$12,044 \times 89 = 1072 \text{ м}^3$$

Площа підлоги становить 280 м² (70 м² виробничого приміщення, 55 м² для вирощування інокуляту, 55 м² мікробіологічна лабораторія, 60 м² біохімічна лабораторія та 40 м² приміщення з качалками). Для підтримання асептичних умов необхідна обробка підлоги кожного дня, тобто 300 разів.

Площа підлоги становить 156 м² (49 м² виробничого приміщення, 30 м² для вирощування інокуляту, 30 м² мікробіологічна лабораторія, 35 м² біохімічна лабораторія та 12 м² приміщення з качалками). Миття здійснюється кожного дня. Так як генеральне прибирання здійснюється раз на місяць, під час якого миють та дезінфікують стіни, двері та вікна, то визначаємо, що буде проведено 10 генеральних прибирань. Для санітарно–епідеміологічної обробки повітря і поверхонь приміщень необхідно використовувати бактерицидні лампи.

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва лейцину

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	12,044	89	1072
Підлога	156	300	46800
Стіни, двері, вікна	280	10	2800

Так як кількість трудоднів на виробництві становить більше ніж пів року, необхідно передбачити зміну миючих засобів для уникнення появи резистентності мікроорганізмів. З цією метою схема обробки включає по 3 різних миючо-дезінфікуючих засоби для двох категорій обробки (для інвентарю та приміщень), з різними діючими речовинами.

Для того, щоб обрати миючі та дезінфікуючі засоби, необхідно врахувати їх вартість та витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. На 1 м² затрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікуючого засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Ємнісне обладнання миють автоматичною мийкою СІП-304 AISI, при цьому витрати мийного засобу складають 20% від загального об'єму обладнання. Враховуючи це, для миття обладнання необхідно:

$$1072 \times 0,2 = 214,4,7 \text{ м}^3 \text{ мийного засобу на рік.}$$

Ферментер та збірник на 6,3 м³ тримається на валах та для зручності будується майданчик обслуговування, який також передбачає місце для знятої кришки ферментера та збірника. Цей майданчик також потребує миття 300 днів в рік. Обслуговуюча площа складатиме 49 м² та буде внесена до наступних розрахунків, площа миття майданчика в рік складатиме $49 \times 300 = 14700 \text{ м}^2$. Загальна площа підлоги, стін, дверей та вікон для миття складає:

$$46800 + 2800 + 14700 = 64300 \text{ м}^3$$

Вартість концентратів мийних та дезінфікуючих засобів та їх витрати при виробництві наведено в *табл. 5.3*.

Засоби для миття обладнання та комунікацій.

Миття обладнання, інвентарю від залишків поживних та інших речовин можна проводити каустичною содою, миючим засобом з дезінфікуючим ефектом «Соліклор» та «Полідез».

Каустична сода - відмінний універсальний дезінфікуючий засіб з сильним бактерицидним ефектом, заснований на сильних лужних характеристиках. У вигляді теплового 2-3% розчину (70 °C) він справляється з великою кількістю інфекцій, спричинених бактеріями та вірусами [37].

«Соліклор» - водні розчини мають змочувальні, високомиючі, емульгуючі властивості, видаляють білкові, жирові та механічні забруднення. Не пошкоджуйте дерево, скло, полімерні матеріали, а також посуд, предмети з корозійних металів, гуми та пластмаси; не залишає слідів [38].

«Полідез» - його робочі розчини не викликають корозії та інших шкідливих впливів на матеріали оброблюваних предметів: метали, полімери, скло, гуму, дерево, плитку тощо. Він має дезінфікуючу дію проти грамнегативних та грамнегативних мікроорганізмів, а також проти вірусів, грибової мікрофлори [39].

«Вімол» - поверхнево-активна речовина з дезінфікуючим ефектом. Застосовується проти грампозитивних та грамнегативних вегетативних бактерій, грибів, ліпофільних вірусів. Важливим аспектом є те, що розчин при зберіганні не розкладається. Наявність в складі пом'якшувачів води дозволяє використовувати розчин препарату в районах з підвищеною жорсткістю води. Використовується для миття обладнання, тари та трубопроводів на підприємствах. Зберігають в упакованому вигляді в закритих сухих провітрюваних приміщеннях при температурі від мінус 10 до 40 °С, відносної вологості повітря не більше 85%, захищають від дії сонячних променів [40].

Засоби для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей.

Для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей проаналізуємо такі засоби, як «Біохлор», «Фермісепт», «Гембар».

«Фермісепт» - це універсальний засіб без хлориду чи альдегіду для поточної, остаточної профілактичної дезінфекції та одночасного миття всіх типів поверхонь, для загального очищення. Концентрація робочих розчинів від 0,02% до 5%, має виражені властивості дезодорації, зволоження, емульгування [41].

«Гембар» - засіб для дезінфекції поверхонь, обладнання та посуду. Не містить лугу, альдегіду, фенолу, окислювачів та похідних хлору. Він не агресивний з різними матеріалами (не викликає корозії, не шкодить полімеру та інших матеріалів). Препарат має пролонговану бактерицидну, фунгіцидну та віруцидну дію [42].

«Ексан-про-дез» – м'який лужний очищувач з протимікробною дією обладнання та приміщень у різних галузях харчової та біотехнологічної промисловості [43].

«Біохлор» - дезінфікуючий засіб, який має такі діючі речовини: гіпохлорит натрію (діюча речовина), а також допоміжні речовини (ПАР, антикорозійні, стабілізуючі добавки, ароматизатор). Початковий вміст активного хлору у концентраті засобу 5,0 % – 9,0 %. Водні розчини прозорі безбарвні, мають мийні властивості, не пошкоджують поверхні зі скла, дерева, полімерних матеріалів, кахлю, лінолеуму, фаянсу. Відповідно до вимог ГОСТ 12.1.007 належить до мало

небезпечних речовин (4 клас небезпеки) при введенні в шлунок та при нанесенні на шкіру. Допускається зберігання приготовлених робочих розчинів засобу у прохолодному місці, захищеному від дії прямих сонячних променів, у щільно закритому посуді протягом трьох діб [40].

Тому, проаналізувавши *таблицю 5.3.*, для миття обладнання доцільно використовувати миючий засіб «Вімол», а для миття стін, підлоги, вікон та дверей - «Біохлор», через концентрацію цих розчинів та їх вартість на літр (кілограм), вартість придбання протягом усього періоду виробництва є найнижчою. Кожні 3 місяці дезінфікуючі та миючі засоби необхідно змінювати, для унеможливлення утворення резистентних штамів мікроорганізмів.

Оскільки засоби необхідно змінювати кожні 3 місяці, для миття підлог, стін, дверей та вікон доцільно вибрати миючий засіб та дезінфікуючий засіб тривалої дії, оскільки в цьому випадку зменшується вартість дезінфікуючих засобів. Враховуючи ці переваги, незважаючи на значно більшу ціну, ми обрали рішення «Гембар» для миття виробничих площ. Ефективна концентрація цього миючого засобу становить 0,1 г/л. Для заміни «Вімолу» можна використовувати більш традиційні засоби для біотехнологічного виробництва: каустичну соду.

Таблиця 5.3

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва лейцину

Назва мийного/ дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікуючого засобу, грн.	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода	Обладнання, комунікації	2,0	14700	1470	18,75	0,36	529,2
Соліклор		1,0	14700	1470	315	3,15	1470
Полідез		0,5	14700	1470	240	1,2	1764
Вімол		1,0	14700	1470	19	0,19	279,3
Біохлор	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5	64300	6430	80	0,4	2572
Фермісепт		1,0	64300	6430	300	3	19290
Гембар		0,5	64300	6430	150	0,75	4822,5
Ексан-про-дез		6	64300	6430	42	2,52	16203,6

Примітка. Ціни наведено станом на вересень 2019 р.: <https://prom.>

5.1.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для промислового біосинтезу *C. glutamicum* використовується середовище наступного складу [5] (г/л):

- Глюкоза = 30,0;
- Кукурудзяний екстракт = 25,0;
- CaCO_3 = 20,0;
- Дріжджовий екстракт = 10;
- Цитрат натрія = 10,0;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 5,0;
- Сечовина = 2,0;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ = 1,30;
- Метіонін = 0,40;
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,40;
- $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ = 0,01.

Для забезпечення дієвого процесу підготовки поживних середовищ для посівних апаратів 8 л, 80 л, 630 л та виробничого ферментера 6,3м³ основні та фосфорні солі разом стерилізують разом, таким чином для уникнення утворення осада (нерозчинних фосфатів) доцільним буде довести значення рН до 4-4,5 6%НCl.

Проте, оскільки для вирощування культури рН повинно бути на нейтральному рівні (рН = 7), перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище стабілізують стерильним 6%-вим розчином NaOH.

Приготування і стерилізація 330 мл поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

На цьому етапі вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці необхідним є приготування поживного середовища ($\approx 0,33$ л), яке надалі необхідно стерилізувати в автоклаві. Склад композицій та режими стерилізації:

Композиція А: глюкоза, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, метіонін (режим стерилізації 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 °С);

Композиція Б: цитрат натрію, сульфат амонію, сечовина, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації 131 °С, 40 хв. та тиску 0,15 МПа);

Композиція В: $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації 131 °С, 40 хв. та тиску 0,15 МПа);

Композиція Г: CaCO_3 (режим стерилізації 131 °С, 40 хв. та тиску 0,15 МПа);

Приготування і стерилізація 3,64 л, 36,4 л та 364 л поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Оскільки об'єми поживних середовищ занадто великі для стерилізації в автоклаві, їх потрібно стерилізувати безпосередньо в посівному апараті. Перед кожним посівним апаратом буде розміщено збірник відповідного об'єму для приготування композиції. Стерилізація композицій Б та В відбувається в апараті, оскільки умови стерилізації є жорсткіші ніж для композиції А. Солі розводять в збірнику та подають в посівний апарат, де проходить стерилізація.

Композиція А: глюкоза, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, метіонін (режим стерилізації 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 °С);

Композиція Б: цитрат натрію, сульфат амонію, сечовина, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації 131 °С, 40 хв. та тиску 0,15 МПа);

Композиція В: CaCO_3 (режим стерилізації 131 °С, 40 хв. та тиску 0,15 МПа);

Приготування і стерилізація 3,56 м³ поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері

Об'єм поживного середовища відповідно становить 3,56 м³. Композицію В розчиняємо у збірнику на 2500 л, але стерилізуємо вже у ферментері, попередньо додавши необхідну кількість води, враховуючи конденсат.

Композиція А: глюкоза, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, метіонін (режим стерилізації 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 °С);

Композиція Б: цитрат натрію, сульфат амонію, сечовина, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації 131 °С, 40 хв. та тиску 0,15 МПа);

Композиція В: CaCO_3 (режим стерилізації 131 °С, 40 хв. та тиску 0,15 МПа);

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Особливе місце в біотехнологічному виробництві біологічно активних речовин (БАР) займає виділення з ферментаційних розчинів (ФР). У процесі виділення і очищення БАР з ФР часто доводиться використовувати складні і, як

правило, нестандартні індивідуальні технологічні підходи, що дозволяють отримати цільові продукти високого ступеня чистоти. Згідно з оцінками економістів, собівартість БАР приблизно на 60% визначається витратами на стадіях виділення та очищення з ФР, тому розробка ефективних методів виділення і очищення БАР, що представляють комерційний інтерес, є актуальним завданням [44].

Оскільки амінокислота використовується в якості сировини для лікарського препарату, в цьому випадку отримують ізольовані чисті кристали, які висушують під вакуумом і упаковують [45].

Схема стадій післяферментаційних процесів отримання лейцину включає такі етапи:



5.2.1. Обґрунтування способу відділення клітинної біомаси від культуральної рідини

Першим етапом виділення більшості продуктів мікробіологічного синтезу є відділення біомаси мікроорганізмів продуцентів з культуральної рідини [46].

Амінокислота лейцин накопичується у культуральній рідині [47], тобто є екзометаболітом, тому на першому етапі треба відокремити клітини, які надалі не задіяні в процесі виділення цільового продукту.

1. Фільтрування.

Принцип роботи різних фільтрувальних систем таких як: барабанні, стрічкові фільтри, фільтр-преси, мембранні фільтри, засновані на однаковому принципі – затримки частинок за допомогою пористої фільтрувальної перегородки. Залежно від характеру робочого процесу виділяють фільтри періодичної і безперервної дії. Вони можуть працювати як під вакуумом, так і при надлишковому тиску.

Для фільтрів безперервної дії підведення суспензії, рідини або культуральної рідини і відведення фільтрату відбувається безперервно/автоматично. У фільтрах періодичної дії ці стадії потребують втручання пов'язані з зупинкою процесу і ручним відвантаженням фільтрату.

Перевагами такого методу є:

- простота використання;
- невеликі капітальні та експлуатаційні витрати;
- можливість автоматизації процесу;

Недоліком таких способів є явище налипання фільтруючої речовини на фільтри, та забивання пор фільтруючого елемента колоїдними частинками, це знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування, збільшує енерговитрати на підтримання процесу та необхідність в разі періодичного використання в ручному відвантаженні осаду та заміні фільтруючих елементів [48].

Проаналізувавши принцип фільтраційних установок можна зробити висновок, що використання даного методу не буде доцільним, та приймаючи до уваги великі об'єми виробництва використання буде недоцільно вигідним, як в економічному плані так і в плані затрат на час.

2. Сепарування.

Сепарація або відділення, сепарація в техніці, процеси розділення сумішей різнорідних часток твердих матеріалів, сумішей рідин різної щільності, емульсій;

суспензій твердих часток або крапельок в газі або парі. При сепарації компоненти, що розділяються, не змінюють свого хімічного складу [49].

Сепарування має такі переваги перед фільтруванням та іншими методами [49]:

- Немає потреби в застосування фільтраційних елементів, що дає змогу непотрібну для подальшої переробки фракцію використовувати як кормову добавку;
- Процес легше піддається автоматизації, агрегати займають менше місця, легше мити устаткування.

Використання даного методу буде недоцільним оскільки такий метод дає великі втрати самої сировини, також він не призначений для відділення клітин які є малими за розміром (0,5 мкм-1,5), тому процес розділення попросту не буде відбуватися належним чином.

3. Центрифугування.

Залежно від організації процесу центрифуги бувають періодичної дії і безперервної дії. Якщо розділяти центрифуги за призначенням, то можна виділити фільтруючі і осаджуючі центрифуги. Також існують надцентрифуги, які є апаратами тільки відстійного типу і поділяються на трубчасті надцентрифуги, які використовуються для розділення тонкодисперсних суспензій, і рідинні сепаратори, які використовуються для розділення емульсій. У стандартних центрифуг число обертів не перевищує 10 000об/хв, в свою чергу у надцентрифуг це число перевищує 10 000об/хв.

Фільтруючі центрифуги оснащуються барабанами, покритими зсередини, як правило, тканиною або інший фільтруючою перегородкою. Даний тип центрифуг використовується для розділення суспензій, які мають зернисту або тверду кристалічну фазу [45].

Осаджуючі центрифуги теж оснащені суцільним барабаном. Даний тип центрифуг найчастіше використовується для поділу середньо і дрібнозернистих суспензій, що важко фільтруються, коли допустимо високий вміст рідкої фази в отриманому осаді, і коли використання фільтруючих поверхонь неможливо [50].

Переваги центрифуги перед фільтрами: більш висока інтенсивність процесу за рахунок більшої рушійної сили, відсутність допоміжного обладнання (компресор, вакуум-насос), більш широкі можливості механізації і автоматизації процесу.

Недоліки: складність конструкції, високі вимоги до точності виготовлення вузлів, підвищена витрата енергії на привід, висока вартість [51].

Проаналізувавши вище сказане можна зробити висновки, що центрифуги осаджуючого типу, а саме центрифуга осаджувальна з ножовим вивантаженням осаду типу ОГН-903К-02, дасть змогу швидко та якісно відділити клітини бактерій від культуральної рідини. Перевагою даних центрифуг є простота конструкції, автоматичне керування, можливість обробки суспензій в широкому діапазоні концентрацій твердої фази і розмірів частинок.

5.2.2. Обґрунтування очищення і концентрування розчинів

ФР лейцину, крім цільового продукту, містить також супутні амінокислоти, пофарбовані компоненти, мінеральні солі і т.д. Якщо очищення лейцину від забарвлених компонентів, мінеральних солей і деяких супутніх амінокислот не представляє складності, то очищення від валіну, котрий також продукується у процесі культивування, хоч і у зовсім не великих кількостях, який за фізико-хімічними показниками схожий з лейцином, пов'язане з труднощами [44].

Виділення та очищення цільового продукту з культуральної рідини (КР) можуть здійснюватись шляхом осадження, екстракції, кристалізації або різних методів сорбції. Більш сучасні методи розділення речовин включають хроматографію [52]. Для амінокислот в біотехнології найчастіше використовують як метод виділення цільового продукту сорбцію, хроматографію та/або кристалізацію [47].

Існує спосіб виділення лейцину з КР використовуючи екстракційний метод з використанням рідкого сульфокатіоніта (розчин дінонілнафталінсульфокислоти в гептані). Необхідно відзначити, що роботи по вилученню лейцину з перміатів КР з використанням рідкого сульфокатіоніта, показали неможливість відділення лейцину від супутніх амінокислот на стадії екстракції. При використанні рідких

катіонітів виникає необхідність регенерації органічного розчинника і для реекстракції амінокислот з катіоніту доводиться використовувати водний розчин аміаку високої концентрації (8-10%) [53].

Також відомий ще один метод виділення та очищення лейцину. Цей метод описаний для амінокислоти валіну, але оскільки ці амінокислоти дуже схожі за складом та, як зазначалося раніше за фізико-мімічними показниками, відносяться до одного типу ВСАА (амінокислоти з розгалуженими бічними ланцюгами), та представляють собою неполярні гідрофобні сполуки, цей описаний метод можна залучити до амінокислоти лейцину [44].

Суть методу полягає в відділенні біомаси центрифугуванням, після цього відбувається підкислення фугата сполукою H_2SO_4 до $\text{pH} = 1.6-2.0$, в результаті чого утворюється дикатіон амінокислоти. Після хемосорбції на катіоніті (КУ-2х8), використовуваному в H^+ - формі, відокремлюються домішки нейтральної та кислотної природи. Амінокислоти елюють з катіоніту 0,5-5%-ю аміачною водою (гідроксиду амонію) [44].

Іонообмінна сорбція – один із методів розділення, заснований на оборотному стехіометричному еквівалентному обміні іонів, які містяться в електроліті, і рухомих іонів, присутніх в сорбенті. Сорбенти, які здатні до такого обміну іонів, називаються іонітами або іонообмінниками. Розділення суміші іонів, які містяться у розчині, засновано на неоднаковій здатності їх до обміну з іонами іонообмінника, і відбувається за рахунок різних швидкостей переміщення компонентів по колонці у відповідності з їх значеннями коефіцієнтів розподілу [54].

Іонообмінна сорбція доцільна при поділі високополярних речовин, які без переходу в похідні не можуть бути проаналізовані методом ГРХ (газово-рідинна хроматографія). До таких сполук відносяться амінокислоти, пептиди, гетероциклічні сполуки, вуглеводи [55].

Сорбція, у якій колонка наповнюється гранулами адсорбенту, які несуть заряджені катіонні (NH_4) або аніонні (SO_4) групи, здатні захоплювати іони протилежного заряду. Даний метод використовується для виділення іонізованих

речовин з рідини, а також для очищення нейтральних сполук від домішок іонної природи [55].

Залежно від знаку розряду функціональних груп іонообмінні смоли є катіонітами або аніонітами. Катіоніти містять функціональні кислотні групи $[-\text{SO}_3^-; -\text{COO}^-; -\text{PO}_3^-; -\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2^-)_2]$. Функціональними групами каркаса аніонітів є четвертинні $-\text{NR}_3^+$, третинні $-\text{NR}_2\text{H}^+$ або первинні $-\text{NH}_3^+$ амонієві, піридинові або інші сполуки [55].

Властивостями іонітів володіє велика кількість різноманітних природних і синтетичних речовин. Найважливішими з них є синтетичні смоли, вугілля і деякі мінеральні речовини. Окремі їх види володіють різноманітними властивостями, що обумовлює широкі можливості застосування іонітів в найрізноманітніших галузях практики [55].

Найбільше практичне значення мають синтетичні органічні іоніти. Їх отримують шляхом полімеризації або поліконденсації мономерів. Найбільш зручними в роботі виявились іоніти, що отримані на основі співполімеризації стиролу та дивінілбензену. Зазвичай вміст дивінілбензену, що виконує функцію зшиваючого агента, складає 8–10%. Такі смоли в меншій мірі змінюють свій об'єм під час набрякання. Масову частку дивінілбензену в полімеризаційній суміші часто застосовують для визначення відсотка поперечних зв'язків у смолі. Сильнокислотний катіоніт КУ-2×8 має 8% дивінілбензену. Іоніти на основі синтетичних смол, а також інші іоніти класифікують за здатністю обміну їх гідроген-іонів (для катіонітів в Н-формі) і гідроксид-іонів (для аніонітів в ОН-формі) на інші іони з розчину при різноманітних значеннях рН. Згідно цієї класифікації розрізняють чотири типи іонітів, як для катіонітів, так і для аніонітів [55].

I тип – іоніти, які виявляють властивості сильних кислот або сильних основ. Катіоніти цього типу характеризуються легкістю витіснення з них гідроген-іонів іншими катіонами розчину і залежністю обмінної ємності від рН в дуже вузькій області. Обмінна ємність такого типу катіонітів швидко зростає з ростом рН розчину і вже при малих значеннях рН, досягаючи граничної величини,

залишається постійною при подальшому збільшенні значень рН. Функціональними групами в катіонітах I типу є сульфогрупи $-\text{SO}_3\text{H}$, які введені в ароматичне кільце полімеру. Катіоніти I типу називають *сильнокислотними* або *універсальними*. Аніоніти I типу легко обмінюють гідроксид-іони на аніони з розчину, їх обмінна ємність також залежить від рОН розчину, як обмінна ємність катіонітів від рН. Аніоніти цього типу містять четвертинні аміни ($\equiv\text{N}^+\text{OH}^-$), які легко дисоціюють на гідроксид-іони та іони $\equiv\text{N}^+$, які входять в каркас іоніту. Аніоніти I типу називають *високоосновними*. Сильнокислотні аніонообмінники можна застосовувати в діапазоні рН від 0 до 14.

II тип – іоніти, які проявляють властивості слабких кислот або основ. Для катіонітів цього типу характерно, що при малих значеннях рН розчину більшість катіонів не витискує з них гідроген-іони, тому що дисоціація слабкокислотних груп пригнічується в сильноокислих розчинах. Фіксуючими групами катіонітів II типу є групи, характерні для слабких кислот: $-\text{COOH}$ карбоксигрупа, $-\text{SiO}_3\text{H}$ силікатна група, $-\text{OH}$ фенольна група та інші.

III тип – іоніти змішаного типу, які проявляють властивості суміші сильної і слабкої кислот або, відповідно, основ. Іоніти цього типу володіють двома граничними значеннями обмінної ємності в залежності від рН або рОН розчину. Для катіонітів перша величина граничної обмінної ємності пов'язана з присутністю в їх складі сильно кислотних груп, а інша обумовлена наявністю слабкокислотного фіксуючого іону.

IV тип – іоніти, обмінна ємність яких з ростом рН безперервно збільшується. Іоніти, які відносяться до цього типу, поведуть себе подібно суміші багатьох кислот або основ різноманітної сили. Для іонітів цього типу іноді неможливо знайти граничне значення обмінної ємності. Типовим прикладом іонітів IV типу можуть бути ґрунт, глини, глауконіт [55]

Проаналізувавши вище наведене можна зробити висновок, що для очищення лейцину на іонообмінній хроматографічній колонці доцільно буде використовувати синтетичні смоли першого типу, оскільки вони є найбільш універсальними. Це може бути сильнокислотний катіоніт КУ-2х8, має структуру

гелю, містить тільки один тип іонообмінних груп – сульфогрупу. Катіоніт отримують сульфуванням співполімеру стиролу у вигляді гранул з 8% дивінілбензену (ДВБ). Катіоніт відрізняється високою хімічною стійкістю в розбавлених розчинах лугів і кислот, органічних розчинниках і деяких окисниках.

Надалі елюат піддають вакуум-випарюванню для отримання вмісту сухих речовин 48-50%, тобто його концентруванню [44]. Процес випарювання під вакуумом, має суттєві переваги: температура кипіння розчину знижується, відбирається цінна вторинна пара, пар для низького тиску може використовуватися для нагрівання випарника. У зв'язку зі зниженням температури кипіння рідини середня різниця температур між нагрівальною парою та рідиною збільшується, нагрівається, що призводить до зменшення необхідного розміру апарату випаровування [56].

У фармацевтичному виробництві застосовується вакуум - випарний апарат із центральною циркуляційною трубою й природною циркуляцією розчину при

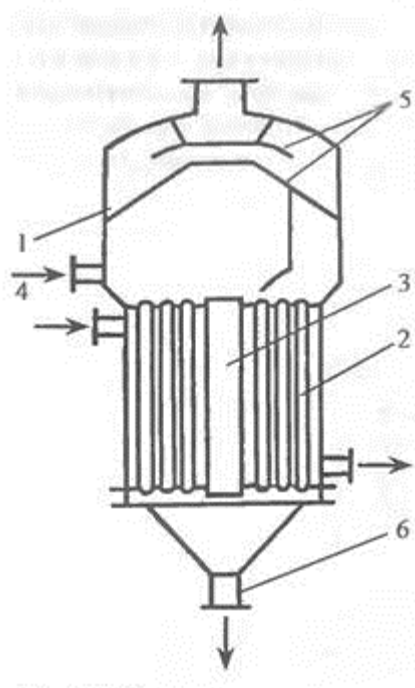


Рис. 5.2.1. Вакуум-випарний апарат із центральною циркуляційною трубою

випарюванні (рис. 5.2.1). У нижній частині апарата розміщена камера нагріву, в центрі якої розташована циркуляційна труба (3) великого діаметра (500 мм). Нагрітий пар надходить у простір між трубками й обігріває рідину, що подається зі штуцера (4). У результаті кипіння рідини в трубках утворюється паро-рідинна емульсія, щільність якої менша від щільності рідини, що нагрівається. У циркуляційній трубі теж проходить випарювання рідини, але щільність паро-рідинної емульсії більша від щільності емульсії в кип'ятильних трубках, внаслідок чого в апараті відбувається впорядкований рух рідини (у циркуляційній трубі — зверху вниз, у вузьких трубках — знизу вгору), тобто природна циркуляція.

Відділення крапель рідини від вторинного пару відбувається у сепараторі (1) при русі його через систему відбійників (5):

вторинний пар при цьому потрапляє у конденсатор (2). Упарений розчин зливається в збірник через штуцер (6) [56].

З огляду на те, що форми кристалів лейцину пластинчасті і такі кристали мають велику поверхневу активність, то прямою кристалізацією важко здійснювати їх поділ. Якщо кристалізацію лейцину здійснювати в солянокислому середовищі, то за рахунок зміни форми кристалів відділення лейцину від валіну та інших супутніх амінокислот стає можливим [53].

Основними перевагами кристалізації є більш дешеве обладнання, простота його використання та експлуатації, можливість використання для великих об'ємів. Оскільки лейцин буде використовуватися в фармацевтичній промисловості, необхідно буде отримати високу чистоту продукту (99,99%). Кристалізація дасть змогу отримати кристали лейцину [52].

Формування і зростання кристалів доцільно здійснювати при температурі масової кристалізації з витримкою розчину в ізотермічних умовах протягом періоду кристалоутворення. Для скорочення тривалості кристалізації необхідно швидше охолодити розчин до стану пересичення, при якому настає масова кристалізація, а рівномірне перемішування і ізотермічні умови сприятливі для формування і росту кристалів [53]. Спочатку підкислюють концентрат 6% розчином HCl до рН = 6,0-6,1 оскільки ізоелектрична точка лейцину $pI=6,04$, (як зазначалося у розділі 1), а далі концентрат кристалізують при 5-12 °С, отримуючи кристали лейцину [57].

Для отримання препарату більш високого ступеня чистоти в схему очищення включають стадію знебарвлення кристалів, а саме обробки розчину активним вугіллям марки ОУ-А [58]. Надалі нейтралізуємо знебарвлені кристали до рН 6,0. Для легкого відмивання утвореної неорганічної солі від кристалів лейцину, що випали, нейтралізацію розчину гідрохлориду лейцину потрібно здійснювати концентрованим розчином аміачної води [53].

У фармацевтичній промисловості кристалізацією виділяють тверді речовини з їх розчинів, розділяють суміші речовин на фракції та очищають їх від домішок [59].

Існує велика різноманітність класифікаційних характеристик, що пояснюється великою кількістю конструкцій кристалізаторів, які враховують специфічні характеристики технології та властивості отриманих кристалічних речовин.

У промисловості використовують кристалізатори, які застосовують атмосферне повітря як теплоносії. Виникаючі бульбашки повітря утворюють висхідний потік газорідинної суміші і водночас охолоджуючи розчин, кристалічна суспензія впадає в корпус через отвори у верхній частині циркуляційної трубки. Кристали трохи збільшуються, коли вони рухаються вниз, кристалічна суспензія скидається через сопло для поділу [59].

Недоліком цього пристрою є утворення пінопластового шару на розчині та заростання сольовою насадкою, яка розподіляє подане холодне повітря.

Для отримання кристалічних речовин, розчинність яких має коефіцієнт розчинності при низькій температурі, широко використовуються кристалізатори типу випарника, що працюють переважно при атмосферному тиску або під вакуумом. Вакуумні кристалізатори мають більшу перевагу перед атмосферними, оскільки вони дозволяють здійснювати процес при низьких температурах в інтервалі температур 15-60 °C. Мінус полягає в тому, що такі кристалізатори споживають більше енергії, ніж пристрої, що працюють при атмосферному тиску, але працюють стабільніше і забезпечують тривалий проміжок між мийниками з високою якістю продукту [59].

У охолоджуючих кристалізаторах тепло з розчину в основному відводиться через перегородкову стінку до холодного теплоносія, який використовує технічну воду або попередньо охолоджений в охолоджуючих сольових солях. Використання охолодженого розсолу дозволяє охолодити розчин до більш низьких температур і тим самим більш повно перетворити розчинний розчин у кристалічну фазу. В установках періодичної дії широко застосовують ємнісні кристалізатори із охолоджувальною сорочкою і мішалкою (рис. 5.2.2).

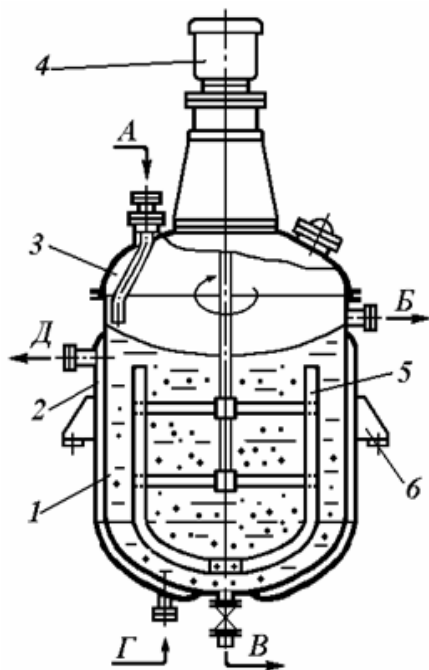


Рис.5.2.2. Кристалізатор із охолоджувальною сорочкою і мішалкою

мішалку, вивантажують кристалічну суспензію і направляють в центрифугу. Після промивання та підготовки до роботи нова частина розчину завантажується в апарат і процес повторюється [59].

Недоліком таких пристроїв є низький коефіцієнт тепловіддачі (як правило, 30 - 50 Вт / (м² · К), можливість утворення відкладень (накипу) солей на стінках, а також необхідність періодичного очищення [59].

Проаналізувавши вище описане можна зробити висновок, що для кристалізації лейцину буде доцільно використовувати кристалізатор охолоджуючого типу, оскільки він має ряд переваг перед іншими кристалізаторами: не потребують високих економічних затрат, працює більш стійко і забезпечує високу якість одержуваного продукту, а також буде оптимальним при даному об'ємі виробництва.

Найчастіше кристали відділяють на вакуум-фільтрах або центрифугах. Як правило, центрифуги забезпечують краще відділення розчину, ніж барабанні вакуум-фільтри. Наприклад залишковий зміст рідкої фази в осаді, отриманому на

В результаті теплообміну через стінку розчин охолоджується і в ньому утворюються кристали, які утримуються в підвішеному стані при перемішуванні розчину мішалкою. Зазвичай застосовуються якірні змішувачі зі швидкістю 0,2-0,5 рад / с, що виключає подрібнення кристалів. Якщо необхідно збільшити розмір кристалів, в кінці процесу охолодження можна періодично подавати апарат свіжим розчином, при цьому частина маточного розчину виводиться через трубу. Після досягнення кінцевої заданої температури охолодження розчину (яка, як правило, на 10-15 °С вище, ніж початкова температура теплоносія), припиняють подачу теплоносія. Не зупиняючи

вакуум фільтрі, становить зазвичай 20-30%, а в осаді, отриманому на центрифугі, 3-10%. Тому при відділенні кристалів зазвичай встановлюють центрифуги [60].

В кінці кристали піддають вакуум-сушінню.

5.2.3. Обґрунтування процесу сушіння амінокислоти

Сушка - це процес видалення рідини (зазвичай води) випаровуванням твердих або пастоподібних матеріалів, а також суспензій, емульсій та розчинів. В даний час з відомих сушарок, розроблених для мікробіології, знайшли застосування вакуумні сушарки та стрічкові сушарки. Способи сушіння та конструкція сушарки багато в чому визначаються режимами сушіння певного матеріалу, забезпечуючи високоякісний сухий продукт з найменшими інвестиціями та енерговитратами. Особливо це стосується продуктів мікробного синтезу, оптимальних режимів і методів сушіння, які можна визначити після вивчення не тільки фізико-хімічних та теплофізичних характеристик, але й біологічних властивостей. [61].

Вакуумні сушарки.

Сушарка працює в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної форми та закривається герметично. Вакуумна сушка відрізняється тим, що необхідність використання консервантів, ароматизаторів, барвників зникає. Відповідно, скорочуються матеріальні витрати на закупівлю виробничого сировини, а також істотно скорочується час сушильного процесу. Вакуумна сушка дозволяє скоротити в обсязі частки харчового або хімічного порошку, що не приводить до руйнування їх структури і використання додаткових «маскують» речовин.

Перевагою вакуумних сушарок є можливість сушіння матеріалів при невисоких температурах, менша витрата тепла, можливість уловлювання пари цінних компонентів (наприклад, пари спиртів та органічних рідин), кращі санітарні та безпечні умови роботи обслуговуючого персоналу [62].

Стрічкові сушарки.

Основною частиною стрічкової сушарки є горизонтальна нескінченна стрічка, яка рухається в камері. Матеріал поступає з одного кінця стрічки і

скидається з іншого її кінця. Дійшовши до кінця стрічки, він висипається на стрічку, що знаходиться нижче і починає рухатися в протилежному напрямі. Такий рух здійснюється багато разів, поки матеріал не досягне вихідного отвору. Стрічкові багатоярусні сушарки застосовуються для сушки сипких і кристалічних продуктів, не вимагають ручної праці на завантаження і вивантаження продукту, досить компактні. Дані сушарки можна застосовувати як для великих так і для малих обсягів продукції. Прості в експлуатації [63].

До недоліків стрічкових сушарок належать: висока вартість, дуже жорсткі вимоги до однорідності матеріалу по фракційному складу і початковій вологості, складна в обслуговуванні (через перекося і розтягування стрічок), має велику кількість рухомих частин, питома продуктивність невисока, а питома витрата тепла досить висока [63].

З наведених вище даних можна зробити висновок, що для висушування лейцину доцільніше застосовувати вакуум-сушку, оскільки цьому типу сушарок притаманна [62]:

- енергоємність;
- можливість сушіння матеріалів при невисоких температурах;
- кращі санітарні та безпечні умови роботи обслуговуючого персоналу;
- можна використовувати для багатотоннажних виробництв.

На виході після сушіння отримуємо товарну форму субстанції у вигляді порошку.

5.2.4. Обґрунтування товарної форми та упаковки

Кінцевим продуктом у даному виробництві є амінокислота Лейцин, що в свою чергу є субстанцією для подальшого застосування у фармацевтичному підприємстві. У ході роботи було вирішено орієнтувати виробництво сировини на препарат парентерального харчування з використання розчинів амінокислот, який застосовується у медичній практиці при гіпопротеїнемії різного походження.

Рідкі лікарські форми – це лікарські форми для внутрішнього, зовнішнього застосування, для ін'єкцій, до складу яких входить значна кількість рідини. Недоліками такої форми випуску саме для субстанції є [64]:

1) Менша стійкість при зберіганні, в порівнянні з твердими лікарськими формами. Термін зберігання водних витяжок 2 дні.

2) Речовини в розчиненому вигляді легше піддаються гідролізу, окисленню, ніж тверді.

3) Деякі розчини служать сприятливим середовищем для розвитку мікроорганізмів (розчини крохмалю, желатину).

4) Незручність транспортування.

Порошок - тверда лікарська форма для внутрішнього або зовнішнього застосування, що складається з одного або декількох подрібнених речовин і володіє властивістю сипучості. Це всебічно вільні дисперсні системи без дисперсійного середовища з дисперсійним фазою у вигляді дрібних твердих частинок різної форми. Переваги порошків [65]:

- 1) Збільшення терапевтичного ефекту і біологічної доступності;
- 2) Зручно отримувати різні суміші;
- 3) Можливість внутрішньо-аптечної заготовки та використання напівфабрикатів в технологічному процесі;
- 4) Технологія порошків швидка і проста;
- 5) велика стійкість при зберіганні в порівнянні з рідкими формами;
- 6) зручне транспортування.

Отже товарна форма у вигляді порошку, зважаючи на переваги та недоліки двох варіантів, підходить більше для виробництва інфузійного розчину.

Вибір матеріалу упаковки визначається вимогами до її фізичних, хімічних, гігієнічних, біологічних і інших властивостей, обумовленими особливостями товару. Тара/упаковка, пакувальні матеріали не повинні містити канцерогенні та токсичні речовини, сторонній запах, який абсорбується ЛЗ; не повинні адсорбувати інгредієнти ЛЗ, які мають здатність проникати в упаковку. Стабільність форми визначається як властивостями матеріалів, так і особливостями конструкції. Герметична - відрізняється конструкцією, яка забезпечує непроникність для газів і рідин [66].

Папір і картон є найбільш розповсюдженими пакувальними матеріалами. Головні їх переваги у порівнянні з іншими пакувальними матеріалами - низька вартість і екологічна чистота, але вони є не герметичними та нестабільними упаковками. Пластмаси відрізняються хорошими механічними характеристиками, універсальністю та невисокою вартістю. Скло є хімічно нейтральним матеріалом і традиційно широко використовується для упаковки рідин. Також скло – крихкий матеріал, вимагає додаткових амортизаційних матеріалів (паперу, картону, полімеру). Алюмінієва фольга, як пакувальний матеріал та матеріал для виготовлення первинної упаковки, має такі недоліки, як нездатність до зварювання, низька стійкість до корозії, низьке відносне подовження при розриві, низька стійкість до подвійних загинів. Але ці недоліки усувають ламінуванням фольги різними ПМ та паперами [66].

Тара з ПМ (полістирол блочний, полістирол вдаростійкий, поліпропілен, поліетилен низького тиску) останнім часом дуже широко використовується для пакування ЛЗ. Це пакети різної форми, коробки, флакони, шприці, туби, мішки, ампули. Тара з медичної пластмаси за експлуатаційними властивостями має значні переваги у порівнянні з тарою з інших матеріалів (скло, картон, метал). Це довговічність, стійкість до атмосферної дії, низька теплопровідність та проникність, хороша герметичність. Недоліки полімерної тари – можливість взаємодії з ЛЗ. Він не витримує контакту з леткими речовинами (хлороформ, хлоретил, етиловий спирт з концентрацією більш ніж 70%, тощо). У складі представленої субстанції летких речовин немає [66].

Лейцин як порошок (субстанція) може бути упакований у подвійні поліетиленові пакети, які забезпечать герметичність, стабільність субстанції для подальшого застосування у виробництві стерильних лікарських форм.

5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту

5.3.1. Обґрунтування очищення і концентрування розчинів

1. *Приготування розчину H_2SO_4 6%.* Після центрифугування відбувається підкислення фігата сполукою H_2SO_4 до $pH = 1.5-2.0$, в результаті чого утворюється дикатіон амінокислоти [57].

2. *Приготування розчину аміачної води (гідроксиду амонію) 3%.* Після хемосорбції, на катіоніті (КУ-2х8) використовуваному в H^+ - формі, відокремлюються домішки нейтральної та кислотної природи. Амінокислоти елюють з катіоніту 0,5-5%-ю аміачною водою (гідроксиду амонію) [44]. Також розчин надалі потрібен для відмивання утворюваної неорганічної солі від кристалів лейцину, що випали.

3. *Приготування розчину HCl 6%.* Після процесу концентрування вакуум-випарюванням, та на початку процесу кристалізації підкислюють концентрат розчином HCl до $pH = 6,0-6,1$ оскільки ізоелектрична точка лейцину $pI=6,04$.

РОЗДІЛ 6. ПРОДУКТИВНИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ОДИН ЦИКЛ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ

Продуктовий розрахунок і матеріальний баланс біосинтезу лейцину.

Ділянка доферментаційних процесів та виробничої ферментації.

Згідно ТЕО потреба в субстанції амінокислоти складає $G_{\text{нт}} = 4543$ кг. Кількість робочих трудоднів $T_{\text{рд}} = 300$. За даними [5] максимальний синтез амінокислоти (18,55 г/л за 72 год) досягається за умов росту штаму *C. glutamicum* FA-1 на середовищі наступного складу (г/л): глюкоза – $C_1=30,0$; кукурудзяний екстракт – $C_2=25,0$; CaCO_3 – $C_2=20,0$; дріжджовий екстракт – $C_3=10,0$; цитрат натрію – $C_4=10,0$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – $C_5=5,0$ сечовина – $C_6=2,0$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – $C_7=1,30$; метіонін – $C_8=0,40$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – $C_9=0,40$; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – $C_{11}=0,01$. Всього – $C_{\Sigma}=104,11$ г/л.

Відповідно до НТД вміст сухих речовин в готовому продукті СРгп має складати 0,9-0,95%. Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 72 + 10 = 82$ год, де $T_{\text{ф}}$ – час культивування (72 год); $T_{\text{по}}$ – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 6. Продуктивний розрахунок, матеріальний баланс, розрахунок технологічного обладнання	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Мусієнко М.С.</i>					1	29
<i>Перевірів</i>		<i>Нечипор Ю.Ю.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н.Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

K_1 – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) прийємо $K_1 = 1,2$; коефіцієнт заповнення ферментера, частка (0,5-0,65); приймаємо $K_{зф} = 0,65$; коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка $K_{па} = 0,65$; коефіцієнт заповнення інакулятора, частка $K_{ін} = 0,65$; коефіцієнт заповнення колб, частка $K_{кол} = 0,2$; коефіцієнт заповнення збірника, частка (0,7-0,8) $K_{зб} = 0,7$.

Сумарні втрати при виділенні цільового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{св} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для виробничих ферментів, частка (0,05-0,1) $X_{ф} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,01-0,1) $X_{па} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для інокуляторів, частка (0,01-0,1) $X_{ін} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка (0,02-0,1) $X_{кол} = 0,05$; втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка (0,1-0,2) $E_{ф} = 0,1$; втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в посівних апаратах, частка (0,1-0,2) $E_{па} = 0,1$; втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в інокуляторах, частка (0,05-0,1) $E_{ін} = 0,1$; втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в колбах, частка (0,01-0,01) $E_{кол} = 0,01$.

1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів)

1.1. Кількість продукту на добу:

$$G_d = \frac{G_{нт}}{T_d} = \frac{4534}{300} = 15,14 \text{ кг/добу}$$

1.2. Кількість амінокислоти за цикл:

$$G_{ц} = \frac{G_d \times T_{цф}}{24} = \frac{15,14 \cdot 82}{24} = 51,73 \text{ кг/цикл}$$

1.3. Об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_{св}$):

$$V_{кр} = \frac{K_1 \times G_{ц} \times CP_{гп}}{P_{кр} \times (1 - E_{св})} = \frac{1,2 \cdot 51,73 \cdot 0,95}{18,55 \times (1 - 0,1)} = 3,53 \text{ м}^3$$

1.4. Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{ц} = \frac{G_{нт}}{G_{ц}} = \frac{4543}{51,73} = 87,82 \text{ циклів}$$

Округлюємо кількість циклів до цілого $N_{\text{ц}} = 88$.

2. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу

2.1. Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі, частка $E_{\text{ф}}=0,1$, складе:

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{3,53}{1 - 0,1} = 3,92 \text{ м}^3$$

2.2. Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{ф}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{3,92}{1 + 0,1} = 3,56 \text{ м}^3$$

2.3. Необхідна кількість посівного матеріалу на засів виробничого ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{псф}} = 3,92 - 3,56 = 0,36 \text{ м}^3 = 360 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{\text{зф}} = 0,65$ його геометричний об'єм складатиме:

$$V_{\text{гф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{K_{\text{зф}}} = \frac{3,92}{0,65} = 6,03 \text{ м}^3$$

Обираємо серед стандартних ферментерів найближчий за об'ємом – 6300л

2.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера

2.4.1. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища виробничого ферментера біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псф}}$ складуть:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псф}} \cdot C_{\Sigma} = 3,56 \times 104,11 = 270 \text{ кг, в тому числі:}$$

Глюкоза	$G_1 = G_{\text{заг}} \times C_1 / C_{\Sigma} = 270 \times (30 / 104,11) = 77,8$
Кукурудзяний екстракт	$G_2 = G_{\text{заг}} \times C_2 / C_{\Sigma} = 270 \times (25 / 104,11) = 64,8$
Крейда	$G_3 = G_{\text{заг}} \times C_3 / C_{\Sigma} = 270 \times (20 / 104,11) = 51,9$
Дріжджовий екстракт	$G_4 = G_{\text{заг}} \times C_4 / C_{\Sigma} = 270 \times (10 / 104,11) = 26$
Цитрат натрію	$G_5 = G_{\text{заг}} \times C_5 / C_{\Sigma} = 270 \times (10 / 104,11) = 26$
Сульфат амонію	$G_6 = G_{\text{заг}} \times C_6 / C_{\Sigma} = 270 \times (5 / 104,11) = 13$

Сечовина	$G_7 = G_{\text{заг}} \times C_7 / C_{\Sigma} = 270 \times (2/104,11) = 5,2$
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	$G_8 = G_{\text{заг}} \times C_8 / C_{\Sigma} = 270 \times (1,3/104,11) = 3,4$
Метіонін	$G_9 = G_{\text{заг}} \times C_9 / C_{\Sigma} = 270 \times (0,4/104,11) = 1$
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$G_{10} = G_{\text{заг}} \times C_{10} / C_{\Sigma} = 270 \times (0,4/104,11) = 1$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$G_{11} = G_{\text{заг}} \times C_{11} / C_{\Sigma} = 270 \times (0,01/104,11) = 0,03$

2.4.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера

Кількість води визначають за наступною формулою $V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}}$, де $V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \times K_{\text{кон}}$ – розбавлення виробничого поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації, $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату ц загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища.

Залежно від способу та обладнання, яке використовують для стерилізації компонентів поживного середовища, величина $K_{\text{кон}}$ може складати:

- у разі стерилізації компонентів у колбах в автоклаві $K_{\text{кон}} = 0$
- у разі стерилізації компонентів безпосередньо у реакторі-змішувачі або безпосередньо у ферментері $K_{\text{кон}} = 0,1 - 0,15$
- у разі стерилізації компонентів в УБС $K_{\text{кон}} = 0,2$.

Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{\text{псф}} = 3,927 \text{ м}^3$ приймаємо рішення щодо використання стерилізації у реакторі-змішувачі.

Тоді кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \times K_{\text{кон}} = 3,56 \times 0,1 = 0,356 \text{ м}^3 = 356 \text{ л.}$$

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псф}} - V_{\text{к}} - G_{\text{заг}} = 3560 - 356 - 270 = 2934 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Розраховуємо кількість води для розчинення по композиціях. Композицію А складають глюкоза, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт та метіонін,

композицію Б – сульфат амонію, цитрат натрію, сечовина, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ та крейда, композицію В – CaCO_3 .

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 769 л.

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

Глюкоза	$V_{1\text{В}} = V_{\text{В}}(C_1/C_{\Sigma}) = 769 \times (30/104,11) = 221,6$
Кукурудзяний екстракт	$V_{2\text{В}} = V_{\text{В}}(C_2/C_{\Sigma}) = 769 \times (25/104,1) = 184,7$
Дріжджовий екстракт	$V_{3\text{В}} = V_{\text{В}}(C_3/C_{\Sigma}) = 769 \times (10/104,11) = 73,9$
Метіонін	$V_{4\text{В}} = V_{\text{В}}(C_4/C_{\Sigma}) = 769 \times (0,4/104,11) = 3$

Загальна кількість води для розчинення композиції В становить 100 л.

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить, л:

$$V_{\text{В}} = 2934 - 769 - 100 = 2065 \text{ л}$$

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

Цитрат амонію	$V_{9\text{В}} = V_{\text{В}}(C_9/C_{\Sigma}) = 2065 \times (10/104,11) = 198$
Сечовина	$V_{10\text{В}} = V_{\text{В}}(C_{10}/C_{\Sigma}) = 2065 \times (2/104,11) = 39,7$
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	$V_{11\text{В}} = V_{\text{В}}(C_{11}/C_{\Sigma}) = 2065 \times (1,3/104,11) = 25,8$
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$V_{12\text{В}} = V_{\text{В}}(C_{12}/C_{\Sigma}) = 2065 \times (0,4/104,11) = 7,9$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$V_{13\text{В}} = V_{\text{В}}(C_{13}/C_{\Sigma}) = 2065 \times (0,01/104,11) = 0,2$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

Композиція А	$V_{\text{АВ}} = 769$
Композиція Б	$V_{\text{БВ}} = 2065$
Композиція В	$V_{\text{ВВ}} = 100$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

Композиція А	– $V_{1\text{К}} = V_{\text{К}}(V_{\text{АВ}}/V_{\text{В}}) = 356 \times (769/2934) = 93$
Композиція Б	– $V_{2\text{К}} = V_{\text{К}}(V_{\text{БВ}}/V_{\text{В}}) = 356 \times (2065/2934) = 250$
Композиція В	$V_{3\text{К}} = V_{\text{К}}(V_{\text{ВВ}}/V_{\text{В}}) = 356 \times (100/2934) = 12,1$

2.4.3. Формування композицій:

Таблиця 6.1

Композиції для стерилізації поживного середовища у ферментері

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,64 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	30	77,8	А	939
Кукурудзяний екстракт	25	64,8		
Дріжджовий екстракт	10	26		
Метіонін	0,4	1		
Вода		769		
Конденсат		93		
Цитрат натрію	10	26	Б	2088
Сульфат амонію	5	13		
Сечовина	2	5,2		
K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O	1,3	3,4		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	1		
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,01	0,03		
Вода		2065		
Конденсат		250		
CaCO ₃	20	51,9	В	152
Вода		100		
Конденсат		12,1		
Разом:		3640		3640

2.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 630 л.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{1 - E_{\text{па}}} = \frac{360}{1 - 0,1} = 400 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{400}{1 + 0,1} = 364 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарата:

$$V_{\text{ппа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 400 - 364 = 36 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення посівного апарата $K_{\text{зпа}} = 0,65$ його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{400}{0,65} = 615 \text{ л}$$

Обираємо серед стандартних ферментерів найближчий за об'ємом – 630 л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{400}{630} = 0,63$$

2.5.1.У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пспа}}$ складуть:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{пспа}} \times C_{\Sigma} = 0,364 \times 104,11 = 38 \text{ кг, в тому числі:}$$

Глюкоза	$G_1 = G_{\text{заг}} \times C_1 / C_{\Sigma} = 38 \times (30/104,11) = 11$
Кукурудзяний екстракт	$G_2 = G_{\text{заг}} \times C_2 / C_{\Sigma} = 38 \times (25/104,11) = 9,1$
Крейда	$G_3 = G_{\text{заг}} \times C_3 / C_{\Sigma} = 38 \times (20/104,11) = 7,3$
Дріжджовий екстракт	$G_4 = G_{\text{заг}} \times C_4 / C_{\Sigma} = 38 \times (10/104,11) = 3,7$
Цитрат натрію	$G_5 = G_{\text{заг}} \times C_5 / C_{\Sigma} = 38 \times (10/104,11) = 3,7$
Сульфат амонію	$G_6 = G_{\text{заг}} \times C_6 / C_{\Sigma} = 38 \times (5/104,11) = 1,8$
Сечовина	$G_7 = G_{\text{заг}} \times C_7 / C_{\Sigma} = 38 \times (2/104,11) = 0,7$
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	$G_8 = G_{\text{заг}} \times C_8 / C_{\Sigma} = 38 \times (1,3/104,11) = 0,5$
Метіонін	$G_9 = G_{\text{заг}} \times C_9 / C_{\Sigma} = 38 \times (0,4/104,11) = 0,1$
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$G_{10} = G_{\text{заг}} \times C_{10} / C_{\Sigma} = 38 \times (0,4/104,11) = 0,1$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$G_{11} = G_{\text{заг}} \times C_{11} / C_{\Sigma} = 38 \times (0,01/104,11) = 0,004$

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в окремих реакторах гострою парою, $K_{\text{кон}} = 0,1$. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС у посівному апараті, становитиме:

$$V_{\text{кпа}} = V_{\text{пспа}} \times K_{\text{кон}} = 364 \times 0,1 = 36,4 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пспа}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{кпа}} = 364 - 38 - 36,4 = 289,6 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків прийmemo, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Розраховуємо кількість води для розчинення по композиціях. Композицію А складають глюкоза, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт та метіонін, композицію Б – сульфат амонію, цитрат натрію, сечовина, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, композицію В - CaCO_3 .

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 86,5 л.

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

Глюкоза	$V_{1\text{в}} = V_{\text{в}}(C_1/C_{\Sigma}) = 86,5 \times (30/104,11) = 25$
Кукурудзяний екстракт	$V_{2\text{в}} = V_{\text{в}}(C_2/C_{\Sigma}) = 86,5 \times (25/104,11) = 20,8$
Дріжджовий екстракт	$V_{3\text{в}} = V_{\text{в}}(C_3/C_{\Sigma}) = 86,5 \times (10/104,11) = 8,3$
Метіонін	$V_{4\text{в}} = V_{\text{в}}(C_4/C_{\Sigma}) = 86,5 \times (0,4/104,11) = 0,3$

Загальна кількість води для розчинення композиція В становить 20 л.

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить, л:

$$V_{\text{в}} = 289,6 - 86,5 - 20 = 183,1 \text{ л}$$

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

Цитрат натрію	$V_{6\text{в}} = V_{\text{в}}(C_6/C_{\Sigma}) = 183,1 \times (10/104,11) = 17,6$
Сульфат амонію	$V_{7\text{в}} = V_{\text{в}}(C_7/C_{\Sigma}) = 183,1 \times (5/104,11) = 8,8$
Сечовина	$V_{8\text{в}} = V_{\text{в}}(C_8/C_{\Sigma}) = 183,1 \times (2/104,11) = 3,5$
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	$V_{9\text{в}} = V_{\text{в}}(C_9/C_{\Sigma}) = 183,1 \times (1,3/104,11) = 2,3$
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$V_{10\text{в}} = V_{\text{в}}(C_{10}/C_{\Sigma}) = 183,1 \times (0,4/104,11) = 0,7$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$V_{11\text{в}} = V_{\text{в}}(C_{11}/C_{\Sigma}) = 183,1 \times (0,01/104,11) = 0,02$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

Композиція А	- $V_{\text{Ав}} = 86,5$
--------------	--------------------------

Композиція Б - $V_{БВ} = 183,1$

Композиція В - $V_{ВВ} = 20$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

Композиція А - $V_{1к} = V_{к} (V_{АВ}/V_{В}) = 36,4 \times (86,5/289,6) = 10,9$

Композиція Б - $V_{2к} = V_{к} (V_{БВ}/V_{В}) = 36,4 \times (183,1/289,6) = 23$

Композиція В - $V_{3к} = V_{к} (V_{ВВ}/V_{В}) = 36,4 \times (20/289,6) = 2,5$

2.5.3. Формування композицій:

Таблиця 6.2

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у посівному апараті об'ємом 630 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 364 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	30	11	А	110
Кукурудзяний екстракт	25	9,1		
Дріжджовий екстракт	10	3,7		
Метіонін	0,4	0,1		
Вода		86,5		
Конденсат		10,9		11
Цитрат натрію	10	3,7	Б	190
Сульфат амонію	5	1,8		
Сечовина	2	0,7		
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	1,3	0,5		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	0,1		
$MnSO_4 \times H_2O$	0,01	0,004		
Вода		183,1		
Конденсат		23		23
$CaCO_3$	20	7,3	В	27,3
Вода		20		
Конденсат		2,5		2,5
Разом:		364		364

2.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 63 л.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмпа}}}{1 - E_i} = \frac{36}{1 - 0,1} = 40 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{40}{1 + 0,1} = 36,4 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарата:

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 40 - 36,4 = 3,6 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення посівного апарата $K_{\text{зпа}} = 0,65$ його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{40}{0,65} = 61,5 \text{ л}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{40}{100} = 0,4$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 100 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому приймаємо 2 посівних апарата по 40 л.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{40}{80} = 0,5$$

2.6.1. Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пспа}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{пспа}} \times C_{\Sigma} = 0,0364 \times 104,11 = 3,8 \text{ кг, в тому числі:}$$

Глюкоза	$G_1 = G_{\text{заг}} \times C_1 / C_{\Sigma} = 3,8 \times (30/104,11) = 1,1$
---------	---

Кукурудзяний екстракт	$G_2 = G_{\text{заг}} \times C_2 / C_{\Sigma} = 3,8 \times (25/104,11) = 0,9$
-----------------------	---

Крейда	$G_3 = G_{\text{заг}} \times C_3 / C_{\Sigma} = 3,8 \times (20/104,11) = 0,7$
--------	---

Дріжджовий екстракт	$G_4 = G_{\text{заг}} \times C_4 / C_{\Sigma} = 3,8 \times (10/104,11) = 0,3$
---------------------	---

Цитрат натрію	$G_5 = G_{\text{заг}} \times C_5 / C_{\Sigma} = 3,8 \times (10/104,11) = 0,3$
Сульфат амонію	$G_6 = G_{\text{заг}} \times C_6 / C_{\Sigma} = 3,8 \times (5/104,11) = 0,2$
Сечовина	$G_7 = G_{\text{заг}} \times C_7 / C_{\Sigma} = 3,8 \times (2/104,11) = 0,07$
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	$G_8 = G_{\text{заг}} \times C_8 / C_{\Sigma} = 3,8 \times (1,3/104,11) = 0,05$
Метіонін	$G_9 = G_{\text{заг}} \times C_9 / C_{\Sigma} = 3,8 \times (0,4/104,11) = 0,02$
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$G_{10} = G_{\text{заг}} \times C_{10} / C_{\Sigma} = 3,8 \times (0,4/104,11) = 0,02$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$G_{11} = G_{\text{заг}} \times C_{11} / C_{\Sigma} = 3,8 \times (0,01/104,11) = 0,0004$

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в окремих реакторах гострою парою, $K_{\text{кон}} = 0,1$. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС у посівному апараті, становитиме:

$$V_{\text{кпа}} = V_{\text{пспа}} \times K_{\text{кон}} = 36,4 \times 0,1 = 3,64 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пспа}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{кпа}} = 36,4 - 3,8 - 3,64 = 28,96 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Розраховуємо кількість води для розчинення по композиціях. Композицію А складають глюкоза, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт та метіонін, композицію Б – сульфат амонію, цитрат натрію, сечовина, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, композицію В - CaCO_3 .

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 8,96 л.

2.6.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

Глюкоза	$V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 8,96 \times (30/104,11) = 2,6$
Кукурудзяний екстракт	$V_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 8,96 \times (25/104,11) = 2,2$
Дріжджовий екстракт	$V_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 8,96 \times (10/104,11) = 0,9$
Метіонін	$V_{4\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 8,96 \times (0,4/104,11) = 0,03$

Загальна кількість води для розчинення композиції В становить 2 л.

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить, л:

$$V_B = 28,96 - 8,96 - 2 = 18 \text{ л}$$

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

Крейда	$V_{5B} = V_B(C_5/C_\Sigma) = 18 \times (20/104,11) = 3,5$
Цитрат натрію	$V_{6B} = V_B(C_6/C_\Sigma) = 18 \times (10/104,11) = 1,7$
Сульфат амонію	$V_{7B} = V_B(C_7/C_\Sigma) = 18 \times (5/104,11) = 0,9$
Сечовина	$V_{8B} = V_B(C_8/C_\Sigma) = 18 \times (2/104,11) = 0,3$
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	$V_{9B} = V_B(C_9/C_\Sigma) = 18 \times (1,3/104,11) = 0,2$
$MgSO_4 \times 7H_2O$	$V_{10B} = V_B(C_{10}/C_\Sigma) = 18 \times (0,4/104,11) = 0,07$
$MnSO_4 \times H_2O$	$V_{11B} = V_B(C_{11}/C_\Sigma) = 18 \times (0,01/104,11) = 0,002$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

Композиція А	- $V_{AB} = 8,96$
Композиція Б	- $V_{BB} = 18$
Композиція В	- $V_{BV} = 2$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

Композиція А	- $V_{1K} = V_K(V_{AB}/V_B) = 3,64 \times (8,96/28,96) = 1,13$
Композиція Б	- $V_{2K} = V_K(V_{BB}/V_B) = 3,64 \times (18/28,96) = 2,26$
Композиція В	- $V_{3K} = V_K(V_{BV}/V_B) = 3,64 \times (2/28,96) = 0,3$

2.6.3. Формування композицій:

Таблиця 6.3

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у посівному апараті об'ємом 80 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 36,4 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
--------------------------------	------------	--	------------	------------------------

Глюкоза	30	1,1	А	11,4
Кукурудзяний екстракт	25	0,9		
Дріжджовий екстракт	10	0,3		
Метіонін	0,4	0,02		
Вода		8,96		
Конденсат		1,13		1,1
Цитрат натрію	10	0,3	Б	18,6
Сульфат амонію	5	0,2		
Сечовина	2	0,07		
K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	1,3	0,05		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	0,02		
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,01	0,0004		
Вода		18		
Конденсат		2,26		2,3
CaCO ₃	20	0,7	В	2,7
Вода		2		
Конденсат		0,3		0,3
Разом:		36,4		36,4

2.7. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_i = \frac{V_{\text{пмі}}}{1 - E_i} = \frac{3,6}{1 - 0,1} = 4 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{псі}} = \frac{V_i}{1 + X_i} = \frac{4}{1 + 0,1} = 3,64 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву інокулятора:

$$V_{\text{пмі}} = V_i - V_{\text{псі}} = 4 - 3,64 = 0,36 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення інокулятора $K_{zi} = 0,65$ його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_i}{K_{zi}} = \frac{4}{0,65} = 6,15 \text{ л}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_i}{V_{\text{гп}}} = \frac{4}{10} = 0,4$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 10 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому обираємо інокулятор на 8 л.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{4}{8} = 0,5$$

2.7.1. Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псі}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псі}} \times C_{\Sigma} = 3,64 \times 104,11 = 379 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

Глюкоза	$G_1 = G_{\text{заг}} \times C_1 / C_{\Sigma} = 379 \times (30/104,11) = 109,2$
Кукурудзяний екстракт	$G_2 = G_{\text{заг}} \times C_2 / C_{\Sigma} = 379 \times (25/104,11) = 91$
Крейда	$G_3 = G_{\text{заг}} \times C_3 / C_{\Sigma} = 379 \times (20/104,11) = 72,8$
Дріжджовий екстракт	$G_4 = G_{\text{заг}} \times C_4 / C_{\Sigma} = 379 \times (10/104,11) = 36,4$
Цитрат натрію	$G_5 = G_{\text{заг}} \times C_5 / C_{\Sigma} = 379 \times (10/104,11) = 36,4$
Сульфат амонію	$G_6 = G_{\text{заг}} \times C_6 / C_{\Sigma} = 379 \times (5/104,11) = 18,2$
Сечовина	$G_7 = G_{\text{заг}} \times C_7 / C_{\Sigma} = 379 \times (2/104,11) = 7,3$
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	$G_8 = G_{\text{заг}} \times C_8 / C_{\Sigma} = 379 \times (1,3/104,11) = 4,7$
Метіонін	$G_9 = G_{\text{заг}} \times C_9 / C_{\Sigma} = 379 \times (0,4/104,11) = 1,5$
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$G_{10} = G_{\text{заг}} \times C_{10} / C_{\Sigma} = 379 \times (0,4/104,11) = 1,5$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$G_{11} = G_{\text{заг}} \times C_{11} / C_{\Sigma} = 379 \times (0,01/104,11) = 0,04$

Розраховуємо кількість води для розчинення по композиціях. Композицію А складають глюкоза, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт та метіонін (стерилізується в колбах), композицію Б – сульфат амонію, цитрат натрію, сечовина, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ та композиція В - CaCO_3 (стерилізується в інокуляторі).

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в інокуляторі гострою парою, $K_{\text{кон}} = 0,1$. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС у інокуляторі, з урахуванням того, що на композицію А взято 1,5 л води, становитиме:

$$V_{\text{кі}} = V_{\text{псі}} \times K_{\text{кон}} = (3,64 - 0,64) \times 0,1 = 0,3 \text{ л}$$

Загальна кількість води, яка необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища композиції Б:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пспа}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{кі}} = 3 - 0,379 - 0,3 = 2,32 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків прийmemo, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 0,64 л.

2.7.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

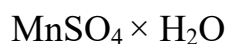
Глюкоза	$V_{1\text{в}} = V_{\text{в}}(C_1/C_{\Sigma}) = 640 \times (30/104,11) = 184,4$
Кукурудзяний екстракт	$V_{2\text{в}} = V_{\text{в}}(C_2/C_{\Sigma}) = 640 \times (25/104,11) = 153,7$
Дріжджовий екстракт	$V_{3\text{в}} = V_{\text{в}}(C_3/C_{\Sigma}) = 640 \times (10/104,11) = 61,5$
Метіонін	$V_{4\text{в}} = V_{\text{в}}(C_4/C_{\Sigma}) = 640 \times (0,4/104,11) = 2,5$

Загальна кількість води для розчинення композиції В становить 0,2.

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить 2,3 л.

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

Цитрат натрію	$V_{6\text{в}} = V_{\text{в}}(C_6/C_{\Sigma}) = 2300 \times (10/104,11) = 221$
Сульфат амонію	$V_{7\text{в}} = V_{\text{в}}(C_7/C_{\Sigma}) = 2300 \times (5/104,11) = 110$
Сечовина	$V_{8\text{в}} = V_{\text{в}}(C_8/C_{\Sigma}) = 2300 \times (2/104,11) = 44,3$
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	$V_{9\text{в}} = V_{\text{в}}(C_9/C_{\Sigma}) = 2300 \times (1,3/104,11) = 28,7$
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$V_{10\text{в}} = V_{\text{в}}(C_{10}/C_{\Sigma}) = 2300 \times (0,4/104,11) = 8,8$



$$V_{11\text{B}} = V_{\text{B}}(C_{11}/C_{\Sigma}) = 2300 \times (0,01/104,11) = 0,2$$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

Композиція А $V_{\text{AB}} = 0,64$

Композиція Б $V_{\text{BB}} = 2,3$

Композиція В $V_{\text{BV}} = 0,2$

2.7.3. Формування композицій:

Таблиця 6.4

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у інокуляторі об'ємом 8 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3640 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	30	109,2	А	878
Кукурудзяний екстракт	25	91		
Дріжджовий екстракт	10	36,4		
Метіонін	0,4	1,5		
Вода		640		
Цитрат натрію	10	36,4	Б	2368
Сульфат амонію	5	18,2		
Сечовина	2	7,3		
K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	1,3	4,7		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	1,5		
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,01	0,04	Б	2368
Вода		2300		
CaCO ₃	20	72,8		
Вода		0,2		
Конденсат		300		
Разом:		3640		3640

2.8. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{кол}} = \frac{V_{\text{пмі}}}{1 - E_{\text{кол}}} = \frac{0,36}{1 - 0,01} = 0,36 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у колбах становитиме:

$$V_{\text{пск}} = \frac{V_{\text{кол}}}{1 + X_{\text{кол}}} = \frac{0,36}{1 + 0,1} = 0,33 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву колб:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пск}} = 0,36 - 0,33 = 0,03 \text{ л} = 30 \text{ мл}$$

2.8.1 Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пск}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{пск}} \times C_{\Sigma} = 0,33 \times 104,11 = 34,4 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

Глюкоза	$G_1 = G_{\text{заг}} \times C_1 / C_{\Sigma} = 34,4 \times (30/104,11) = 9,9$
Кукурудзяний екстракт	$G_2 = G_{\text{заг}} \times C_2 / C_{\Sigma} = 34,4 \times (25/104,11) = 8,2$
Крейда	$G_3 = G_{\text{заг}} \times C_3 / C_{\Sigma} = 34,4 \times (20/104,11) = 6,6$
Дріжджовий екстракт	$G_4 = G_{\text{заг}} \times C_4 / C_{\Sigma} = 34,4 \times (10/104,11) = 3,3$
Цитрат натрію	$G_5 = G_{\text{заг}} \times C_5 / C_{\Sigma} = 34,4 \times (10/104,11) = 3,3$
Сульфат амонію	$G_6 = G_{\text{заг}} \times C_6 / C_{\Sigma} = 34,4 \times (5/104,11) = 1,7$
Сечовина	$G_7 = G_{\text{заг}} \times C_7 / C_{\Sigma} = 34,4 \times (2/104,11) = 0,7$
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	$G_8 = G_{\text{заг}} \times C_8 / C_{\Sigma} = 34,4 \times (1,3/104,11) = 0,4$
Метіонін	$G_9 = G_{\text{заг}} \times C_9 / C_{\Sigma} = 34,4 \times (0,4/104,11) = 0,1$
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	$G_{10} = G_{\text{заг}} \times C_{10} / C_{\Sigma} = 34,4 \times (0,4/104,11) = 0,1$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$G_{11} = G_{\text{заг}} \times C_{11} / C_{\Sigma} = 34,4 \times (0,01/104,11) = 0,004$

Враховуючи малу кількість компонентів, їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві, при цьому конденсат не утворюється.

Композицію А складають глюкоза, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт та метіонін, композицію Б – сульфат амонію, цитрат натрію, сечовина, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, композицію В – $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ та композиція В – CaCO_3 .

Загальна кількість води, необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища, становитиме:

$$V_B = V_{\text{кол}} - G_{\text{заг}} = 330 - 34,4 = 296 \text{ мл}$$

2.8.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, мл:

Глюкоза	$V_{1B} = V_B(C_1/C_{\Sigma}) = 296 \times (30/104,11) = 85,3$
Кукурудзяний екстракт	$V_{2B} = V_B(C_2/C_{\Sigma}) = 296 \times (25/104,11) = 71,1$
Дріжджовий екстракт	$V_{3B} = V_B(C_3/C_{\Sigma}) = 296 \times (10/104,11) = 28,4$
Метіонін	$V_{4B} = V_B(C_4/C_{\Sigma}) = 296 \times (0,4/104,11) = 1,1$
Крейда	$V_{5B} = V_B(C_5/C_{\Sigma}) = 296 \times (20/104,11) = 56,9$
Цитрат натрію	$V_{6B} = V_B(C_6/C_{\Sigma}) = 296 \times (10/104,11) = 28,4$
Сульфат амонію	$V_{7B} = V_B(C_7/C_{\Sigma}) = 296 \times (5/104,11) = 14,2$
Сечовина	$V_{8B} = V_B(C_8/C_{\Sigma}) = 296 \times (2/104,11) = 5,7$
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	$V_{9B} = V_B(C_9/C_{\Sigma}) = 296 \times (1,3/104,11) = 3,7$
$MgSO_4 \times 7H_2O$	$V_{10B} = V_B(C_{10}/C_{\Sigma}) = 296 \times (0,4/104,11) = 1,1$
$MnSO_4 \times H_2O$	$V_{11B} = V_B(C_{11}/C_{\Sigma}) = 296 \times (0,01/104,11) = 0,03$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, мл:

Композиція А	$V_{AB} = 85,3 + 71,1 + 28,4 + 1,1 = 185,9$
Композиція Б	$V_{BB} = 28,4 + 14,2 + 5,7 + 3,7 = 52$
Композиція В	$V_{BB} = 1,1 + 0,03 = 1,13$
Композиція Г	$V_{BB} = 56,9$

2.8.3. Формування композицій:

Таблиця 6.5

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 330 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	30	9,9	А	207
Кукурудзяний екстракт	25	8,2		
Дріжджовий екстракт	10	3,3		
Метіонін	0,4	0,1		
Вода		185,9		
Цитрат натрію	10	3,3	Б	58
Сульфат амонію	5	1,7		
Сечовина	2	0,7		
K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O	1,3	0,4		
Вода		52		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,4	0,1	В	65
MnSO ₄ × H ₂ O	0,01	0,004		
Вода		1,13		
CaCO ₃	20	6,6	Г	62,9
Вода		56,9		
Разом:		330		330

3. Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 6.6.

МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ОДИН ЦИКЛ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (г,мл)			
1.1	Глюкоза	9,9		

1.2	Кукурудзяний екстракт	8,2		
1.3	Крейда	6,6		
1.4	Дріжджовий екстракт	3,3		
1.5	Цитрат натрію	3,3		
1.6	Сульфат амонію	1,7		
1.7	Сечовина	0,7		
1.8	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	0,4		
1.9	Метіонін	0,1		
1.10	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1		
1.11	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,004		
1.12	Вода	326		
	Всього:	330	Всього:	330
2	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (мл)			
2.1	Нестерильне ПС	330	Стерильне ПС	330
3	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл)			
3.1	Стерильне ПС	330	Посівний матеріал	360
3.2	Посівний матеріал з пробірок	30		
	Всього:	360	Всього:	360
4	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 8 л (г, мл)			
4.1	Глюкоза	109,2	Нестерильне ПС	3340
4.2	Кукурудзяний екстракт	91		
4.3	Крейда	72,8		
4.4	Дріжджовий екстракт	36,4		
4.5	Цитрат натрію	36,4		
4.6	Сульфат амонію	18,2		
4.7	Сечовина	7,3		
4.8	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	4,7		
4.9	Метіонін	1,5		
4.10	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,5		
4.11	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,04		
4.12	Вода	2320		
	Всього:	3340	Всього:	3340

5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛІ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 8 л (мл)			
5.1	Нестерильне ПС	3340	Стерильне ПС	3640
5.2	Конденсат	300	(втрат немає)	0,0
	Всього:	3640	Всього:	3640
6	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ ОБ'ЄМОМ 8 л (л)			
6.1	Стерильне ПС	3,64	Посівний матеріал	3,6
6.2	Посівний матеріал з колб на качалках	0,36		
6.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	0,4
	Всього:	4	Всього:	4
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛІ ПОСІВНОГО АПАРАТА ОБ'ЄМОМ 80 л (кг, л)			
7.1	Глюкоза	1,1	Нестерильне ПС	32,76
7.2	Кукурудзяний екстракт	0,9		
7.3	Крейда	0,7		
7.4	Дріжджовий екстракт	0,3		
7.5	Цитрат натрію	0,3		
7.6	Сульфат амонію	0,2		
7.7	Сечовина	0,07		
7.8	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	0,05		
7.9	Метіонін	0,02		
7.10	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,02		
7.11	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,0004		
7.12	Вода	28,96		
	Всього:	32,76	Всього:	32,76
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛІ ПОСІВНОГО АПАРАТА ОБ'ЄМОМ 80 л (л)			
8.1	Нестерильне ПС	32,76	Стерильне ПС	36,4
8.2	Конденсат	3,64	(втрат немає)	0,0
	Всього:	36,4	Всього:	36,4
9	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ ОБ'ЄМОМ 80 л (л)			
9.1	Стерильне ПС	36,4	Посівний матеріал	36
9.2	Посівний матеріал з інокулятора	3,6		
9.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	4
	Всього:	40	Всього:	40

Продовження табл. 6.6.

10.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТА ОБ'ЄМОМ 630 л (кг, л)			
10.1	Глюкоза	11	Нестерильне ПС	327,6
10.2	Кукурудзяний екстракт	9,1		
10.3	Крейда	7,3		
10.4	Дріжджовий екстракт	3,7		
10.5	Цитрат натрію	3,7		
10.6	Сульфат амонію	1,8		
10.7	Сечовина	0,7		
10.8	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	0,5		
10.9	Метіонін	0,1		
10.10	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1		
10.11	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,004		
10.12	Вода	289,6		
	Всього:	327,6	Всього:	327,6
11	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТА ОБ'ЄМОМ 630 л (л)			
11.1	Нестерильне ПС	327,6	Стерильне ПС	364
11.2	Конденсат	36,4	(втрат немає)	0,0
	Всього:	364	Всього:	364
12.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ ОБ'ЄМОМ 630 л (л)			
12.1	Стерильне ПС	364	Посівний матеріал	360
12.2	Посівний матеріал з інокулятора	36		
12.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	40
	Всього:	400	Всього:	400
13	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (кг, л)			
13.1	Глюкоза	77,8	Нестерильне ПС	3156
13.2	Крейда	51,9		
13.3	Кукурудзяний екстракт	64,8		
13.6	Цитрат натрію	26		
13.7	Сечовина	5,2		
13.8	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	3,4		
13.9	Метіонін	1		
13.10	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1		
13.13	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,03		
13.14	Вода	2925		
	Всього:	3156	Всього:	3156

14	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (л)			
14.1	Нестерильне ПС	3156	Стерильне ПС	3560
14.2	Конденсат	356	(втрат немає)	
	Всього:	3560	Всього:	3560
15	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ (л)			
15.1	Стерильне поживне середовище	3560	Культуральна рідина	3528
15.2	Посівний матеріал з посівного апарата	360		
15.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	392
	Всього:	3920	Всього:	3920

Оскільки кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу (3,53 м³) співпадає із кількістю культуральної рідини, визначеної відповідно у п. 1.3 розрахунку партій продукту (3,53 м³), вважаємо, що матеріальний баланс зроблено вірно.

4. Розрахунок технологічного обладнання

4.1. Розрахунок кількості виробничих ферментерів

4.1.1 Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_z = 0,65$:

$$V_{гф} = \frac{V_{ф}}{K_{зф}} = \frac{3,92}{0,65} = 6,03 \text{ м}^3$$

4.1.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{нф} = 6,3 \text{ м}^3$.

4.1.3. Кількість виробничих ферментерів при заданому K_z :

$$N_{ф} = \frac{V_{фг}}{V_{фт}} = \frac{6,03}{6,3} = 0,96 = 1$$

4.1.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка, $K_{зф}$

$$K_{зф} = \frac{V_{ф}}{V_{фт}} \times N_{фт} = \frac{3,92}{6,3} \times 1 = 0,62$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,7) приймаємо до установки ферментерів – 1 + 1 запасний.

4.2. Розрахунок кількості посівних апаратів

4.2.1. Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_3 = 0,65$:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{па}}} = \frac{400}{0,65} = 615 \text{ л}$$

4.2.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{\text{ппа}} = 630$ л.

4.2.3. Кількість посівних апаратів при заданому K_3 :

$$N_{\text{па}} = \frac{V_{\text{ппа}}}{V_{\text{па}}} = \frac{615}{630} = 0,98$$

4.2.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення посівного апарату:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{ппа}} N_{\text{па}}} = \frac{400}{630 \times 1} = 0,63$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,5 – 0,7), приймаємо до установки посівних апаратів – 1 + 1 запасний.

4.3. Розрахунок кількості інокуляторів

4.3.1. Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $K_3 = 0,65$:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{і}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{40}{0,65} = 62 \text{ л}$$

4.3.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{\text{ні}} = 100$ л.

4.3.3. Кількість інокуляторів при заданому K_3 :

$$N_{\text{і}} = \frac{V_{\text{рі}}}{V_{\text{ні}}} = \frac{62}{100} = 0,62$$

4.3.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення інокулятора:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{і}}}{V_{\text{ні}} N_{\text{і}}} = \frac{40}{100 \times 1} = 0,4$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 100 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому обираємо посівний апарат на замовлення на 80 л.

4.4. Розрахунок кількості інокуляторів

4.4.1. Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $K_3 = 0,65$:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_i}{K_{\text{зап}}} = \frac{4}{0,65} = 6,2 \text{ л}$$

4.4.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{\text{ні}} = 10 \text{ л}$.

4.4.3. Кількість інокуляторів при заданому K_3 :

$$N_i = \frac{V_{\text{гп}}}{V_{\text{ні}}} = \frac{6,2}{10} = 0,62$$

4.4.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення інокулятора:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_i}{V_{\text{ні}} \cdot N_i} = \frac{4}{10 \times 1} = 0,4$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 10 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому обираємо на замовлення інокулятор на 8 л.

4.5. Розрахунок кількості качалочних колб

4.5.1. Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}} = 0,2$:

$$V_{\text{гколб}} = \frac{V_{\text{колб}}}{K_{\text{зколб}}} = \frac{0,36}{0,2} = 1,8 \text{ л}$$

4.5.2. Об'єм 1 качалочної колби $V_{\text{нколб}} = 0,5 \text{ л}$.

4.5.3. Кількість качалочних колб при заданому коефіцієнті заповнення $K_{\text{колб}} = 0,2$:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{гколб}}}{V_{\text{нколб}}} = \frac{1,8}{0,5} = 3,6 \text{ шт.}$$

Приймаємо 4 колби.

4.6. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 6,3 м³

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{\text{зб}}} = \frac{1438,6}{0,8} = 1798 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 2 \text{ м}^3$.

Кількість реакторів при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Ар}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{1798}{2000} = 0,9 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{\text{зр}} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}} = \frac{1438,6}{2000 \times 1} = 0,71$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

б) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції Б.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_6 = 0,85$:

$$V_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{\text{зб}}} = \frac{2121,3}{0,85} = 2495 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 2,5 \text{ м}^3$.

Кількість реакторів при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Ар}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{2495}{2500} = 0,99 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{\text{зр}} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}} = \frac{2121,3}{2500 \times 1} = 0,85$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

4.6.2. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 630 л

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{36}} = \frac{121,3}{0,8} = 152 \text{ л}$$

Вибираємо з найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 160 \text{ л}$.
Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Аг}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{152}{160} = 0,95 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}} = \frac{121,3}{160 \times 1} = 0,76$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

б) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції Б.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{36}} = \frac{242,7}{0,8} = 303 \text{ л}$$

Вибираємо з найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 320 \text{ л}$.
Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Аг}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{303}{320} = 0,95 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}} = \frac{242,7}{320 \times 1} = 0,76$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

4.6.3. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 80 л

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{36}} = \frac{12,51}{0,8} = 15,6 \text{ л}$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 20 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення низький, щоб обрати цей апарат. Тому обираємо реактор-змішувач на 16 л.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Ар}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{15,6}{16} = 0,98 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}} = \frac{12,51}{16 \times 1} = 0,78$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

б) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції Б.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{36}} = \frac{23,95}{0,8} = 29,9$$

Вибираємо з найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 30 \text{ л.}$

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Ар}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{29,9}{30} = 0,99 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}} = \frac{23,95}{30 \times 1} = 0,8$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання допоміжних робіт, виробничого біосинтезу, післяферментаційних процесів амінокислоти лейцину зображено в табл. 7.1.

Таблиця 7.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Д	Дозатор об'ємно-ваговий	17	Технічні ваги для дозування компонентів середовищ та для приготування мийного засобу. Виробник: «Химтест» (Україна). ¹
М	Мірник	14	Габаритні розміри мм, не більше 400х680. Основна похибка при 20 °С, % 0.02. Маса, не більше, кг 9 Виробник Росія "Еталон" ²
Н	Насос	14	Насос Debet MB 100. Матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debet» (Україна) ⁴
Ф	Індивідуальний фільтр стерильного повітря	1	Мембранний фільтр Microfluor II виробництва фірми CUNO. Випускаються у вигляді фільтропатронів довжиною від 5 до 40 дюймів. Виробник: «Donaldson» (США) ³ .

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
Розробив	Мусієнко М.С.				РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
Перевірів	Нечипор Ю.Ю.						1	6
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

P3,7	Реактор-змішувач для приготування мийно-дезинфікуючого засобу	1	Реактор-змішувач об'ємом 3 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100-450 об/хв), сталь 12X18H10T. ⁵
ПЗ9	Пристрій забірний	1	Містить корпус, транспортує трубопровід, магістраль подачі повітря. Повітрозбірник А1И 019.00001 Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент».
Ф10	Фільтр попередній	1	Робочий тиск 16 (12 бар) Продуктивність 75 до 3600 Нм3 / год Приєднання 1/4 " до 3 "
K11	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина).
T12	Теплообмінник-охолоджувач	1	Повітренагрівач каналний водяний SystemairVBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁶
P13	Ресивер-вологівідділювач	1	Ресивер Р 270.600. Об'єм 270 л, робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «ДНТ-Прайм Група компаній, ООО» (Росія). ²
T14	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁶
Ф15	Фільтр головний	1	Фільтр (Р)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча стальна сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁷

P18	Реактор-змішувач для приготування розчину соляної кислоти	1	Збірник об'ємом 1575 л, оснащений мішалкою, сталь AISI 316. ³
P23	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину NaOH	1	Реактор-змішувач об'ємом 15 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12X18H10T. ³
P28	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А (2 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
P32	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції Б (2,5 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ФР45	Ферментер (інокулятор) (8л)	1	Ферментер об'ємом 8 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) ³
P38	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А (16 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 40 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
P45	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції Б (32 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 40 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ФР47	Ферментер (інокулятор) (80л)	1	Ферментер об'ємом 40 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) ³
			Реактор-змішувач об'ємом 40 л, оснащений сорочкою та

P51	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
P55	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 40 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ФР77	Ферментер (інокулятор) (630л)	1	Ферментер об'ємом 630 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) ³
P65	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь 12Х18Н10Т. ³
P69	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (100 об/хв), сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ФР79	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 6300л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і перемішуючим пристроєм (до 300об/хв), сталь AISI 316L. Виробник: «BIOSTAT» (Росія). ³
З	Збірник	3	Збірник об'ємом 4000 л для культуральної рідини
Н	Відцентровий насос	3	Насос відцентровий 20/20К-3/2 продуктивністю 26 м ³ /год, потужність насосів 3 кВт, напір, 24 - 15 м.
Н	Гвинтовий насос	2	Продуктивність до 260 м ³ / год Максимальний тиск 30 бар Виробник Італія, «Salvatore Robuschi»

Ц	Центрифуга	2	Проточна центрифуга Z 101 з автоматичним вивантаженням осаду, продуктивність 3000 л/год, швидкість обертання до 10000 об/хв, PTFE-покриття для простого видалення осаду [67].
СК87	Сорбційна колона	1	Хроматограф промисловий К-Prime 40 продуктивністю 600 л/год та максимальним робочим тиском 7 атм, хроматографічна колонка для іонного обміну об'ємом 10л. Нержавіюча сталь 316L, поліпропілен, тефлон [68].
ВВУ90	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум - випарна установка циліндрична з нержавіючої харчової сталі, оснащена пристроєм, з приводом, теплової сорочкою з теплоносієм. Розрядження створюється за допомогою вакуум-насоса. Передбачена можливість регулювання тиску в апараті. Продуктивність по кінцевому продукту, (л / год) до 100. Виробник Росія, «Агромаш»[70]
К95	Кристалізатор	1	Кристалізатор фірми “Мітекс” об'ємом 1500 л та продуктивністю 750 л/год [69].
ВС98	Вакуум сушарка	1	Сушильна камера ТОВ Термотех являє собою циліндричний корпус діаметром 2000-2700 мм, довжиною 7800-12000 мм з робочим тамбуром. Теплоізоляція корпусу - мінеральна вата товщиною 200 мм. Довжина штабеля, що завантажувється в камеру, - 6000-10000 + 300 мм. Вакуумна система передбачає

			використання вакуумних насосів. Споживана потужність - 44 кВт.
ПМ99	Пакувальна машина	1	Пакувальна машина АФ-50(8)-В, з стрічковим (вібраційним) ваговим дозатором, що дозволяє пакувати в тари від 2 до 50 кг, продуктивність 500 уп/год, межі дозування, (г) 2000-50000 [71].

*Примітка використані літ.джерела:

- 1 - https://chemtest.com.ua/ua/vesovoe_oborudovanie-ua ; 2- <https://newfilter.com> ;
 3 - <https://biostat.ru/> ; 4- www.debem.com.ua ; 5 - <https://prom.ua/Reaktory.html> ;
 6 - <http://www.dalgakiran.com.ua>.

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виробництва цільового продукту лейцину включає стадії допоміжних робіт та стадії основного технологічного процесу. Так, до стадій допоміжних робіт належать: санітарна підготовка виробництва, підготовка титрувальних агентів, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ, підготовка розчинів для післяферментаційних процесів. До стадій основного технологічного процесу відноситься підготовка посівного матеріалу та біосинтез амінокислоти лейцину *C. glutamicum* FA-1, зберігання культуральної рідини, відділення біомаси, виділення та очищення цільового продукту, сушіння субстанції.

Технологічну схему біосинтезу лейцину наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва гарантує якість та асептичні умови виробництва, безпеку та здоров'я на виробництві. Цей етап проводиться відповідно до вимог регламенту, де описані правила виробництва та контроль якості технологічного процесу.

ДР 1.1. Підготовка персоналу. При прийнятті на роботу та щорічно персонал, безпосередньо зайнятий у виробництві, повинен проходити медичне обстеження, проводити додаткові медичні огляди, коли це необхідно для роботи або для здоров'я персоналу. Пройти систематичне навчання санітарно-гігієнічним вимогам, а також дотримуватися правил особистої гігієни.

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми		
<i>Розробив</i>		<i>Мусієнко М.С.</i>					
<i>Перевірив</i>		<i>Нечипор Ю.Ю.</i>					
<i>Реценз.</i>							
<i>Н.Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>			Кафедра БТМ		
					<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
						1	20

проводити додаткові медичні огляди, коли це необхідно для роботи або для здоров'я персоналу. Пройти систематичне навчання санітарно-гігієнічним вимогам, а також дотримуватися правил особистої гігієни. Персонал, який працює у біотехнологічному виробництві, навчається виконувати свої обов'язки. Інструкція проводиться раз на рік. Працівники повинні мити руки з милом до та після роботи. Для обробки рук персоналу використовуються дезінфікуючі засоби.

ДР 1.2. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

ДР 1.2.1 Підготовка робочого розчину для миття обладнання

Робочий розчин дезінфікуючого засобу «Вімол» концентрацією 1 % готують в збірнику. В збірник (ЗБ) 300 л через об'ємно-ваговий, надходить 2,79 кг засобу, який потім змішується з питною водою 276,2 л. Після 10 хвилинного перемішування отримаємо готовий підігрітий розчини для миття обладнання, що використовується на стадії ДР 1.2.1, ДР 1.2.2 та ДР 1.3.1. За допомогою СП-мийки миючий розчин розподіляється до відповідного обладнання.

ДР 1.2.2. Підготовка робочого розчину для миття приміщення

Для щоденної і генеральної обробки приміщень необхідно підготувати 0,5% розчин «Біохлору». Для його приготування у реактор змішувач (ЗР), об'ємом 3000 л через об'ємно-ваговий дозатор вносять 12,9 л концентрованого розчину, додають 2559 л водопровідної води та вмикають перемішуючий пристрій на 5 хв.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

На підприємстві з метою дотримання чистоти проводять щоденне та генеральне прибирання (1 раз на місяць) приміщень.

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень

Щоденне прибирання, а саме миття підлоги проводять щоденно, вологим способом. Для цього використовують миючо-дезінфікуючий засіб згідно графіку зміни засобів для попередження утворення резистентності мікроорганізмів. Отримані результати вносять в реєстраційний журнал. Відпрацьовані розчини надходять до знешкодження відходів (до ЗВ 16.1).

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання приміщень

Генеральне прибирання проводять раз на місяць, використовуючи миючо-дезінфікуючий засіб згідно графіку зміни засобів для попередження утворення резистентності мікроорганізмів. Для контролю чистоти приміщення проводять мікробіологічний аналіз завислих частинок та змиви поверхонь ($KUO < 800/\text{см}^2$).

ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття обладнання розчин дезінфікуючого засобу «Вітол»

Миття обладнання здійснюється автоматизовано, за допомогою СИП-мийки, при цьому використовується мийний засіб в об'ємі 20% від геометричного об'єму обладнання. Обробку проводять 20-30 хвилин, після чого відпрацьований розчин подають на відновлення або зливають (ЗВ 16.1).

ДР 1.4.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування обладнання проводять з метою змиву залишків миючих розчинів з поверхні обладнання для підготовки до подальшої стерилізації. Процес здійснюють водою водопровідною при температурі 20–25 °С 30 хвилин. Далі, після змиву, вода направляється на стадію знешкодження відходів (ЗВ 16.1).

ДР 1.4.3. Технічний огляд

Після миття та ополіскування обладнання проводиться візуальний технічний огляд з метою виявлення неущільнень в комунікаціях та запірній апаратурі на обладнанні. Для усунення неущільнень проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.4.4. Перевірка обладнання на герметичність

Перевірку на герметичність проводять створюючи в апараті тиск $P = 0,1\text{--}0,2$ МПа 1 годину. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30–60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Знайдені пропуски усувають і проводять повторну перевірку. Обов'язково раз на тиждень перевіряють на герметичність всю лінію.

ДР 1.4.5. Стерилізація обладнання

Стерилізацію здійснюють відкривши запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікацій гострою парою безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації $t_{ст} = 130\text{--}135\text{ }^{\circ}\text{C}$ закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації. Проводять при $P=0,2\text{ МПа}$ 1,5 години. При стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Збір атмосферного повітря

При визначенні місця забору атмосферного повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди та інші фактори). Враховуючи висоту будівлі підприємства (близько 14 м), забір атмосферного повітря відбуватиметься на висоті близько 2–4 м над будівлею, тобто 16 м. Забір здійснюється повітрозбірником (ПЗ 9).

ДР 2.2. Попереднє очищення повітря в грубих фільтрах

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром до 150, 300 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення (Ф-10) використовують фільтр касетного типу продуктивність якого становить $750\text{ м}^3/\text{хв}$. Як фільтруючий матеріал обираємо скловату, а в верхніх шарах укладаємо ще чесану бавовну. Ступінь очищення становить $E = 80\text{ \%}$.

ДР 2.3. Стиснення повітря

За допомогою турбокомпресора (K11) повітря стискають до $0,35\text{--}0,5\text{ МПа}$, нагріваючи повітря до $120\text{--}200\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ДР 2.4. Охолодження повітря і видалення вологи

Щоб запобігти випаданню вологи в крапле-вловлювачі, повітря «переохолоджують» до $25\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в теплообміннику (Т12). Далі у ресивері (Р13) відбувається стабілізація вологості повітря $W = 60\text{--}65\text{ \%}$.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Надалі, повітря підігрівають у теплообміннику (Т14) для забезпечення надійної роботи фільтрів до температури 45-50°C. При таких температурах не відбувається конденсація пари на волокнах фільтра. Повітря подається в ресивер (Р-13) для акумуляції та стабілізації термодинамічних показників. Тиск вирівнюється, вирівнюється пульсація потоку, $W = 30 - 60 \%$. Очищене повітря подається до фільтрів тонкого очищення.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі тонкого очищення

В якості фільтра попереднього очищення (Ф-15) використовується фільтр типу ФТО-750, всередині якого вкладається елемент із гідрофобної тканини. Охолоджене повітря, проходячи крізь фільтр, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить $E = 95 \%$.

ДР 2.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним інокулятором і виробничим ферментером, а також перед збірниками, які містять стерильні розчини, установлюють індивідуальні фільтри.

Для очищення повітря використовується індивідуальний мембранний фільтр Microfluor II виробництва фірми CUNO. Фільтр виготовляються в вигляді фільтропатронів і капсул. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів. Стерилізація фільтра проводиться гострою парою в технологічній обв'язці з ферментатором без вилучення фільтруючих елементів з корпусу фільтра. При цьому ступінь очищення повітря становить $E=99,9999\%$.

ДР 3. Підготовка та стерилізація титрувальних розчинів для біосинтезу

Кількість титрантів (6 %-го розчину HCl та 6%-го $NaOH$), які необхідно приготувати становить 2 мл на 1 л середовища. Так як їх кількість на етапі підготовки середовищ для отримання посівного матеріалу об'ємом 6,15, 61,5 та 364 л є не великою, то доцільно буде об'єднати стадії приготування цих розчинів.

ДР 3.1 Приготування 6% розчину HCl .

ДР 3.1.1. Приготування розчину 6% HCl для підкислення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 8л, 80 л та 630 л.

У колбу об'ємом 2 л вносять 723 мл питної води і 140 мл 37% соляної кислоти, перемішують та отримують 863 мл 6% соляної кислоти.

ДР 3.1.2. Приготування 6% HCl для підкислення поживного середовища в ферментері об'ємом 6300 л.

У реактор-змішувач (P18) об'ємом 10 л за допомогою мірника (M17) подають 5,97 л питної води. Далі при постійному перемішуванні вносять за допомогою об'ємно-вагового дозатора (D16) 1,16 л 37% соляної кислоти та отримують 7,12 л 6% соляної кислоти.

ДР 3.2 Приготування і стерилізація NaOH

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація розчину 6% NaOH для стабілізації pH середовища в посівному апараті об'ємом 8л, 80л та 630л.

На технічних вагах у відтарованому хімічному стакані зважують 51,8 г їдкого натру, вносять у колбу об'ємом 2 л та додають 812 мл дистильованої води. Отримують 863 мл 6% їдкого натру. Перемішують та стерилізують у автоклаві при температурі 131 °C протягом 40 хвилин.

ДР 3.2.2. Приготування розчину 6% NaOH для стабілізації pH середовища у ферментері об'ємом 6300л.

У реактор-змішувач (P23) об'ємом 10 л за допомогою мірника (M21) подають 6,7 л питної води. Далі при постійному перемішуванні вносять за допомогою об'ємно-вагового дозатора (D20) 427,2 г NaOH та отримують 7,12 л 6% їдкого натру. Після повного розчинення стерилізують пропусканням гострої пари при температурі 131 °C протягом 40 хвилин.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

На першому етапі необхідно приготувати 330 мл поживного середовища. Розрахунок вмісту компонентів для приготування 330 мл середовища наведений у табл 8.1.

Таблиця 8.1.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 330 мл середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 330 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	30	9,9	А	207
Кукурудзяний екстракт	25	8,2		
Дріжджовий екстракт	10	3,3		
Метіонін	0,4	0,1		
Вода		185,9		
Цитрат натрію	10	3,3	Б	58
Сульфат амонію	5	1,7		
Сечовина	2	0,7		
K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O	1,3	0,4		
Вода		52		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,4	0,1	В	65
MnSO ₄ × H ₂ O	0,01	0,004		
Вода		1,13		
CaCO ₃	20	6,6	Г	62,9
Вода		56,9		
Разом:		330		330

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 9,9 г глюкози, 8,2 г кукурудзяного екстракту, 3,3 г дріжджового екстракту та 0,1 г метіоніну. Далі додаємо 186 мл питної води і ретельно перемішуємо суміш, щоб утворилася однорідна суспензія. Переносимо у мірну колбу об'ємом 300 мл, закриваємо колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 3,3 г цитрату натрію, 1,7 г сульфату амонію, 0,7 г сечовини та 0,4 г K₂HPO₄ × 3H₂O. Далі додаємо 52 мл питної води і ретельно перемішуємо суміш, щоб утворилася однорідна

суспензія. Переносимо у мірну колбу об'ємом 250 мл, закриваємо колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв.

ДР.4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 0,1 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, та 0,01 г $MnSO_4 \times H_2O$. Далі додаємо 1,1 мл питної води і ретельно перемішуємо суміш, щоб утворилася однорідна суспензія. Переносимо у мірну колбу об'ємом 100 мл, закриваємо колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв.

ДР.4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 6,6 г крейди. Далі додаємо 57 мл питної води і переносимо у мірну колбу об'ємом 150 мл, закриваємо колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв.

ДР 4.2. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 8 л

На другому етапі необхідно приготувати 3640 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 3640 мл середовища наведений у табл 8.2.

Таблиця 8.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3640мл середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3640 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	30	109,2	А	878
Кукурудзяний екстракт	25	91		
Дріжджовий екстракт	10	36,4		
Метіонін	0,4	1,5		
Вода		640		
Цитрат натрію	10	36,4		

Сульфат амонію	5	18,2	Б	237
Сечовина	2	7,3		
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	1,3	4,7		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	1,5		
$MnSO_4 \times H_2O$	0,01	0,04		
Вода		2300	В	73
$CaCO_3$	20	72,8		
Вода		200		300
Конденсат		300		
Разом:		3640		3640

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д25) у реактор-змішувач об'ємом 8л (Р28) додають 109,2 г глюкози, 91 г кукурудзяного екстракту, 36,4 г дріжджового екстракту та 1,5 г метіоніну. Далі при постійному перемішуванні за допомогою мірника (М26) додають 640 л питної води. Після цього вміст композиції подається в посівний апарат об'ємом 8 л (ФР45).

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д29) у попередньо простерилізований реактор-змішувач об'ємом 8л (Р32) додають 36,4 г цитрата натрію, 18,2 г сульфата амонію, 7,3 г сечовини, 4,7 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 1,5 г $MgSO_4 \times 7H_2O$ та 0,04 г $MnSO_4 \times H_2O$. Далі при постійному перемішуванні за допомогою мірника (М30) додають 2300 л питної води. Після розчинення солі подаються в посівний апарат об'ємом 8л (ФР45), де підкислюються 6%-вим розчином HCl (від ДР 3.1.1). Стерилізують композицію при 131 °C упродовж 40 хв.

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 72,8 г крейди. Далі додаємо 200 мл питної води і переносимо у мірну колбу об'ємом 300 мл, закриваємо колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 131°C протягом 40 хв.

ДР 4.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 80л.

На третьому етапі необхідно приготувати 36,4 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 36,4 л середовища наведений у табл 8.3.

Таблиця 8.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 36,4 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 36,4 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	30	1,1	А	11,4
Кукурудзяний екстракт	25	0,9		
Дріжджовий екстракт	10	0,3		
Метіонін	0,4	0,02		
Вода		8,96		
Конденсат		1,13		1,1
Цитрат натрію	10	0,3	Б	18,6
Сульфат амонію	5	0,2		
Сечовина	2	0,07		
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	1,3	0,05		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	0,02		
$MnSO_4 \times H_2O$	0,01	0,0004		
Вода		18		
Конденсат		2,26		2,3
$CaCO_3$	20	0,7	В	2,7
Вода		2		
Конденсат		0,3		0,3
Разом:		36,4		36,4

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д35) у реактор-змішувач об'ємом 16 л (Р38) вносять 1,1 кг глюкози, 0,9 кг кукурудзяного екстракту, 0,3 кг дріжджового екстракту та 0,02 кг метіоніну. Далі через об'ємно - ваговий дозатор

заливаємо 8,96 л питної води і вмикаємо перемішувальний пристрій для кращого розчинення. Стерилізація проходить у збірнику при температурі 112 °С та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д39) у реактор-змішувач об'ємом 30 л (Р42) додають 0,3 кг цитрата натрію, 0,2 кг сульфата амонію, 0,07 кг сечовини, 0,05 кг $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 0,02 кг $MgSO_4 \times 7H_2O$ та 0,0004 кг (0,4 г) $MnSO_4 \times H_2O$. Далі при постійному перемішуванні за допомогою мірника (М40) додають 18 л питної води. Після розчинення солі подаються в посівний апарат об'ємом 80 л (ФР47), де підкислюються 6%-вим розчином HCl (від ДР 3.1.1). Стерилізують композицію при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 0,7 кг крейди. Далі додаємо 2 л питної води та переносимо у мірну колбу об'ємом 3 л, закриваємо колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 131°С протягом 40 хв.

ДР 4.4. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 630л.

На наступному етапі необхідно приготувати 364 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 364 л середовища наведений у табл 8.4.

Таблиця 8.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 364 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 364 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	30	11	А	110
Кукурудзяний екстракт	25	9,1		
Дріжджовий екстракт	10	3,7		
Метіонін	0,4	0,1		

Вода		86,5		
Конденсат		10,9		11
Цитрат натрію	10	3,7	Б	190
Сульфат амонію	5	1,8		
Сечовина	2	0,7		
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	1,3	0,5		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	0,1		
$MnSO_4 \times H_2O$	0,01	0,004		
Вода		183,1		
Конденсат		23		23
$CaCO_3$	20	7,3	В	27,3
Вода		20		
Конденсат		2,5		2,5
Разом:		364		364

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д48) у збірник об'ємом 160 л (Р51) вносять 11 кг глюкози, 9,1 кг кукурудзяного екстракту, 3,7 л дріжджового екстракту та 0,1 кг метіоніну. Далі через об'ємно - ваговий дозатор заливаємо 86,5 л питної води і вмикаємо перемішувальний пристрій для кращого розчинення. Стерилізація проходить у збірнику при температурі 112 °С та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д52) у реактор-змішувач об'ємом 320 л (Р55) додають 3,7 кг цитрата натрію, 1,8 кг сульфата амонію, 0,7 кг сечовини, 0,5 кг $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 0,1 кг $MgSO_4 \times 7H_2O$ та 0,004 кг (40 г) $MnSO_4 \times H_2O$. Далі при постійному перемішуванні за допомогою мірника (М53) додають 183,1 л питної води. Після розчинення солі подаються в посівний апарат об'ємом 630 л (ФР77), де підкислюються 6%-вим розчином HCl (від ДР 3.1.1). Стерилізують композицію при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д57) у реактор-змішувач об'ємом 50 л (Р60) додають 7,3 кг крейди. Далі при постійному перемішуванні за допомогою мірника (М58) додають 20 л питної води. Стерилізують композицію при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.5. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 6300л.

На останньому етапі необхідно приготувати 3560 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 3560 л середовища наведений у табл 8.5.

Таблиця 8.5.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3560л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,64 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	30	77,8	А	939
Кукурудзяний екстракт	25	64,8		
Дріжджовий екстракт	10	26		
Метіонін	0,4	1		
Вода		769		
Конденсат		93		93
Цитрат натрію	10	26	Б	2088
Сульфат амонію	5	13		
Сечовина	2	5,2		
K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O	1,3	3,4		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	1		
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,01	0,03		
Вода		2065		
Конденсат		250		250
CaCO ₃	20	51,9	В	152
Вода		100		
Конденсат		12,1		12,1
Разом:		3640		3640

ДР 4.5.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д62) у збірник об'ємом 2000 л (Р65) вносять 77,8 кг глюкози, 64,8 кг кукурудзяного екстракту, 26 кг дріжджового екстракту та 1 кг метіоніну. Далі через об'ємно - ваговий дозатор заливаємо 769 л питної води і вмикаємо перемішувальний пристрій для кращого розчинення. Стерилізація проходить у збірнику при температурі 112 °С та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 4.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д66) у реактор-змішувач об'ємом 2500 л (Р69) додають 26 кг цитрата натрію, 5,2 кг сечовини, 3,4 кг $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 1 кг $MgSO_4 \times 7H_2O$ та 0,03 кг $MnSO_4 \times H_2O$. Далі при постійному перемішуванні за допомогою мірника (М67) додають 2065 л питної води. Після розчинення солі подаються в посівний апарат об'ємом 6300 л (ФР79), де підкислюються 6%-вим розчином HCl (від ДР 3.1.1). Стерилізують композицію при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.5.3. Приготування і стерилізація композиції В

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д71) у реактор-змішувач об'ємом 200 л (Р74) додають 51,9 кг крейди. Далі при постійному перемішуванні за допомогою мірника (М72) додають 100 л питної води. Стерилізують композицію при 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 5. Підготовка допоміжних розчинів для післяферментаційних процесів.

ДР 5.1. Приготування розчину 6% розчину H_2SO_4 для сорбції.

Для приготування 1л 6% розчину H_2SO_4 необхідно у колбу об'ємом 2 л внести 840 мл питної води і 160 мл 37% сульфатної кислоти, перемішують та отримують 1000 мл 6% соляної кислоти.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація 3% розчину аміачної води для сорбції та очищення кристалів.

Для приготування 1 л 3% розчину аміачної води необхідно у колбу об'ємом 2 л внести 920 мл питної води і 80 мл 37% розчину гідроксиду амонію, після цього перемішують та отримують 1000 мл 0,5% аміачної води.

ДР 5.3. Приготування розчину 6% HCl для кристалізації.

Для приготування 1л 6% розчину HCl необхідно у колбу об'ємом 2 л внести 840 мл питної води і 160 мл 37% соляної кислоти, перемішують та отримують 1000 мл 6% соляної кислоти.

ТП6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *C. glutamicum* FA-1 зберігають у пробірках при $t = 3-4^{\circ}\text{C}$ зі скошеним агаром (МПА). Для збереження фізіолого-біохімічних властивостей штаму здійснюють пересіви кожні 3-4 місяці. Всі роботи за колекційною культурою проходять строго в асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання і вирощування робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з агаризованим середовищем, розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі із МПА в асептичних умовах, вирощують у термостаті при температурі 30°C .

ТП 6.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізолювані колонії (від ТП 5.2) пересівають петлею у пробірки з МПА (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год.

ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалці

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л вносять в асептичних умовах композицію А (від ДР 4.1.1), композицію Б (від ДР 4.1.2) та композицію В (від ДР 4.1.3). Перемішують і розливають в 3 стерильні качалочні колби об'ємом 500 мл. У пробірку з робочою культурою культурою *C. glutamicum* FA-1, вирощену на м'ясо-пептонному агарі, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру) піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з поживним середовищем.

Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалці (100 об/хв) при $t = 30^{\circ}\text{C}$ упродовж 12-18 год. Значення $\text{pH} = 7,0$.

ТП 6.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 8 л

У попередньо простерилізований інокулятор, через засівну колбу вносять композицію А, композиції Б і вмикають перемішуючий пристрій і перемішують упродовж 5 хв. Після перемішування через засівну колбу вносять інокулят (від ТП 5.3).

Вирощування посівного матеріалу проходить при 30°C упродовж 72 год. Під час культивування, кожні 8 годин відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 6.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 80 л

У інокулятор, що містить стерильну композицію Б (ДР 4.3.2) подають стерильну композицію А (від ДР 4.3.1) та стерильну композицію В (ДР 4.3.3). Після чого поживне середовище підлучнюють стерильним розчином гідроксиду натрію (від ДР 3.2.1) до оптимального значення $\text{pH} 7$. За допомогою труби перетискування у інокулятор подається посівний матеріал із ферментера 1 (ТП 6.5). У кожух ферментера подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода. У ферментер подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 37°C , тривалість – 24 год. Швидкість перемішування становить 100 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в посівний апарат об'ємом 630 л.

ТП 6.7. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 630 л

У збірник, що містить композицію А (ДР 4.4.1) через патрубков відкривши вентиль подають композицію Б (від ДР 4.4.2) та композицію В (від ДР 4.4.3). Після чого підлучнюють (розчином луку від ДР 3.2.2) до оптимального значення $\text{pH} (7)$. За допомогою труби перетискання у збірник подається посівний матеріал (ТП 5.6.). У кожух збірника подається гаряча та холодна вода, а також виводиться

оборотна вода. У збірник подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 37 °С, тривалість – 24 год. Швидкість перемішування становить 100 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання у ферментер об'ємом 6300 л.

ТП 7. Біосинтез

ТП 7.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 6300 л

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 6,3 м³ (ФР-38). У попередньо простерилізований ферментер зі стерильною композицією Б в асептичних умовах за допомогою насоса (Н) подається по трубопроводах з збірника стерильна композиція А (від ДР 4.5.1.) та композиція В (від ДР 4.5.3). Після чого поживне середовище підлучнюють стерильним розчином гідроксиду натрію (від ДР 3.2.2) до оптимального значення рН 7. За допомогою труби перетискування у інокулятор подається посівний матеріал із ферментера (від ТП 6.7). Вмикають перемішувальний пристрій та подачу аеруючого повітря (1-3 м³) при 300-900 об/хв (від ДР 2.7.).

Біосинтез здійснюють при температурі 30°С впродовж 72 год. В апараті створюється надлишковий тиск ($P = 0,02 - 0,05$) подачею стерильного стисненого повітря. Культивування ведуть до досягнення максимального накопичення цільового продукту 18,55 г/л. Культуральна рідина передається на стадію зберігання культуральної рідини до ТП 8.

ТП 8. Зберігання культуральної рідини.

Після біосинтезу цільового продукту культуральна рідина переходить на стадію зберігання в збірник (З-81). Далі культуральна рідина подається на стадію центрифугування.

ТП 9. Відокремлення біомаси

ТП 9.1. Центрифугування культуральної рідини

Зі збірника для зберігання культуральної рідини (З-81) біомаса з культуральною рідиною насосом (Н82) подається до осаджуючої центрифуги з

гравітаційним вивантаженням осаду (Ц83). Частота обертів барабана - 4300 об/хв, протягом 20 хв буде відбуватися відділення біомаси від культуральної рідини. Супернатант насосом (Н84) перекачують у збірник (З-85) для подальшого виділення та очищення.

ТП 10. Виділення та очищення супернатанту

ТП 10.1. Підкислення супернатанту

У збірник (З85) насосом (Н4) подають від ДР 5.1. 1 л 6% розчин сірчаної кислоти за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д86), для доведення розчину до рН 1,6-2, після чого здійснюють сорбцію амінокислоти. Датчик рН автоматично вимірює кислотність. Готовий розчин подають на стадію сорбції до ТП 10.2.

ТП 10.2. Виділення амінокислоти за допомогою сорбції

Після стадії 10.1 супернатант за збірника (З-85) подається до іонообмінної хроматографічної колонки (ХК88), де відбувається виділення лейцину за допомогою катіоніту (КУ-2х8). Процес відбувається в два етапи: перший етап - це взаємодія катіонообмінного гелю з розчином який очищають, в кінці цього етапу лейцин залишається на катіонообмінному гелі, а елюат в вигляді домішок зливають; другий етап це змивання лейцину з катіонообмінного гелю 3 % розчином ам'ячної води від ДР 5.2, додаючи його за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д89), після чого очищений елюат подається на концентрування.

ТП 11. Концентрування продукту

ТП 11.1. Вакуум-випарювання розчину

Циркуляція розчину здійснюється таким чином: по циркуляційній трубі та кільцевому просторі, утвореному корпусом апарата і поверхнею нагріву, рідина опускається вниз, а після цього по кип'ятільних трубках парорідинна суміш піднімається вгору. Вторинна пара через сепаратор вилучається в конденсатор. Згущений розчин вивантажують з вакуум-випарного апарату в кристалізатор з мішалкою для завершення процесу кристалізації.

Від (ХК 88) елюат через насос (Н89) подається до вакуум-випарної установки (ВУУ90) для отримання вмісту сухих речовин 48-50%. Процес проходить при

50±2°C за робочого тиску 0,01 МПа. Упарений продукт перекачується гвинтовим насосом (Н91) до збірника (392). У збірник подають 1 л 6% розчин соляної кислоти від ДР.5.3. для доведення до рН = 6,0-6,1, оскільки це ізоелектрична точка лейцину, при якій процес випадіння кристалів піде швидше. Датчик рН автоматично вимірює кислотність.

ТП 12. Кристалізація концентрату

ТП 12.1. Кристалізація концентрату амінокислоти

Тепло від розчину відводиться через поділяючу стінку до холодного теплоносія. Охолоджувальний агент (холодна вода) надходить у вставлених перпендикулярно до осі апарата елементів і охолоджує розчин. Мішалка прискорює охолодження розчину, перешкоджає осіданню кристалів на дно посудини, внаслідок чого зменшується кількість центрів кристалізації.

Від збірника (392) підкислений концентрат надходить за допомогою гвинтового насоса (Н94) до кристалізатора охолоджуючого типу (К95). Концентрат кристалізують при 5-12 °С, додаючи охолоджену воду, отримують кристали монохлоргідрату лейцину.

ТП.13. Відділення та очищення кристалів після кристалізації

ТП. 13.1. Центрифугування кристалічної маси

Після кристалізації кристали лейцину з рідиною подаються гвинтовим насосом (Н96) до центрифуги періодичної дії з гравітаційним вивантаженням осаду (Ц97) для відділення кристалів лейцину від рідини. Частота обертів барабана - 4300 об/хв, протягом 20 хв.

ТП 13.2. Знебарвлення та очищення кристалів

Для отримання препарату більш високого ступеня необхідно провести обробку розчину активним вугіллям марки ОУ-А. Для легкого відмивання утвореної неорганічної солі від кристалів лейцину, що випали, нейтралізацію розчину гідрохлориду лейцину після підкислення соляною кислотою, потрібно здійснювати концентрованим 3% розчином аміачної води.

ТП 14. Сушіння продукту

ТП 14.1. Вакуум-сушіння кристалів

Вакуум сушка проводиться в умовах зниженого тиску в робочому об'ємі. Створення вакууму зумовлює зниження показника температури, при якій починається випаровування. Спочатку рідко-в'язкий продукт розливається на поверхню рівним шаром, після листи поміщаються в сушильну камеру. Попередньо включаються вакуумний і циркуляційний насоси, відкривається вакуумний затвор для відкачування повітря. Включається нагрівач по досягненню робочого тиску, пар виходить і конденсується в охолоджувальній камері. Для досушування виконується додаткове зниження тиску в камері.

Після центрифугування кристали лейцину подають до вакуум-сушарки (ВС98) де з кристалів за $t=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ та тиску 0,01 МПа протягом 2 годин буде видалена зайва волога (допустима норма вологості для лейцину 5%) та буде наданий фінальний порошкоподібний вигляд.

ПМВ 15. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 15.1. Пакування в первинну упаковку

Після сушіння порошок лейцину подають до пакувальної машини (ПМ99). Пакування буде проводитися в подвійні поліетиленові пакети об'ємом 1 кг.

ПМВ 15.2. Маркування і відвантаження

Після пакування у первинну упаковку пакети будуть збиратися у картонні коробки по 4 штуки. Візуальний огляд як контроль. Надалі картонні коробки передають на склад до карантинної зони.

ЗВ 16. Знешкодження відходів

ЗВ 16.1. Знешкодження рідких відходів

Для знешкодження рідких відходів можна використати механічні методи такі як фільтрація через різні типи фільтраційних матеріалів або відстоюванням у спеціальних резервуарах. Найкращим буде комбінування цих методів для більш якісної очистки.

Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води стерилізують і нейтралізують. Надалі їх спрямовують в каналізацію.

ЗВ 16.2. Знешкодження газоподібних відходів

Очищення викидів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодженням газів, зниженням вологості у вологовідбійниках з подальшим нагрівання, щоб уникнути попадання крапельної вологи і змочування фільтрів. Під час очищення повітря, що входить в вентиляційну систему, використовують різноманітні фільтри з волокнистих матеріалів. Очищене повітря викидається через трубу розсіювання.

ЗВ 16.3. Знешкодження твердих відходів

Після очищення та виділення лейцину залишаються тверді відходи, що представляють собою біомасу клітин. Найбільш доцільним буде збирання та сушіння біомаси і використання її в якості кормової добавки адже клітинні стінки можуть містити залишки лейцину, вітаміни та інші корисні речовини.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Незалежно від способу культивування з моменту посіву, мікроорганізмом-продуцентом стерильного поживного середовища контролюється ріст культури та утворенням амінокислоти [72].

Упродовж культивування на кожній стадії періодично відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного, технологічного контролю. Визначають концентрацію біомаси і цільового продукту, а також вмісту джерела вуглецю (глюкоза) і азоту (амінний).

Під час вирощування посівного матеріалу та біосинтезу проби з культуральної рідини беруть кожні 8 годин на аналіз. Відібрані зразки досліджують мікроскопічно та візуально перевіряють. З метою виявлення можливих заражень проводять періодичну посів зразків у чашках Петрі з агаризованим середовищем [72].

9.1. Мікробіологічний контроль.

Мікробіологічний контроль передбачає забезпечення та підтримання умов, необхідних для нормальної життєдіяльності продуцентів, контроль виробництва цільового продукту та вже готової продукції і своєчасне виявлення забруднення (контамінації) та встановлення джерела його виникнення [73].

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Мусієнко М.С.</i>			<i>РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевірів</i>		<i>Нечипор Ю.Ю.</i>					1	14
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н.Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованим середовищем і аналізується за допомогою світлової мікроскопії. Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій.

Критерієм чистоти культури є однорідність вирослих колоній та відсутність колоній інших мікроорганізмів. Посіви інкубують 48 годин при температурі 37°C на середовищах. На щільних поживних середовищах (рис.9.1) колонії середнього розміру (2-4 мм), жовтувато-кремові, поверхня гладка, форма опукла, край рівний, структура однорідна [5].



Рис. 9.1. Колонії *C. glutamicum* на твердому поживному середовищі.

Мікроскопіювання проводять за допомогою методу «роздавлена крапля». Для приготування препаратів за методом роздавленої краплі на поверхню чистого сухого предметного скла наносять краплю води, фізіологічного розчину або культуральної рідини. Складною паличкою або бактеріологічною петлею в краплю вносять невелику кількість досліджуваної культури і обережно розподіляють її в рідині для отримання однорідної суспензії. При роботі з культурою тканин на предметне скло наносять краплю суспензії клітин в культуральній рідині. Якщо суспензія клітин занадто густа, попередньо готують робоче розведення культури. Для цього зазвичай до 4,5 мл води, фізіологічного розчину або середовища для зростання додають 0,5 мл суспензії клітин і ретельно перемішують.

Цим досягається десятикратне розведення вихідної суспензії. При необхідності можна отримати більш високі розведення (1:100-1:1000 і т. д.);

приготовану краплю накривають покривним склом, уникаючи утворення бульбашок повітря. Якщо частина рідини виступає за краю покривного скла, надлишок середовища можна відсмоктати вузькою смужкою фільтрувального паперу. Готові препарати розглядають в сухих і імерсійних системах. Для отримання найбільшого контрасту використовують фазово-контрастну мікроскопію. Так як при цьому найчастіше необхідна подвійна імерсія (об'єктива і конденсора), товщина препарату не повинна перевищувати 1,1-1,3 мм. Незабарвлені організми виглядають під мікроскопом обведеними світлою або темною (в залежності від фокусування) смужкою (лінія Векке), що виникає на кордоні заломлення середовища і тіла [72].

При розгляданні колоній *C. glutamicum* під мікроскопом можна побачити овальні, розміром 1-1,5x0,6-0,8 мкм, нерухомі, грампозитивні палички. Спори не утворюють. (див.рис 9.2.) [5].

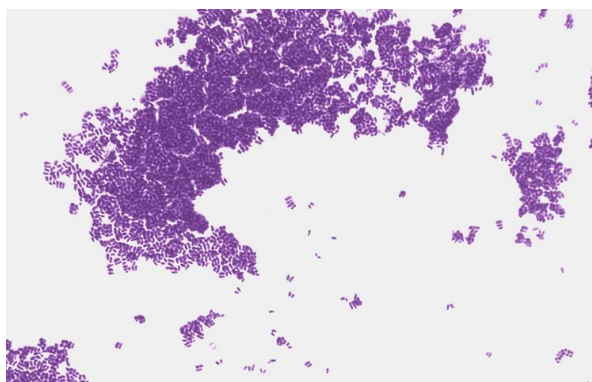


Рис 9.2. *C. glutamicum* під мікроскопом.

Під мікроскопом не повинна спостерігатися наявність сторонньої мікрофлори.

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

9.2.1. Визначення біомаси

Біомасу клітин визначають ваговим методом. Визначення біомаси складається із трьох операцій: доводять масу центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення, відділяють клітини мікроорганізмів від культуральної рідини, визначають їх масу [74].

1. Доведення маси фільтрів до постійного значення. Фільтри, попередньо поміщені у відкриту чашку Петрі, переміщують у сушильну шафу й висушують їх протягом 1 – 2 год при температурі 80 – 85 °С. Далі чашку Петрі з фільтрами виймають із сушильної шафи та переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl_2) або концентрованою сульфатною кислотою. Ексикатор розміщують біля аналітичних ваг, за допомогою яких буде проводитися зважування. Через одну годину фільтри зважують із точністю до 0,0001 г. Сушіння та зважування повторюють, відповідно послідовності операцій, поки маса не досягне постійного значення, тобто коливання її значень не перевищать $\pm 0,0001\text{г}$ [74].

2. Мікроорганізми відокремлюють від середовища центрифугуванням або фільтруванням. Бактерії зазвичай відокремлюють центрифугуванням. Для цього точно відміряний об'єм повністю змішаної рідкої культури виливають у пробірку для центрифуги, яка змінюється залежно від її щільності від 5 до 20 мл. Центрифугують протягом 15-20 хв при 5-10 тис. об/хв. Після центрифугування супернатант обережно зливають, осад промивають злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на 1 л води) і знову центрифугують при тій же кількості обертів. Надосадову рідину зливають, одразу після зупинки центрифуги. В іншому випадку частина осаду може бути втрачена[74].

3. Визначення біомаси. Визначення біомаси Для визначення сухої клітинної маси фільтр з осадом клітин мікроорганізмів поміщають у сушильну шафу, сушать і зважують. Режим сушіння та зважування такий самий, що використовувався й при визначенні маси фільтрів. Суху біомасу визначають за формулою:

$$M = \frac{(A - B) \times 1000}{V}$$

де M – суха біомаса, г/л; A – маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом, г; B – маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду, г; V – обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування), мл.

Точність методу визначається цілісністю відмивання компонентів середовища від клітин та ретельністю зважування [74].

9.2.2. Концентрація цільового продукту.

Для кількісного визначення лейцину, 1 мл проби із культуральної рідини центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв. Концентрацію лейцину визначали методом рідинної фазової рідинної хроматографії високого тиску в системі Agilent 1200 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія, США) з виявленням DAD (338 нм) після автоматичної передколонної дериватизації орто - фталдіальдегідом. Поділ проводили при 40 °C на колонці dC18 (розмір частинок 5 мкм, 4,6 мм × 250 мм, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США). Буфер елюювання складався з полярної фази (0,1 М ацетат натрію, pH 7,2) і неполярної фази [5].

9.2.3. Концентрація вуглецевого компоненту глюкози

Для культивування *C. glutamicum* FA-1 використовують поживне середовище, джерелом вуглецю в якому є глюкоза.

Для визначення концентрації глюкози в культуральній рідині використовують метод Бертрана. Концентрацію вуглецю визначають у супернатанті, який одержують центрифугуванням культуральної рідини при 3000 об/хв протягом 20 хв, для видалення біомаси. Суть методу полягає в наступному: в результаті змішування робочих розчинів Фелінг I та Фелінг II утворюється гідроксид міді, який дуже легко відновлюється до вільної міді альдегідної групи глюкози. Мідь, що виділилась, відновлює йодистий калій до вільного йоду, який надалі відтитровують розчином тіосульфату, використовуючи як індикатор крохмаль.

В колбу піпеткою вносять 5-9 мл культуральної рідини і доводять дистильованою водою до загального об'єму 10 мл. Із бюретки додають 10 мл розчину Фелінга I і Фелінга II. Колбу ставлять на плитку і кип'ятять протягом 2 хвилин. Після охолодження додають 15-20 мл 20% сірчаної кислоти і 3 г йодистого калію. Йод, що виділився, титрують 0,1 н розчином тіосульфату. Коли розчин йоду починає світлішати, додають 2-3 краплини крохмалю і продовжують

титрувати до виникнення синього забарвлення і виділення синього осаду. Кількість міді, яка пішла на реакцію з глюкозою, визначають за формулою:

$$Cu = ((a-b) \times k \times 6,36) / C, \quad (9.1)$$

де a – кількість 0,1 н розчину тіосульфату, яка пішла на титрування досліджуваного розчину, мл; b – кількість 0,1 н розчину тіосульфату, яка пішла на титрування контрольного розчину, мл; k – поправочний коефіцієнт, $k = 1; 6,36$

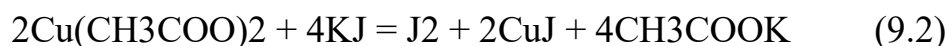
– кількість мл Cu , яка відповідає 1 мл 0,1 н тіосульфату; C - кількість досліджуваного розчину, яка пішла на титр мл [75].

9.2.4. Концентрація амінного азоту

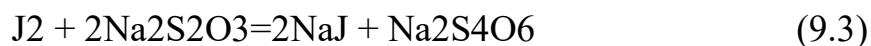
Джерелом азоту в середовищі для культивування інокуляту є сульфат амонію.

Концентрацію азоту визначають у супернатанті, який одержують центрифугуванням культуральної рідини при 3000 об/хв протягом 20 хв, для видалення біомаси. В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $Cu_3(PO_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді [76].

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину добавляють йодид калію:



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



1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу $\text{Cu}(\text{RCHNH}_2\text{COO})_2$ [76].

Техніка визначення. В мірну колбу місткістю 50 мл піпеткою вносять 5 мл дослідного розчину, додають 3 – 4 краплини індикатору тимолфталейну і по краплям розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/л до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 мл суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим.

10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, додають 0,5 мл 80 %-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодиту калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л. В кінці титрування до розчину додають 1 – 2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію [76].

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 мл фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, витраченого на титрування, на 0,28. З урахуванням розчинення це відповідає 1 мл культуральної рідини.

Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

$$X = \frac{a \times 0,28 \times 6 \times 10 \times 100}{50} \quad (9.4.)$$

де a – кількість розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л, витраченого на титрування, л ; b – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, л.

9. 3. Визначення вологості порошку лейцину

Контроль вологості сировини буде проводитися за допомогою аналізатора вологості “ОНАУС MB25” це сучасний прилад який дасть змогу швидко та точно визначити вміст вологи в продукті. Принцип роботи вологоміра наступний: досліджуваний зразок зважують, нагрівають до визначеної температури за

спеціально розробленими методиками та режимами, після чого його знову зважують і визначають різницю, що дорівнює втраті вологи [77].

Таке дослідження дозволяє виявити та визначити масову частку не лише вільної води, а й зв'язаної вологи. Між ними є різниця, однак у клітинах волога знаходиться у обох станах. 95% від загального її об'єму припадає на вільну воду, котра є дисперсійним середовищем і розчинником. Інші 5% – це зв'язана волога, що бере участь у процесі сполучення білків та інших структурних елементів клітини.

Методика: дві наважки порошку масою 1-3 г, зважені з погрішністю $\pm 0,01$ г, помішують у заздалегідь висушені і зважені разом з кришками бюкси. Кожну наважку порошку сушать в сушильній шафі при температурі 100-105 °С до постійної маси.

Постійна маса вважається досягнутою, якщо різниця між двома подальшими зважуваннями після 30 хв. висушування і 30 хв. охолоджування в ексікаторі не перевищує 0,01 г. За остаточний результат визначення беруть середнє арифметичне двох паралельних визначень, обчислених до десятих часток відсотка. Допустима розбіжність між результатами двох паралельних визначень не повинна перевищувати 0,5 % [78].

Аналізатор вологи OHAUS MB 25 розроблений із застосуванням передових технологій відокремлення води від загальної маси досліджуваного матеріалу та проведення аналітичного контролю втрати маси після дії теплового випромінювання. Пристрій MB 25 американської компанії OHAUS вважають класичним вимірювальним приладом з надійною роботою та відносною точністю контролю 0,05%. Робочий діапазон температури сушіння знаходиться в межах 50...160 °С, а дискретність зміни температури складає 5 °С. Максимальна вага досліджуваного зразка становить 110 г [77].

9.4. Карта постадійного контролю

Таблиця 9.1

**Карта постадійного контролю до та після ферментаційних процесів
виробництва лейцину на основі *C. glutamicum* FA-1**

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1 Приготування робочого розчину Вімол	Концентрація засобу	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=1,0\%$ $\tau=5\text{хв}$
Кх 1.1.2 Приготування робочого розчину Біохлор	Концентрація засобу	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C=0,5\%$
Км 1.2.1 Щоденне прибирання приміщень	Підлога, обладнання. Чистота	Змив поверхонь Кількість завислих м/о у повітрі	До прибирання Після прибирання	Відсутність бруду та пилу Кількість КУО<800/см ²
		Візуальний огляд Змив поверхонь Кількість завислих м/о у повітрі	Після прибирання	
Км 1.2.2. Генеральне прибирання приміщень	Підлога, стіни, вікна, двері, обладнання. Чистота	Змив поверхонь Кількість завислих м/о у повітрі	До прибирання Після прибирання	Відсутність бруду та пилу Кількість КУО<800/см ²
		Візуальний огляд Змив поверхонь Кількість завислих м/о у повітрі	Після прибирання	
Кт 1.3.1 Миття та ополіскування ферментаційного обладнання	Концентрація мийного розчину, час миття, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час операції	$C=5\%$, , $\tau=1$ год, візуально чисте обладнання
Кт 1.3.2 Технічний огляд	Міцність з'єднань	Перевірка на міцність з'єднань	Перед перевіркою на герметичність	Візуальна відсутність послаблення між частинами на обладнанні
Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Герметичність обладнання, час перевірки	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно протягом перевірки	$P=0,1-0,2$ МПа, $\tau=30-60$ хв
Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання	Температура стерилізації, тиск під час стерилізації, тривалість	Технічний манометр, годинник	Тиск визначається протягом стерилізації	$t=130-135^{\circ}\text{C}$, $P=0,28-0,3$ МПа, $\tau=2$ год $\Delta P<0,01$ МПа
Кт 2.1 Забір атмосферного повітря	Висота забору повітря	Висота труби забору	Протягом всього циклу виробництва	$H=16$ м

Кт 2.2 Грубе очищення	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	$\delta > 50$ мкм
Кт 2.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Повітря після компресорування	$P = 0,35 - 0,5$ МПа, $t = 120 - 200^\circ\text{C}$
Кт 2.4 Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	$t = 18 - 20^\circ\text{C}$, $W = 60\%$
Кт 2.5 Стабілізація термодинамічних показників	Підігріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагріву повітря	$t = 20 - 30^\circ\text{C}$
Кт 2.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, перепади тисків, ступінь очищення повітря на виході з фільтра	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	$E = 95\%$
Кт 2.7 Очищення повітря в індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах	$E = 99,999\%$
Кх, 3.1.1 Приготування 6% розчину НСІ для посівних апаратів об'ємом 8 та 80 л, 630 л та 6300 л	Концентрація НСІ,	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 6\%$
Кх, Кт, Км 3.1.2 Приготування стерильного 6% розчину NaOH для посівних апаратів об'ємом 8 та 80 л, 630 л та 6300 л	Концентрація NaOH, температура, час, стерильність	Хімічний метод, термометр, годинник	Після приготування розчину, тиск і температуру перевіряють безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод	$C = 6\%$, $t = 131^\circ\text{C}$, $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1, 4.2.1, 4.3.1, 4.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^\circ\text{C}$, $\tau = 30$ хв, $P = 0,05$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2, 4.2.2, 4.3.2, 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^\circ\text{C}$, $\tau = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа, відсутність мікробіоти

Кт, Км 4.1.3, 4.2.3,4.3.3, 4.4.3 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція В Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $P = 0,15\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1. Приготування розчину 6% розчину H_2SO_4 для сорбції	Концентрація H_2SO_4 ,	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 6\%$
Кт, Км 5.2. Приготування і стерилізація 3% розчину аміачної води для сорбції та очищення кристалів	Концентрація NH_4OH ,	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 3\%$
Кт, Км 5.3. Приготування розчину 6% HCl для кристалізації	Концентрація HCl ,	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 6\%$
Кт, Км 6.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник календар	Мікробіологічний контроль кожен місяць	$t = 4^{\circ}\text{C}$, $\tau = 2\text{--}3$ місяці відсутність сторонньої мікробіоти
Км 6.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах	Колекційна культура <i>S. glutamicum</i> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Мікробіологічний контроль календар	Мікробіологічний контроль проводять в кінці культивування (3–4 доба)	Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси антибіотична активність, компонентний склад антибіотичних	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль тонкошаровий хроматограф апарат Чижової	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau =$ 24г, $\omega = 100\text{--}$ об/хв, $\text{pH} = 7,2\text{--}7,4$ відсутність сторонньої мікробіоти

	фракцій, центрацію джерела вуглецю та азоту.			
Кт, Км 6.4 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 8 л	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, аерація мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси, джерела вуглецю та азоту	Датчик рН годинник, термометр, манометр, мікроскоп, тонкошаровий хроматограф, апарат Чижової мікробіологічний контроль	Температура і аерація контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту – кожні 4 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau =$ 24г, $\omega = 100$ - об/хв, $\text{pH} = 7,2-7,4$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 80 л	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, аерація мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси, джерела вуглецю та азоту	Датчик рН годинник, термометр, манометр, мікроскоп, тонкошаровий хроматограф, апарат Чижової мікробіологічний контроль	Температура і аерація контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту – кожні 4 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau =$ 24г, $\omega = 100$ - об/хв, $\text{pH} = 7,2-7,4$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.6 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 630 л	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, аерація мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси, джерела вуглецю та азоту	Датчик рН годинник, термометр, манометр, мікроскоп, тонкошаровий хроматограф, апарат Чижової мікробіологічний контроль	Температура і аерація контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту – кожні 4 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	$\text{pH} = 7.2-7.4$ $\tau = 24-30$ год, $\omega = 100$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 7.1 Виробничий біосинтез в ферментері об'ємом 6,3м ³	Культуральна рідина, тривалість вирощування, температура, аерація мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси, джерела вуглецю та азоту	Датчик рН годинник, термометр, манометр, мікроскоп, тонкошаровий хроматограф, апарат Чижової мікробіологічний контроль	Температура і аерація контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту – кожні 4 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	pH=7,2-7,4 τ= 72 год, ω = 100 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт 8.1. Кт 13.1. Центрифугува- ння	Швидкість обертів	Тахометр	безперервно під час центрифугування	w=4200 об/хв
Кх 10.1 Підкислення супернатанту	Концентрація супернатанту	pH метр	безперервно під час	pH=1,6-2
Кт,Кх 11.1. Вакуум- випарювання розчину	Температура, вміст сухих речовин	Термометр технічний	безперервно під час	t=50+-2°C
Кт,Кх12.1. Кристалізація концентрату	Температура, рН	термометр технічний, рН метр	безперервно під час	t=5-12 °C pH=6,0-6,1
Кт 14.1. Сушіння кристалів	Температура в гріючій камері, вологість продукту	Термометр технічний	Температура визначається безперервно під час процесу, вологість амінокислоти визначається після висушування	t=50 °C, W = 5 %
Кт 15.1 Пакування в первинну упаковку	Маса	Технічні ваги	Після проведення процесу	m=1 кг.
Кт 15.2. Маркування і відвантаження	Текст на первинній упаковці, цілісність	Візуальний контроль	Під час процесу маркування	повне позначення на упаковці

РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Автоматизація процесів - сукупність методів та інструментів, призначених для впровадження системи чи систем, які дозволяють керувати самим процесом без особистої участі або залишають людині право схвалювати найвідповідальніші рішення [79].

Мета автоматизації - підвищення продуктивності праці, поліпшення якості продукції, оптимізація управління, усунення людини від виробництв, підвищення надійності і точності виробництва, збільшення конвертованості і зменшення часу обробки даних. Вона робить суттєвий вплив на удосконалення технологій, механізацію виробничих процесів, забезпечує умови для створення більш складних високопродуктивних процесів, які без автоматизації розробити та реалізувати неможливо. Тому до факторів підвищення економічної ефективності можна віднести: підвищення якості продукції, зниження витрат сировини, скорочення відходів виробництва. Таким чином, автоматизація сприяє інтенсифікації харчових виробництв, дає суттєвий економічний ефект [79].

Основою автоматизації технологічних процесів є перерозподіл матеріальних, енергетичних та інформаційних потоків за прийнятими критеріями управління (оптимізація).

Автоматизація технологічних процесів у межах виробничого процесу дозволяє організувати основи впровадження систем управління виробництвом та систем управління бізнесом.

					НУХТ БТЕК 04.02.39 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Мусієнко М.С.</i>			РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевірив</i>		<i>Нечипор Ю.Ю.</i>					1	4
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н.Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						

10.1. Опис функціональної схеми автоматизації

Під час процесу кристалізації температура контролюється ланцюгом датчика

2. Принцип роботи заснований на тому, що при підвищенні або падінні температури опір напівпровідника, включеного в датчик, змінюється. Тому при перевищенні встановленої температури датчик посиляє імпульс на контролер і той або за допомогою магнітного імпульсу, або включає подачу холодної води до кришки пристрою.

Температура в колекторі вимірюється датчиком температури (поз. 2а). Сигнал датчика подається на контролер і, залежно від температури, подача холодної води включається або вимикається за допомогою корпусу регулятора (поз. 2в), яким керує електромагнітний перетворювач 2б.

Значення рН вимірюється за допомогою датчика рівня (поз. 1а). Сигнал від датчика подається на контролер і, залежно від рівня, клапан відкривається або закривається для подачі рідини в апарат регулюючим органом (поз. 1в), що приводиться в дію електромагнітним перетворювачем 1б.

ЗАВДАННЯ НА РОЗРОБКУ СХЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

№ п/п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю, реалізація управляючої дії
1	Кристалізатор охолоджуючого типу	Температура	5-12 °C	Регулювання	Підтримання на заданому значенні	АРМ оператора
		pH	6,0-6,1	Регулювання	Підтримання на заданому значенні	АРМ оператора

10.3. Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1	2	3	4	5	6
2а	Температура	В агрегатах	Датчик термоперетворювач опору ТСП, НСХРt100, діапазон (0 – 100)°С, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА	Pt100	ЧТП «Теплоприбор» м. Челябинск
2б	Температура	По місцю	Електропневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
2в	Температура	По місцю	Пневматичний клапан	Dwyer серія HiFlow 2001V A32230-L0	СВ Альтера м. Київ
1а	Значення рН	В агрегаті	рН-метр промисловий стаціонарний	АТЛАНТ-2101	ДП “Сименс Україна” м.Київ
1б	Значення рН	На щиті	Промисловий рН-метр рН-220.6 / П (вимірювальний комплекс)	рН-метр рН-220.6 / П	ВП «Діліс»

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Гончаренко Г.Г., Крук А.В. Основы биотехнологии: Мин. обр. РБ, УО «ГГУ им. Ф. Скорины». – Гомель, 2005. – 178 ст.
2. Амінокислоти та їх властивості докладно. 2007 р. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ironsport.com.ua/aminokisloti-ta-yikh-vlastivosti-dokladno-doc486.uk.html>
3. *Corynebacterium glutamicum* характеристики, таксономія, морфологія, культура. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ua.thpanorama.com/articles/biologa/corynebacterium-glutamicum-caractersticas-taxonoma-morfologa-cultivo.html>
4. Амінокислоти та їх властивості докладно. 2007 р. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ironsport.com.ua/aminokisloti-ta-yikh-vlastivosti-dokladno-doc486.uk.html>
5. Feng L., Xu J. and Zhang W. Improved L-Leucine Production in *Corynebacterium glutamicum* by Optimizing the Aminotransferases // *Molecules*. – 2018 – Vol 23 – P. 1-13. doi:10.3390/molecules23092102
6. Лейцин. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2049/lejcin>
7. Leucine. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Leucine>
8. Применение лейцина в комплексном лечении. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://med.by/methods/pdf/12-0102.pdf>
9. Компоненты пищевых продуктов. Лейцин. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://befirst.info/articles/dietologija/komponenty/lejcin>
10. Etzel M. R. Manufacture and Use of Dairy Protein Fractions // American Society for Nutritional Sciences, 2014.
11. Winter R. A. Consumer's dictionary of food additives (7th ed.): New York: Three Rivers Press. - 2009.

12. Yang J., Yang S. Comparative analysis of *Corynebacterium glutamicum* genomes: a new perspective for the industrial production of amino acids // BMC Genomics, 2017.
13. Гусятинер М. М. Создание продуцентов аминокислот на основе бактерий *Corynebacterium glutamicum* И *Escherichia coli* // «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»: Москва. - 2017, 13 ст.
14. Yang J., Yang S. Comparative analysis of *Corynebacterium glutamicum* genomes: a new perspective for the industrial production of amino acids // BMC Genomics, 2017.
15. Zahoor A., Lindner S. N., Wendisch V. F. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products // Comput Struct Biotechnol J. - 2012. - 5 p.
16. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 ст.
17. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol 2 «The Proteobacteria», Part B: The Gammaproteobacteria, 2005.
18. Сырочая А.О., Шаповал Л.Г., и др. Аминокислоты глазами химиков, фармацевтов, биологов: в 2-х т. Том 2 / – Х. «Щедра садиба плюс», 2015 – 113-124 с.
19. Шестопалов А.Е., Зингеренко В.Б. Растворы аминокислот для парентерального питания в интенсивной терапии критических состояний // Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко. – Москва. – 2005.
20. АМИНОЛ — отечественный препарат аминокислот для парентерального питания. № 11 (332) 18 марта 2002 г. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.apteka.ua/article/12807>
21. Аминол инструкция и цена в аптеках. 2017 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://tabletki.ua/%D0%90%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%BB/>

22. *Чепишко С.І., Масимів О.О.* Актуальність проблеми оперативних втручати в целепно-лицевій хірургії та перспективи її вирішення // Клінічна хірургія. – Чернівці, 2017. – 75-76 ст.
23. *Пироговський В. Ю.* Відновлювальні операції при петлевих колостомах. Київ, 2017 [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://old.nmapo.edu.ua/zagruzka2/DrAr/Dr17_02_17-1.pdf
24. *Вонс Б. В., Чубка М. Б., Грошовий Т. А.* Проблема лікування опікових травм і характеристика лікарських засобів для місцевого лікування опіків // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2018. – Т. 11, №1(26) . – С. 119–125. DOI: 10.14739/2409-2932.2018.1.123731
25. *Данилюк М. Б.* Гіпопаратиреоз як основне ускладнення після операцій на щитоподібній залозі // Вісник наукових досліджень. – 2016. № 2. DOI 10.11603/2415-8798.2016.2.6684
26. *Черненко І.І., Чухно І.А.* Епідеміологічні та клінічні аспекти наслідків черепно-мозкової травми // Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я України, – 2017. № 4 (74).
27. Ферментеры и биореакторы [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://bio-rus.ru/stati/fermenteryi-i-bioreaktoryi.html>
28. *Грачёва И.М.* Технология ферментных препаратов. – М. :Элеватор, 2000. – 132-133 ст.
29. *Синицын А.П.* Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. – М. :Изд-во МГУ, 1995. – 224с.
30. *Стасевич М. В., Милянч А. О., Гузьова І. О. та ін.* Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв : навч. посібник для студ. вищ. навч. заклад. — Вид. 2-ге, стереотип. — Вінниця : Нова Книга, 2016. — 50-51 ст.
31. *Гапонов К. П.* Процессы и аппараты микробиологических производств: учеб. – М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1981. – 240 ст.

32. Мосичев М.С. Общая технология микробиологических производств : учеб. – М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1982. – 145 с.
33. Забор – атмосферный воздух. Большая Энциклопедия Нефти и Газа. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ngpedia.ru/id20748p1.html>
34. Блейхер И.Г. Компрессорные станции: учеб. – М.: Машгиз, 1959. – 66 ст.
35. Очистка и стерилизация воздуха. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.spec-kniga.ru/tehnokhimicheski-kontrol/obshchaya-tekhnologiya-mikrobiologicheskikh-proizvodstv/tipovaya-skema-mikrobiologicheskogo-proizvodstva-ochistka-i-sterilizaciya-vozduha.html>
36. Фильтрующие системы. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.pharmtech.ru/docs/3m/2/steril/3m_microfluor.pdf
37. Каустична сода. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.plasma.com.ua/ua/chemistry/chemistry/natrium_hidroxide.html
38. Соліклор. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://interdez.com.ua/wp-content/uploads/2014/02/METODICHNI-VKAZIVKI-shhodo-zastosuvannya-dezinfektsijnogo-zasobu-Soliklor.pdf>
39. Полідез. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://farmakos.ua/vimol.html>
40. Вімол. Мийно-дезинфікувальний засіб. 2018 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://farmakos.ua/vimol.html>
41. Фермисепт средство для мытья и дезинфекции [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://profiplus.in.ua/p772014975-fermisept-sredstvo-dlya.html>
42. ГЕМБАР - універсальний сучасний дезинфікуючий засіб із пролонгованою дією. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.attis.com.ua/site/liquid/gembar.html>
43. Ексан-про-дез миющий засіб для видалення жирових забруднень. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://novahim.com.ua/eksan-pro-dez-mojushchee-sredstvo-dlja-udalenija-zhirovih-zagrjaznenij-2>

44. Агаджанян А. Е., Оганисян Г. Ж., Егиян К. И. и др. Технологические особенности выделения и очистки различных классов биологически активных веществ из ферментационных растворов // Химический журнал Армении. - 2015. - 68. - №4. - 532-535 ст.

45. Лихач А. В. Промислова біотехнологія: методичні вказівки. — Миколаїв: Миколаївський національний аграрний університет, 2016. — 52 ст.].

46. Выделение конечных продуктов биосинтеза из клеток микроорганизмов [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://lib.kstu.kz:8300/tb/books/2018/HiHT/Derbush%20i%20dr/%D0%9B%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%B0%D1%8F%20%D1%80%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%82%D0%B0/lab3.htm>

47. Патент № RU 2268305. Лунц М. Г., Скороходова А. Ю., Машко С. В. и др. Способ получения l-аминокислот с использованием бактерий с оптимизированным уровнем генной экспрессии, 2006 г.

48. Гарбуз С. А. Общие вопросы выбора метода выделения. «Экономика и социум» №1(20), 2016. – 5 с.

49. Лихач А. В. Промислова біотехнологія: Метод. рекомендації для виконання лабораторно-практичних занять спец. 162 «Біотехнологія та біоінженерія» денної форми навч. - Миколаїв: МНАУ, 2016. – 28 с.

50. Центрифуги фільтруючі та осаджувальні. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <http://snpo.ua/uk/produksiya/tsentrifugi/tsentrifugi-filtruyuchi-ta-osadzhuvalni-z-nozhovim-vivantazhenyam-osadu-tipu-fgn-i-ogn/>

51. Центрифугирование. Классификация и система обозначения центрифуг. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.gaps.tstu.ru/win-1251/lab/sreda/togaps/6/TO_Ip/4_7.html

52. Методы выделения и очистки конечных продуктов биотехнологических производств. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://lib.kstu.kz:8300/tb/books/EUI%20Osnovy%20biotehnologicheskogo%20proizvod>

stva/lab/%D0%9F%D1%80%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%BE%D0%B5%20%D0%B7%D0%B0%D0%BD%D1%8F%D1%82%D0%B8%D0%B5%209.htm

53. Агаджанян А. Е., Оганисян Г. Ж., Егиян К. И. и др. Выделение и очистка валина выделение и очистка валина из культуральной жидкости // Химический журнал Армении. - 2002. - 55.- №4. - 121-124 ст.

54. Хроматографические методы анализа. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.chem-astu.ru/chair/study/PCMA/r3_1.htm

55. Мінаєва В. О. Практичний посібник для студентів вищих навчальних закладів: “Іонний обмін та іонообмінна хроматографія” – Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 128 с.

56. Дмитрієвський Д. І. Технологія лікарських препаратів промислового виробництва. - Вінниця: НОВА КНИГА, 2008. - 56 ст.

57. Атлас аминокислот. Лизин. [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <http://kodomo.fbb.msu.ru/~july.preobrazhencki/term1/lys.html>

58. Уголь активированный марки ОУ-А. [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <https://www.mtkisorbent.ru/ugol-aktivnyj-aktivirovannyj/ugli-aktivnye-na-drevesnoj-osnove/ugol-aktivnyj-ou-v-detail>

59. Технологічний розрахунок та типові конструкції кристалізаційного обладнання. [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <https://dl.sumdu.edu.ua/textbooks/22852/266198/index.html>

60. Кристаллизация. [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <https://chem21.info/page/169249174153085139076109044136078057051166211195/>

61. Сушіння. [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/712/sushinnya>

62. Вакуумна сушка. [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <http://bibliograph.com.ua/sushka-drevesiny/52.htm>

63. Стрічкові сушарки. [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <https://www.kazedu.kz/referat/200126/2>

64. Жидкие лекарственные формы. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <https://pharmoborudovanie.wordpress.com/2012/10/14/>
65. Лекарственные формы - плюсы и минусы. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <https://helga-uggla.livejournal.com/23789.html>
66. Кузьміна Г.І., Т.А. Пальчевська, Г.В. Тарасенко та ін. Основи матеріалознавства. Тара та упаковка готових лікарських засобів: Методичні вказівки для самостійної роботи студентів напряму підготовки 6.120201 «Фармація» спеціальності «Технологія фармацевтичних препаратів» денної форми навчання. – К.: КНУТД, 2010 – 32-39 ст.
67. Центрифуги проточні. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <https://www.dia-m.ru/news.php?newsid=50669>
68. Хроматограф промисловий К-40 Prime. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <https://helicon.ru/catalog/oborudovanie/khromatografiya/khromatografy/khromatograf-promyshlennyy-k-prime-40/>
69. Кристалізатор. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-closed-loop-industrial-pet-crystallizer-equipment-1767898307.html>
70. Вакуум-выпарная установка. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.agro-mash.ru/vakuum-vyparnaya-ustanovka.html>
71. Фасувально-пакувальна машина серії “Мастодонт”. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <https://packtech.com.ua/oborudovanie/fasovochnoe/avtomaty-serii-mastadont>
72. Роздавлена крапля [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://medical-enc.com.ua/razdavlennaya_kaplya.htm
73. Андріанова Т.В., Бобир В.В., Виноград Н.О. та ін. Медична мікробіологія, вірусологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. Заклад, видання 2-е. – Вінниця: Нова Книга, 2011. – 149 ст.

74. *Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Бородай В.В., та ін.* Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник. –Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 191-193 ст.
75. *Стабніков В.П., Лич І.В.* Основи біотехнології і фармації. Лаб. практ. для студ. напряму підготовки 6.050503 «Машинобудування» професійного спрямування «Обладнання фармацевтичної та біотехнологічної промисловості» ден. форми навчання – К.: НУХТ, 2013. – 9 ст.
76. *Куц А.М., Бондар М.В., Булій Ю.В.* Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» спец. «Технологія продуктів бродіння і виноробства»: – К: НУХТ, 2011. – 53 ст.
77. ОНАУС МВ 25 Аналізатор вологості. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1870232-ohaus-mb25-analizator.html>
78. *Фізико-хімічні і технологічні властивості порошків.* [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <https://buklib.net/books/36229/>
79. *Капустін, М. М.* Автоматизація виробничих процесів у машинобудуванні: Учеб. для вузов. - М.: Вищу школу, 2004. – 150-152 ст.

Додаток 1. Основна стаття: *Feng L., Xu J. and Zhang W.* Improved L-Leucine Production in *Corynebacterium glutamicum* by Optimizing the Aminotransferases // *Molecules*. – 2018 – Vol 23 – P. 1-13. doi:10.3390/molecules23092102



Article

Improved L-Leucine Production in *Corynebacterium glutamicum* by Optimizing the Aminotransferases

Li-Yan Feng, Jian-Zhong Xu * and Wei-Guo Zhang *

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, 1800 Lihu Road, Wuxi 214122, China; feng_li_yan@163.com

* Correspondence: xujianzhong@jiangnan.edu.cn (J.-Z.X.); zhangwg186@163.com (W.-G.Z.); Tel./Fax: +86-510-85329312 (W.-G.Z.)

Academic Editors: Jiantao Guo and Wei Niu

Received: 12 July 2018; Accepted: 20 August 2018; Published: 21 August 2018



Abstract: The production of branched-chain amino acids (BCAAs) is still challenging, therefore we rationally engineered *Corynebacterium glutamicum* FA-1 to increase the L-leucine production by optimizing the aminotransferases. Based on this, we investigated the effects of the native aminotransferases, i.e., branched-chain amino acid aminotransferase (BCAT; encoded by *ilvE*) and aspartate aminotransferase (AspB; encoded by *aspB*) on L-leucine production in *C. glutamicum*. The strain FA-1 Δ *ilvE* still exhibited significant growth without leucine addition, while FA-1 Δ *ilvE* Δ *aspB* couldn't, which indicated that AspB also contributes to L-leucine synthesis in vivo and the yield of leucine reached 20.81 ± 0.02 g/L. It is the first time that AspB has been characterized for L-leucine synthesis activity. Subsequently, the aromatic aminotransferase TyrB and the putative aspartate aminotransferases, the *aspC*, *yhdR*, *ywfG* gene products, were cloned, expressed and characterized for leucine synthesis activity in FA-1 Δ *ilvE* Δ *aspB*. Only TyrB was able to synthesize L-leucine and the L-leucine production was 18.55 ± 0.42 g/L. The two putative branched-chain aminotransferase genes, *ybgE* and *CalvE*, were also cloned and expressed. Both genes products function efficiently in BCAAs biosynthesis. This is the first report of a rational modification of aminotransferase activity that improves the L-leucine production through optimizing the aminotransferases.

Keywords: branched-chain amino acid aminotransferase; aspartate aminotransferase; *Corynebacterium glutamicum*; L-leucine

1. Introduction

Branched-chain amino acids (BCAAs), i.e., L-leucine, L-valine and L-isoleucine, are three of eight essential amino acids [1] that cannot be synthesized in animals [2]. Recently, BCAAs have been used widely in medicine, food, and feed. Furthermore, BCAAs also play a vital role in human physiological functions and metabolism [3]. In industry, BCAAs are mainly produced by microbial fermentation employing mutant strains of bacteria, such as *Corynebacterium* sp. and *Escherichia* sp. [4]. Therefore, a BCAAs producer with excellent fermentability is needed for fermentation to increase the final titer and to reduce the production cost.

Unlike the biosynthetic pathways of other amino acids, the biosynthetic pathway of BCAAs includes branched and parallel reactions catalyzed by identical enzymes (Figure 1) [5]. L-Isoleucine and L-valine are synthesized from 2-ketobutyrate and pyruvate respectively, while L-leucine is branched from the 2-ketoisovalerate in the valine pathway [6]. The synthesis of BCAAs comprises four reactions catalyzed by acetohydroxy acid synthase (AHAS; encoded by *ilvBN*), acetohydroxy acid isomeroreductase (AHAIR; encoded by *ilvC*), dihydroxyacid dehydratase (DHAD; encoded by

ilvD) and branched-chain amino acid aminotransferase (BCAT; encoded by *ilvE*) [7,8]. In addition, the synthesis of L-leucine is still catalyzed by a series of enzymes in a branched pathway. Interestingly, the enzyme of final reaction pathway is BCAT, which synthesizes different BCAAs. It is obvious that production of one BCAA is often accompanied by accumulation of the other two BCAAs as the identical enzymes participate in the biosynthetic pathway of BCAAs, thereby reducing the final titer and increasing the difficulty of extraction [9].

Previous studies have shown that the final biosynthetic step of most amino acids involves the transamination reaction which is catalyzed by PLP-dependent aminotransferases [10]. The transamination reaction is reversible and consists of two half-reactions. Firstly, the amino group of substrates is transferred onto PLP to produce 5'-phosphate pyridoxamine (PMP) and keto acid (aldehyde). Subsequently, keto acid (aldehyde) accepts the amino group of PMP to produce the amino substrate and to regenerate PLP [11,12]. In 1950, Cammarata et al. [13] and Feldman et al. [14] first proposed the transamination of BCAAs in animals and microorganisms. However, the enzyme responsible for this reaction was not characterized until 1966 [15,16]. Ichihara et al. [15] and Taylor et al. [16] reported that the transamination of three BCAAs was catalyzed by BCAT. So far, the biosynthetic pathway of BCAAs has been characterized in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* [17–19] and other strains. It was considered that the BCAT catalyzed the reactions between BCAAs and the respective keto-acids in these organisms [20]. Pyridoxal 5'-phosphate-dependent BCAT (EC 2.6.1.42, PLP dependent-BCAT) [21] encoded by *ilvE* catalyzes the transfer of the amino group from glutamic acid to keto acids in *Corynebacterium glutamicum*. PLP-dependent enzymes are divided into five types [22]. Aminotransferases occurred in the types I and IV, and BCAT belonged to PLP fold type IV [21,23].

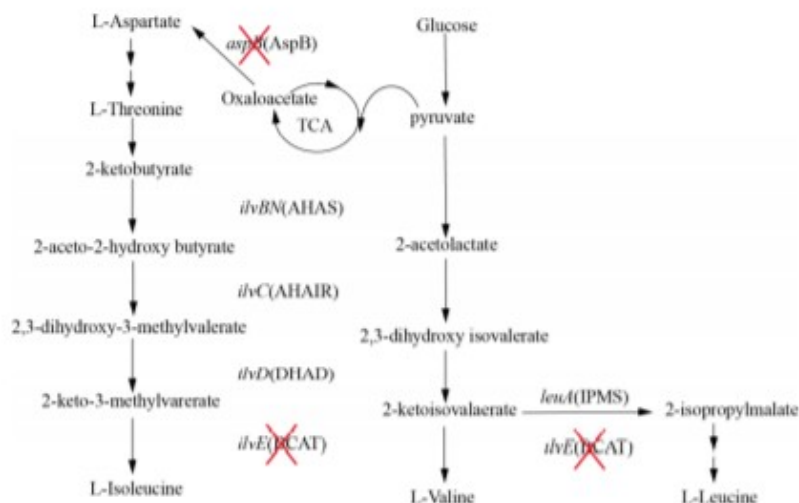


Figure 1. Biosynthesis of BCAAs. The genes and enzymes are shown in italic font and in parentheses. AHAS (*ilvBN*) acetohydroxyacid synthase, AHAIR (*ilvC*) acetohydroxyacid isomeroreductase, DHAD (*ilvD*) dihydroxyacid dehydratase, BCAT (*ilvE*) branched-chain amino acid aminotransferase, IPMS (*leuA*) 2-isopropylmalate synthase, AspB (*aspB*) aspartate aminotransferase. Deletion of genes and the respective proteins are indicated by “X”.

Bacteria possess a number of different aminotransferases according to the KEGG and UniProtKB

the definite functions of the enzymes. If one of aminotransferases is absent, it usually results in the nonexistence of a phenotype [20]. Based on the above-mentioned results, we here deleted the *ilvE* and *aspB* genes in L-leucine producer *C. glutamicum* FA-1 to construct a strain FA-1 Δ *ilvE* Δ *aspB* with no L-leucine production, and different types of aminotransferases were overexpressed to search for the specific aminotransferases to improve the L-leucine biosynthesis. The results indicate that the presence of specific aminotransferase can improve the production of leucine.

2. Results

2.1. Effect of Inactivation of *ilvE* Gene on BCAAs

The strain *C. glutamicum* FA-1 is a high-producing strain, which is used to produce L-leucine. The strain FA-1 is auxotrophic for L-isoleucine, which reduces the effect of L-isoleucine on L-leucine production (see Section 4). To interrupt the accumulation of BCAAs, we eliminated the BCAT activity by deleting the *ilvE* gene in *C. glutamicum* FA-1. In order to analyze L-leucine and/or L-valine synthesis in *C. glutamicum* FA-1 Δ *ilvE*, we assayed growth on CGXIIG (CGXII medium containing glucose) [25] medium supplemented with different BCAAs, respectively. As shown in Figure 2, *C. glutamicum* FA-1 Δ *ilvE* grew normally in CGXIIG medium supplemented with isoleucine plus valine or three BCAAs. In contrast, *C. glutamicum* FA-1 Δ *ilvE* showed no significant growth in CGXIIG medium with isoleucine and leucine. This result showed that the strain *C. glutamicum* FA-1 Δ *ilvE* was fully dependent on L-valine supply but not on the supply of L-leucine, and strongly reduced in growth without valine.

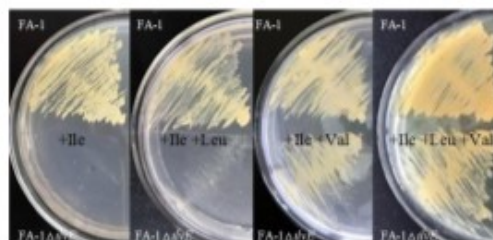


Figure 2. Growth of different *C. glutamicum* strains on different medium. At the top is shown the *C. glutamicum* FA-1, and the *C. glutamicum* FA-1 Δ *ilvE* is shown at the bottom. Growth was carried out on medium CGXIIG containing L-methionine with amino acids supplemented as indicated (each at 0.1 g/L).

The agar plate experiments demonstrated that an additional enzyme which has the ability to synthesize leucine must exist in strain FA-1 Δ *ilvE*. Subsequently, we fermented the strains FA-1 and FA-1 Δ *ilvE* in shake flasks to demonstrate their productivity. As shown in Figure 3, the L-leucine concentrations of *C. glutamicum* FA-1 and *C. glutamicum* FA-1 Δ *ilvE* were 28.11 ± 0.29 and 3.63 ± 0.14 g/L, respectively. In addition, the L-valine concentration of *C. glutamicum* FA-1 was 10.43 ± 0.26 g/L, whereas the L-valine concentration of *C. glutamicum* FA-1 Δ *ilvE* was less than 1 g/L. Moreover, the glucose decreased rapidly during the growth phase and was completely consumed within 72 h for *C. glutamicum* FA-1. In contrast, the consumption of glucose was at a low level for *C. glutamicum* FA-1 Δ *ilvE*, and the by-products were markedly increased because the pathway of glucose to BCAAs was blocked (Figure 5D). Due to the deletion of *ilvE* gene, the recombinant strain showed decreased level of aminotransferase activity, but the enzyme data clearly showed that *C. glutamicum* FA-1 Δ *ilvE* still had weak activities for the formation of L-leucine (Table 1).

Based on the abovementioned results, we found that the productivity of L-valine greatly decreased after deletion of *ilvE* gene and drastically less valine had been produced, which cannot maintain the growth of strain FA-1 Δ *ilvE*. Therefore, the normal growth could be restored by adding additional

L-valine and L-isoleucine to the medium. The remaining ability to produce the L-leucine suggested that there may be other aminotransferases acting on transamination to biosynthesize L-leucine in FA-1 Δ ilvE.

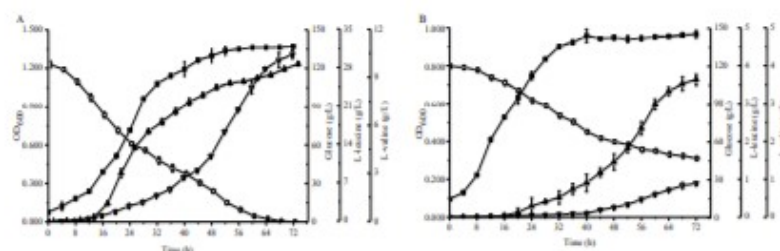


Figure 3. Comparison of the *C. glutamicum* strains FA-1 and FA-1 Δ ilvE during cultivation in shake-flasks with fermentation medium. (A) *C. glutamicum* FA-1, (B) *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE. Solid squares: OD₆₀₀, Hollow circles: Glucose, Solid triangles: L-leucine, Hollow triangles: L-valine. The data represent mean values and standard deviations obtained from three independent cultivations.

Table 1. Specific activities of transamination enzymes with leucine and valine as substrates.

Strain	Growth Conditions ^a	Aminotransferase Specific Activity (mU/mg of Protein)	
		Leucine	Valine
FA-1	+Ile	18.12 $\pm$ 2.12	10.07 $\pm$ 1.87
FA-1 Δ ilvE	+Ile + Val	2.73 $\pm$ 0.92	<1
FA-1 Δ ilvE Δ aspB	+Ile + Val + Leu + Asp	<1	<1
FA-1 Δ ilvE/pEC-XK99E-aspB	+Ile + Val	17.39 $\pm$ 2.67	<1

^a The medium CGXIIG contained L-methionine. All data represent values of three determinations of three independent experiments $\pm$ SD.

2.2. Effect of aspB on L-Leucine Production

Due to the fact *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE still had weak activities for the formation of L-leucine, we studied the effects of many native aminotransferase genes from *C. glutamicum* FA-1 on BCAAs (data not shown). Among them, an aspartate aminotransferase (AspB) -coding gene *aspB* was cloned and expressed in *ilvE* strain to construct the recombinant strain *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE/pEC-XK99E-*aspB*. Compared with the strain *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE, the leucine production was enhanced to 20.81 $\pm$ 0.02 g/L by *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE/pEC-XK99E-*aspB* (Figure 4). Interestingly, there was little change in the L-valine production as compared with *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE. Moreover, the recombinant strain *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE/pEC-XK99E-*aspB* exhibited much higher activity with leucine than the *ilvE* strain (Table 1). On the other hand, the consumption of glucose was significantly higher than that of *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE, whereas the by-products declined (Figure 5D). These results demonstrated that the aminotransferase-coding gene *aspB* could catalyze the biosynthesis of L-leucine. This may be why the strain *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE could grow in the CGXIIG without exogenous L-leucine. To further determine the effect of *aspB* on L-leucine production, we inactivated the *aspB* gene based on the *ilvE* mutant strain to construct a double mutant *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE Δ aspB, and assayed growth performance on CGXIIG with different three BCAAs and aspartate. *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE Δ aspB was fully dependent on the supply of three BCAAs plus aspartate (data not shown). In addition, activities in crude extracts of strains FA-1 Δ ilvE and FA-1 Δ ilvE Δ aspB grown on the CGXIIG were compared (Table 1), indicating that there is no detectable aminotransferase activity in strain FA-1 Δ ilvE Δ aspB. Moreover, the glucose consumption of *C. glutamicum* FA-1 Δ ilvE Δ aspB was lowest, and there were hardly any BCAAs during the fermentation (Figure 4).

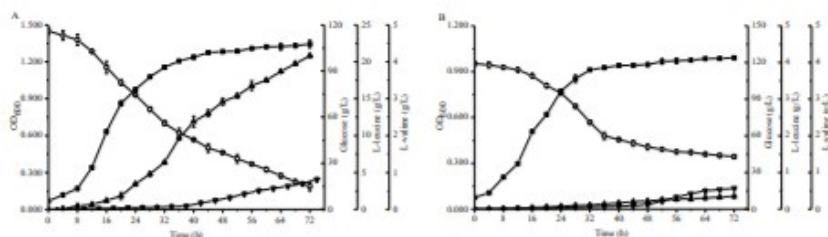


Figure 4. Comparison of the *C. glutamicum* strains FA-1ΔilvE/pEC-XK99E-aspB and FA-1ΔilvEΔaspB during cultivation in shake-flasks with fermentation medium. (A) *C. glutamicum* FA-1ΔilvE/pEC-XK99E-aspB, (B) *C. glutamicum* FA-1ΔilvEΔaspB. Solid squares: OD₆₀₀, Hollow circles: Glucose, Solid triangles: L-leucine, Hollow triangles: L-valine. The data represent mean values and standard deviations obtained from three independent cultivations.

By comparing the fermentation performance of *C. glutamicum* FA-1ΔilvE/pEC-XK99E-aspB, *C. glutamicum* FA-1ΔilvE, we found that the production of leucine was increased by expressing the gene *aspB*. Based on this, we speculated that *AspB* is also involved with L-leucine synthesis activity except for *BCAT*. From the Table 1, we found that *BCAT* was the important enzyme for L-leucine formation in parent strain, while the *AspB* exhibited lower enzyme activity. In addition, we performed growth experiments with strain FA-1ΔilvEΔaspB, the strain FA-1ΔilvE still exhibited significant growth without leucine addition (Figure 1), while FA-1ΔilvEΔaspB couldn't (data not shown), indicating that the growth of *ilvE* strain did not require leucine supply owing to the presence of *aspB*, thus confirming that this inference was correct.

2.3. Effect of Different Aminotransferases on the Biosynthesis of L-Leucine or L-Valine

According to literature and database display, *E. coli*-derived aminotransferases gene *tyrB* and *aspC* encode aromatic amino acid aminotransferase and aspartate aminotransferase [26,27], respectively. *B. subtilis*-derived aminotransferase genes *ywfG* [28] and *yhdR* encode putative aspartate amino aminotransferases, and *ybgE* gene encodes *BCAT* [28]. The aminotransferase gene *CallvE* in *C. acetobutylicum* may encode the *BCAT*. The reason for interest in these aminotransferases is that due to the broad and overlapping substrate specificities, an aminotransferase could be involved in the synthesis of many amino acids. However, the affinity for substrates was different, which could lead to catalysis of different reactions in a particular environment by the same enzyme [29,30]. To search the specific aminotransferases for L-leucine or L-valine biosynthesis, the PLP-dependent fold type I aminotransferases *TyrB*, *AspC*, *YwfG*, and *YhdR*, and fold type IV enzymes *YbgE* and *CallvE* were investigated in the *C. glutamicum* FA-1ΔilvEΔaspB strain. The recombinant strains were cultured in shake flask fermentation containing three branched-chain amino acids and aspartate, respectively. As shown in Figure 5, the maximum L-valine production by *C. glutamicum* FA-1ΔilvEΔaspB/pEC-XK99E-ybgE and *C. glutamicum* FA-1ΔilvEΔaspB/pEC-XK99E-CallvE reached 10.04 ± 0.06 and 9.83 ± 0.11 g/L, respectively, indicating that the production of L-valine can be enhanced by overexpression of *ybgE* and *CallvE* genes. However, there was no significant increase in L-valine production by other recombinant strains as compared with *C. glutamicum* FA-1ΔilvEΔaspB (Table 2).

With the overexpression of these genes, the L-leucine production by *C. glutamicum* FA-1ΔilvEΔaspB/pEC-XK99E-tyrB, *C. glutamicum* FA-1ΔilvEΔaspB/pEC-XK99E-ybgE and *C. glutamicum* FA-1ΔilvEΔaspB/pEC-XK99E-CallvE was increased to 18.55 ± 0.42 , 16.94 ± 0.29 and 16.03 ± 0.92 g/L, respectively (Figure 5). However, there were no differences in L-leucine production between other recombinant strains and *C. glutamicum* FA-1ΔilvEΔaspB (Table 2). In Table 2, we observe that the parameters of L-leucine and L-valine showed no obvious

4. Material and Methods

4.1. Bacterial Strains, Plasmids, and Growth Conditions

The bacteria and plasmids used in this study are listed in Table 4. The L-leucine-producing strain *C. glutamicum* FA-1 was derived from the wild-type strain *C. glutamicum* ATCC 13032, which was mutagenized by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) biological breeding system (Si Qing Yuan Biotechnology Co., Ltd., Beijing, China). This strain was resistant to α -aminobutyric acid and α -thiazolylalanine, and auxotrophic for L-methionine and L-isoleucine. The *E. coli* strains grew in Luria-Broth (LB) medium at 37 °C with agitation at 100 rpm. LBG (LB supplemented with 5 g/L glucose) was used for *C. glutamicum* at 30 °C with agitation at 100 rpm. The minimal medium usually used for *C. glutamicum* was CGXII with 4% (w/v) glucose [25]. When appropriate, kanamycin (Kan 25 or 50 mg/L) was added to the medium. IPTG was added to a final concentration of 1 mmol/L.

For shake flask cultivation, the cells were grown in a 500 mL conical flask containing 50 mL seed medium for 12–18 h. The seed medium contained 30 g/L glucose, 25 g/L corn syrup, 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.3 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/L methionine, 20 g/L CaCO_3 . The fermentation medium contained 130 g/L glucose, 25 g/L corn syrup, 15 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 g/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 1.3 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L isoleucine, 0.7 g/L methionine, 0.5 g/L glutamic acid, 160 $\mu\text{g/L}$ VB1, 50 $\mu\text{g/L}$ VH, 2 g/L sodium citrate, 2 g/L urea and 30 g/L CaCO_3 . The fermentation medium was supplemented with 0.6 g/L valine to culture the *ilvE*[−] strain. The *ilvE*[−] *aspB*[−] strain and recombinant strains were also grown in fermentation medium supplemented 0.6 g/L L-valine, 0.6 g/L L-leucine and 1 g/L L-aspartate. All cells were cultured at 30 °C and shaken at 100 rpm. The fermentation lasted for 72 h.

Molecules 2018, 23, 2102

11 of 13

4.4. Preparation of Cell Extracts and Enzyme Assays

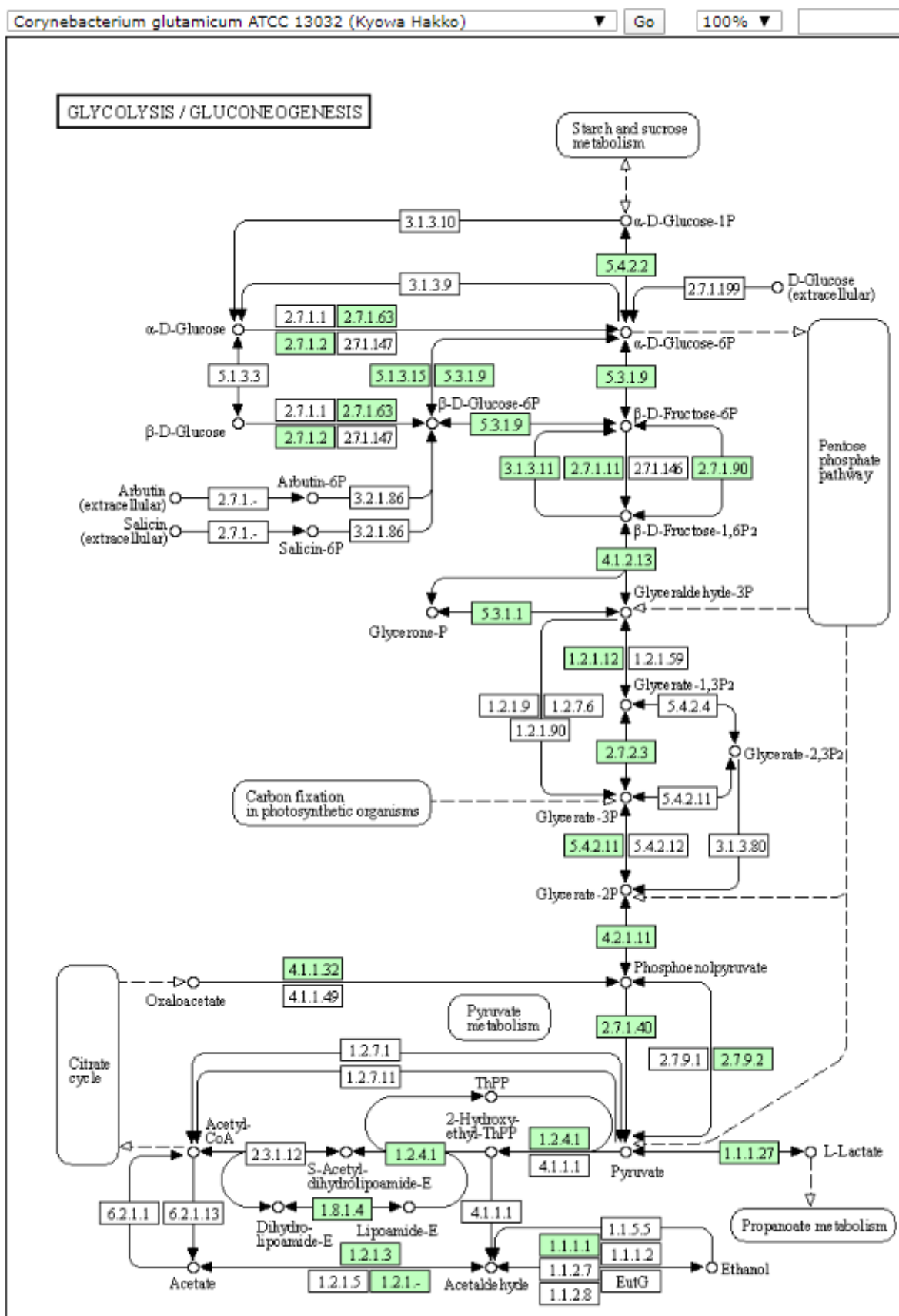
Cell crude extracts were prepared as follows. Cells were harvested by centrifugation (12,000 rpm, 20 min) at 4 °C. *C. glutamicum* cells were suspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and then cells were treated with lysozyme (20 mg/mL) at 37 °C for 1 h. Thus, the cell suspension was sonicated for 15 min on ice and the resultant sonicates were centrifuged at 12,000 rpm for 20 min at 4 °C, the supernatant fluid constituted the crude enzyme solution. The AT assay was based on the method of Marienhagen et al. [20]. Reaction mixtures contained, in a total volume of 1.0 mL, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 mM pyridoxal-5-phosphate, 5 mM α -ketoisovalerate or α -ketoisocaproate, and 10 mM sodium glutamate. The reaction was started by the addition of crude extract and was performed at 30 °C with 20 min. 30 μL of 5% perchloric acid was added to stop the reaction. The samples were centrifuged by the addition of 20 mM K_2CO_3 to remove the proteins and salts (12,000 rpm, 10 min, 4 °C).

(HPLC). One enzyme unit was defined as that the amount of enzymes which converted 1 μmol L-leucine or L-valine per min at temperature of the assay. Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. [40].

4.5. Analytical Methods

Two milliliters of samples were taken from Erlenmeyer flasks every 4 h. One milliliter of samples was used to determine the biomass concentration by measuring the OD_{600} after an appropriate dilution or dry cell weight (DCW) per liter as described previously [41]. The other 100 μL of sample was diluted 100-fold to determine the glucose by an SBA-40E immobilized enzyme biosensor (Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Shandong, China). In addition, the supernatant of fermentation broth was also used to determine the concentration of amino acids and/or organic acids. The amino acids' concentrations were determined by reversed-phase high-pressure liquid chromatography on an Agilent 1200 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with DAD detection (338 nm) after automatic precolumn derivatization with ortho-phthalaldehyde [41,42]. Separation was carried out at 40 °C on a μC18 column (particle size 5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The elution buffer consisted of a polar phase (0.1 M sodium acetate, pH 7.2) and a nonpolar phase was prepared according to the description of Hou et al. [41]. Quantification was done by calculation of concentration using an internal standard. The organic acids' concentrations were determined by HPLC (Agilent 1200) with UV detection (215 nm). Separation was carried out at 25 °C on a μC18 column (particle size 5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm, Waters, Milford, MA, USA). The elution buffer consisted of a polar phase (0.01 mol/L KH_2PO_4) and a nonpolar phase (5% acetonitrile). Quantification was done by calculation of the peak area by the external standard method [41].

Додаток 2.



Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 (Kyowa Hakko) Go 100%

Metabolic Map of Branched-Chain Amino Acid Catabolism

Threonine Pathway:

- Threonine → 2-Oxobutanoate (Enzyme: 4.3.1.19)
- 2-Oxobutanoate → (S)-2-Aceto-2-hydroxybutanoate (Enzyme: 2.2.1.6)
- (S)-2-Aceto-2-hydroxybutanoate → (R)-3-Hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoate (Enzyme: 1.1.1.86)
- (R)-3-Hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoate → (R)-2,3-Dihydroxy-3-methylpentanoate (Enzyme: 1.1.1.86)
- (R)-2,3-Dihydroxy-3-methylpentanoate → (S)-3-Methyl-2-oxopentanoate (Enzyme: 4.2.1.9)
- (S)-3-Methyl-2-oxopentanoate → L-Isoleucine (Enzymes: 2.6.1.42, 1.4.1.9)

Isoleucine Pathway:

- Isoleucine → 3-Hydroxy-3-methyl-2-oxobutanoate (Enzyme: 2.2.1.6)
- 3-Hydroxy-3-methyl-2-oxobutanoate → (R)-2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate (Enzyme: 1.1.1.86)
- (R)-2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate → 2-Oxoisovalerate (Enzyme: 4.2.1.9)
- 2-Oxoisovalerate → L-Valine (Enzymes: 2.6.1.42, 1.4.1.9)

Valine Pathway:

- Valine → 2-Methylmaleate (Enzyme: 4.2.1.35)
- 2-Methylmaleate → (R)-2-Methylmaleate (Enzyme: 4.2.1.35)
- (R)-2-Methylmaleate → Pyruvate (Enzyme: 2.3.1.182)

Common Intermediates and Final Steps:

- Pyruvate → Acetyl-CoA (Enzyme: 2.3.1.182)
- Pyruvate → Pyruvate metabolism (dashed line)
- L-Isoleucine, L-Valine, and L-Leucine → Valine, leucine and isoleucine degradation (dashed line)
- L-Leucine → 4-Methyl-2-oxopentanoate (spontaneous)
- 4-Methyl-2-oxopentanoate → L-Leucine (Enzymes: 2.6.1.6, 2.6.1.42, 1.4.1.9)

**ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF ARMENIA**

Հայաստանի քիմիական հանդես
Химический журнал Армении 68, №4, 2015 Chemical Journal of Armenia

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 577.19:602.4

**ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ
И ОЧИСТКИ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ ИЗ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ РАСТВОРОВ**

А. Е. АГАДЖАНИЯ, Г. Ж. ОГАНИСЯН, К. Н. ЕГИЯН и А. С. САГИЯН

Научно-производственный центр "Армбиотехнология"
НАН Республики Армения
Армения, 0056, Ереван, ул. Гюрджяна, 14
E-mail: armbiotech@gmail.com

Поступило 15 VII 2015

Исследованы процессы выделения и очистки различных классов БАВ из ФР, выявлены закономерности этих процессов, разработаны технологические параметры процессов и созданы эффективные технологии их выделения и очистки из ФР.

Разработан бессорбционный процесс выделения L-валина из ФР. Определены оптимальные технологические параметры кристаллизации технических кристаллов валина из раствора соляной кислоты и электромембранного способа перевода валина из гидрохлоридной формы в цвиттерионную.

Исследован процесс трансформации цитрата натрия в лимонную кислоту из пермеата ФР методом электродиализа и показано, что технологически предпочтительно проводить трансформацию до 90-95%, а трансформацию остаточного цитрата после электродиализа и обессоливания раствора осуществлять с помощью ионного обмена.

Исследован процесс выделения микробного меланина из нативного раствора с использованием ионообменных смол и определены оптимальные технологические параметры процесса сорбции и элюции.

Изучены физико-химические свойства выделенного микробного меланина и выявлен ряд структурных особенностей.

Разработана эффективная технология выделения и очистки биоингибирующего вещества из КЖ, которая позволяет получить очищенный от сопутствующих примесей продукт, имеющий сильное биоингибирующее действие на патогенные микроорганизмы.

Рис. 5, табл.1, библиограф. ссылок 47.

Особое место в биотехнологическом производстве биологически активных веществ (БАВ) занимает выделение и очистка целевого продукта из ферментационных растворов (ФР).

В процессе выделения и очистки БАВ из ФР часто приходится использовать сложные и, как правило, нестандартные индивидуальные технологические подходы, позволяющие получить целевые продукты высокой степени чистоты.

Одной из наиболее трудоемких стадий при выделении БАВ, в частности аминокислот из ФР, является обессоливание центрифугатов или пермеатов сорбционным методом. На этой стадии образуется значительное количество сорбционных и регенерационных стоков и расходуются большие объемы аммиачных растворов, которые приходится утилизировать.

Согласно оценкам экономистов, себестоимость БАВ примерно на 60% определяется затратами на стадиях выделения и очистки из ФР, поэтому разработка эффективных методов выделения и очистки БАВ, представляющих коммерческий интерес, является актуальной задачей [1].

Целью предлагаемой работы являлось исследование процессов выделения и очистки различных классов БАВ (аминокислоты, оксикислоты, микробного меланина и биоингибирующего продукта) из ФР и разработка эффективных технологий выделения и очистки вышеуказанных классов БАВ из ФР микробного синтеза.

Выделение и очистка L-валина из ФР

ФР валина, помимо целевого продукта, содержит также сопутствующие аминокислоты, окрашенные компоненты, минеральные соли и т.д. [2]. Если очистка валина от окрашенных компонентов, минеральных солей и некоторых сопутствующих аминокислот не представляет сложности, то очистка от лейцина, который по физико-химическим показателям схож с валином, связана с большими трудностями. В патентной литературе известен способ выделения и очистки валина из ФР [3]. Суть способа заключается в отделении биомассы центрифугированием, подкисление фугата до pH 1.5-2.0 и сорбцией валина на катионите КУ-2×8 в H^+ -форме и его элюции из фазы смолы аммиачной водой. Далее элюат подвергают вакуум-выпариванию, обесцвечиванию, концентрированию и выделяют технические кристаллы L-валина. Перекристаллизация технических кристаллов в горячей соляной кислоте позволяет получить целевой продукт с содержанием основного вещества 99.2-99.4%. Недостатком способа является многостадийность, что приводит к низкому выходу целевого продукта на стадии выделения и очистки. Так, нап-

пример, применение ионообменного метода извлечения валина из фугата приводит к тому, что в технологии используются несколько трудоемких стадий (сорбция, десорбция, отгонка аммиака, утилизация сорбционных и регенерационных стоков и т.д.) Существенным недостатком метода является и то, что неправильно выбраны технологические параметры солянокислой перекристаллизации и его трансформации из солевой формы в цвиттерионную.

Для выделения валина из ФР в работе [4] предлагается использовать экстракционный метод с использованием жидкого сульфокатионита (раствор динилнафталинсульфокислоты в гептане).

Возможность использования жидких сульфокатионитов для выделения аминокислот из водных сред приведена также в работе [5]. Необходимо отметить, что работы по извлечению валина из пермеатов ФР с использованием жидкого сульфокатионита, как проведенные нами, так и другими авторами работ [6], показали невозможность отделения валина от сопутствующих аминокислот (лейцин, аланин) на стадии экстракции. Если принять во внимание, что при использовании жидких катионитов возникает необходимость регенерации органического растворителя и для реэкстракции аминокислот с катионита приходится использовать водный раствор аммиака высокой концентрации (8-10%) то предложенный метод по некоторым показателям уступает способу, указанному в работе [3].

**ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ
АРМЕНИЯ**

Հայաստանի քիմիական հանդես 55, №4, 2002 Химический журнал Армении

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 547.466.25:532.78

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ВАЛИНА
ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ**

А. Е. АГАДЖАНИЯН, Г. Ж. ОГАНЕСЯН и Е. А. АГАДЖАНИЯН

Научно-исследовательский институт "Биотехнология", Ереван

Поступило 6 IX 2000

Для очистки валина от сопутствующих аминокислот изучена его растворимость в соляной кислоте в зависимости от ее концентрации и температуры раствора и получены кривые растворимости.

Исследованы процессы кристаллизации технических кристаллов валина из раствора соляной кислоты в зависимости от концентрации кислоты, соотношения твердой и жидкой фаз (т:ж) и количества используемого хлорида натрия. Изучено влияние температуры раствора на процесс изогидрической кристаллизации валина из солянокислого раствора и определены оптимальные параметры процесса. На основании полученных данных разработана технология выделения и очистки валина из культуральной жидкости микробного синтеза.

Рис. 2, табл. 1, библиографических ссылок 15.

Валин находит широкое применение в пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве и т. д. [1]

В промышленности L-валин в основном получают микробиологическим способом. Культуральная жидкость (КЖ) валина, получаемая путем выращивания продуцента в питательной среде, содержащей источники углерода, азота, а также минеральные и органические добавки, помимо целевого продукта, содержит также сопутствующие аминокислоты. Если очистка валина от некоторых из них (аланин, лизин, глутаминовая кислота, пролин) не вызывает сложности, то очистка от лейцина, который по физико-химическим показателям схож с валином, создает большие

трудности. Ввиду того, что формы кристаллов валина и лейцина пластинчатые и такие кристаллы обладают большой поверхностной активностью, то прямой кристаллизацией трудно осуществлять их разделение [2,3].

Технологические показатели по выделению и очистке валина из КЖ, а также его отделению от сопутствующих нейтральных аминокислот в основном в неполном объеме приводятся в патентной литературе.

Известен способ разделения валина от лейцина или изолейцина центрифугированием раствора смеси валина и указанных аминокислот в системе вода-спирт(C₂-C₄). В результате этого происходит экстракция валина водой с последующим отделением органического слоя и выделением валина [4].

Запатентован способ получения кристаллического валина [5], основанный на взаимодействии валиносодержащего водного раствора с *n*-изопропилбензолсульфоновой кислотой или ее солями в водной среде с последующим отделением образующихся кристаллов и выделением валина.

Изучена экстракция валина из солевых водных растворов жидким сульфокатионитом – раствором динилнафталинсульфокислоты в гептане. Рассчитано количество экстрагированного валина и определены условия его оптимальной экстракции и реэкстракции [6].

В работах [4, 6] отделение валина осуществляется в системе вода–органический растворитель, что создает дополнительные трудности, связанные с регенерацией органических растворителей; а в работах [5,6] выделение валина проводят из индивидуально чистого раствора.

Предложен способ выделения и очистки валина из водного раствора, содержащего, кроме валина, кислые аминокислоты, сульфаты, хлориды и краситель. Способ заключается в предварительной обработке ферментационного раствора кислотой или щелочью до pH 5,9 и последующей хроматографией на колонке с катионообменной смолой. Указанным способом невозможно очистить валин от лейцина [7].

Кристаллизация из раствора соляной кислоты позволяет отделять валин от лейцина [8], а также изолейцин от лейцина, треонина, аргинина, валина, лизина и глутаминовой кислоты [9].

Изучены условия разделения гидрохлорида D,L-валина на оптические антиподы [10].

Из вышеуказанных литературных данных следует, что с технологической точки зрения предпочтительно очистку валина от сопутствующих аминокислот осуществлять кристаллизацией технических кристаллов из раствора соляной кислоты с отделением гидрохлорида валина.

В вышеприведенных работах недостаточно отражены технологические параметры процесса кристаллизации (температура, соотно-

шение твердой фазы к жидкой, концентрация соляной кислоты и т. д.). Кроме того, отсутствуют данные о растворимости L-валина в растворе соляной кислоты в зависимости от концентрации кислоты и температуры раствора.

Данные о растворимости лейцина и изолейцина в соляной кислоте в зависимости от концентрации кислоты приведены в работе [11].

Целью настоящего исследования является определение указанных технологических показателей процесса выделения и очистки, что позволит значительно уменьшить количество используемых химикатов и повысить выход L-валина.

В работе [8] кристаллизацию технических кристаллов валина проводят в среде концентрированной соляной кислоты, при этом выход L-валина на стадии выделения и очистки из КЖ составляет 37%.

Экспериментальная часть

Растворимость L-валина в растворе соляной кислоты изучалась выдерживанием в термостате с периодическим отбором жидкой фазы для анализа на содержание валина. Опыты проводились в стеклянном кристаллизаторе емкостью 0,5 л, снабженном рубашкой, обратным холодильником и мешалкой. К 200 мл раствора соляной кислоты соответствующей концентрации добавлялось такое количество кристаллов валина, чтобы после установления равновесия оставались нерастворенные кристаллы ($\geq 0,5$ л), которые от раствора отделяли фильтрацией. При фильтрации во избежание кристаллообразования воронку и приемник термостатировали. Осадок отжимали, высушивали и взвешивали.

Содержание валина и сопутствующих аминокислот в растворе определяли с помощью аминокислотного анализатора "ААА-881" (ЧССР) [12] и спектрофотометрически [13].

Исследование влияния температуры на процесс изогидрической кристаллизации валина из солянокислого раствора технических кристаллов проводили путем отбора проб жидкой фазы раствора с интервалом температуры в 5°C. Перед отбором проб перемешивание раствора прекращалось на 2 мин. За это время верхняя часть объема раствора очищалась от кристаллов, что давало возможность отобрать пипеткой жидкую фазу. В случае плохого расслоения массы использовали пипетки, снабженные фильтром для отделения твердых частиц.

Приведенные на кривых и в таблице экспериментальные данные являются средними по трем опытам.

В работе использовались аминокислоты фирмы "Reanal" (Будапешт) и производства НИИ "Биотехнология" (РА); ионообменные смолы КУ-2-8,

состоянием раствора, близким к состоянию минимального пересыщения, когда наступает динамическое равновесие между твердой и жидкой фазами. Дальнейшее снижение температуры раствора не оказывает существенного влияния на процесс кристаллизации. Приведенное исследование кинетики кристаллизации гидрохлорида валина показывает, что формирование и рост кристаллов целесообразно осуществлять при температуре массовой кристаллизации с выдерживанием раствора в изотермических условиях в течение периода кристаллообразования. Для сокращения продолжительности кристаллизации необходимо быстрее охладить раствор до состояния пересыщения, при котором наступает массовая кристаллизация, а равномерное перемешивание и изотермические условия благоприятны для формирования и роста кристаллов.

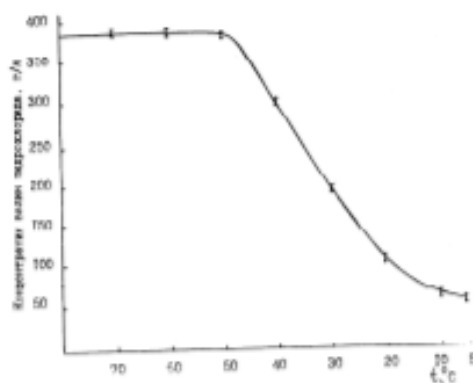


Рис. 2 Изменение концентрации гидрохлорида валина в растворе в зависимости от температуры охлаждения.

Получение валина из отфильтрованных чистых кристаллов гидрохлорида осуществляли обесцвечиванием водного раствора гидрохлорида осветляющим активным углем марки "ОУ-А" и нейтрализацией обесцвеченного фильтрата до pH 6,0. Исследования показали, что для легкого отмывания образовавшейся неорганической соли от выпавших кристаллов валина нейтрализацию раствора гидрохлорида валина нужно осуществлять концентрированным раствором аммиачной воды. Выпавшие кристаллы валина отделяли от маточного раствора фильтрацией и водной промывкой до отсутствия иона хлора в фильтрате. В конце кристаллы промывали этиловым спиртом и подвергали вакуум-сушке. Для извлечения остаточного валина из маточного раствора нейтрализации раствор обессоливали пропусканием через сильноокислый катионит КУ-2-8 в H⁺-форме и среднеосновной анионит ЭДЭ-10П в OH⁻-форме. Далее обессоленный раствор упаривали до содержания СВ 48-50% и водной кристаллизацией выделяли кристаллы L-валина. Высушенные кристаллы объединяли с остальным продуктом.

Выход L-валина из КЖ составляет 51,4 %, содержание валина в полученном продукте – 99,6%, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +27,8^\circ (c=8, \text{ в HCl})$ [15].