



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” березня 2025 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

САВЧУК Олександр Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Escherichia coli* з метою одержання фенілаланіну»

керівник роботи ПИРОГ Тетяна Павлівна, д.б.н., проф.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-к

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до *Escherichia coli*; цільовий продукт: фенілаланін; геометричний об'єм ферментера: 1 м<sup>3</sup>; коефіцієнт заповнення: 0,7

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; біосинтез цільового продукту; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; основні етапи виділення та очищення цільового продукту; контроль виробництва;

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу фенілаланіну – 3 аркуші формату А1

Апаратурна схема біосинтезу фенілаланіну – 2 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Характеристика цільового продукту</i>	01.03.2025 - 09.03.2025	
2	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	10.03.2025 - 16.03.2025	
3	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	17.03.2025 - 30.03.2025	
4	<i>Біосинтез цільового продукту</i>	31.03.2025 - 06.04.2025	
5	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	07.04.2025 - 20.04.2025	
6	<i>Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу</i>	21.04.2025 - 27.05.2025	
7	<i>Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу</i>	28.04.2025 - 04.05.2025	
8	<i>Основні етапи виділення та очищення цільового продукту</i>	05.05.2025 – 15.05.2025	
9	<i>Контроль виробництва</i>	16.05.2025 – 23.05.2025	
10	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	24.05.2025 - 25.05.2025	
11	<i>Оформлення графічної частини</i>	26.05.2025 - 28.05.2025	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	7
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. Характеристика фенілаланіну.....	13
1.1. Фізико-хімічні властивості.....	13
1.2. Практичне застосування фенілаланіну .....	12
1.2.1. Фенілаланін як складник лікарських засобів.....	14
1.2.2. Фенілкетонурія.....	15
1.2.3. Фенілаланін у складі харчових добавок.....	16
1.2.4. Фенілаланін як компонент косметичних засобів.....	17
1.2.5. Інші сфери використання фенілаланіну.....	18
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	19
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	19
2.2. Розрахунок складу поживного середовища для досліджуваних біологічних агентів.....	26
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента..	42
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	44
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	45
3.1. Розрахунок потреби у фенілаланіні.....	45
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	51
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу фенілаланіну.....	52
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу фенілаланіну <i>Escherichia coli</i> X11p21.....	53
РОЗДІЛ 4. Біосинтез фенілаланіну при культивуванні <i>Escherichia coli</i> x11p21.....	56
4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату біологічним агентом.....	56
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у фенілаланін.....	57
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	62

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	62
5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	64
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	66
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів.....	66
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва фенілаланіну.....	73
5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	78
5.4.1. Обґрунтування необхідності приготування підживлювального розчину..	79
5.4.2. Розрахунок кількості мінорних компонентів середовища та обґрунтування необхідності приготування запасного розчину біотину.....	80
5.4.3. Розрахунок кількості тирозину для кожної стадії виробництва і особливості його приготування.....	81
5.4.4. Розрахунок кількості дріжджового екстракту і глюкози для кожної стадії і особливості приготування їх розчинів.....	82
5.4.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в колбах на качалках.....	82
5.4.6. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л.....	86
5.4.7. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 130 л.....	87
5.4.8. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м <sup>3</sup> .....	89
5.4.9. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника.....	90
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	93
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми біосинтезу фенілаланіну.....	99
РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення фенілаланіну.....	109
8.1. Обґрунтування вибору методу відділення біомаси <i>Escherichia coli</i> xllp21 з культуральної рідини.....	109
8.2. Обґрунтування вибору методу виділення фенілаланіну .....	111
8.3. Обґрунтування стадії концентрування елюенту .....	116

8.4. Обґрунтування методу кристалізації фенілаланіну .....	117
8.5. Обґрунтування вибору методу сушіння кристалів фенілаланіну .....	120
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва.....	125
9.1. Мікробіологічний контроль.....	125
9.2. Показники росту і синтезу фенілаланіну .....	127
9.2.1. Визначення концентрації біомаси.....	127
9.2.2. Визначення кількості фенілаланіну.....	128
9.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону та Нітрогену.....	128
ЛІТЕРАТУРА.....	131
ДОДАТКИ.....	149

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота створена з метою розроблення технологічної та апаратурної схем біосинтезу амінокислоти фенілаланіну за участі генетично модифікованого мікроорганізму *Escherichia coli* X1p21, який характеризується високою концентрацією синтезованого цільового продукту (73 г/л). На фармацевтичному ринку України фенілаланін випускається як дієтична добавка, у складі протипухлинного препарату та розчинів для парентерального харчування. З метою забезпечення українських компаній цією амінокислотою для виготовлення відповідної продукції розрахована потужність виробництва сягає 1 102 кг цільового продукту (21 м<sup>3</sup> культуральної рідини) за рік.

Технологія виробництва фенілаланіну супроводжується низкою допоміжних робіт (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl і NaOH; підготовка і стерилізація запасного розчину біотину, підживлювального розчину глюкози; приготування і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три етапи вирощування посівного матеріалу: у колбах на шейкері, в інокуляторах об'ємом 15 та 130 л; біосинтез у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup> зі коефіцієнтом заповнення 0,7). Описано методики визначення концентрацій біомаси, джерела вуглецю (глюкози), Нітрогену (амонійного азоту) та цільового продукту — фенілаланіну.

Зміст кваліфікаційної роботи викладено на 149 сторінках, що містять 22 таблиці, 21 рисунок, та складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури, технологічної схеми (формат A1, 3 аркуші) та апаратурної схеми (формат A1, 2 аркуші).

**Ключові слова:** фенілаланін, біосинтез, *Escherichia coli* X1p21, дієтична добавка, парентеральне харчування, онкозахворювання.

## ABSTRACT

The qualification work was created with the aim of designing the technological and equipment schemes for the biosynthesis of the amino acid phenylalanine using the genetically modified microorganism *Escherichia coli* Xllp21, which is characterized by a high concentration of the synthesized target product (73 g/L). On the pharmaceutical market of Ukraine, phenylalanine is available as a dietary supplement, as part of an antineoplastic drug, and in solutions for parenteral nutrition. In order to provide Ukrainian companies with this amino acid for the manufacture of relevant products, the calculated production capacity reaches 1,102 kg of the target product (21 m<sup>3</sup> of culture fluid) per year.

The technology for producing phenylalanine involves a number of auxiliary tasks (preparation of sterile aeration air, preparation of HCl and NaOH titration solutions; preparation and sterilization of a spare biotin solution, glucose feed solution; preparation and sterilization of nutrient media) and a technological process (three stages of seed material cultivation: in flasks on a shaker, in 15 and 130 liter inoculators; biosynthesis in a 1 m<sup>3</sup> fermenter with a filling coefficient of 0.7). Methods for determining the concentrations of biomass, carbon source (glucose), nitrogen (ammonium nitrogen), and the target product—phenylalanine—are described.

The qualification thesis comprises 149 pages, including 22 tables and 21 figures, and consists of an introduction, nine chapters, a list of references, a technological scheme (A1 format, 3 sheets), and an equipment scheme (A1 format, 2 sheets).

Keywords: phenylalanine, biosynthesis, *Escherichia coli* Xllp21, dietary supplement, parenteral nutrition, oncological diseases.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ХМ	хоризматмутаза
ПД	префенатдегідратаза
МПА	м'ясо-пептонний агар
ПХ	парентеральне харчування
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
КФ	класифікація ферментів
КоА	коензим А
ДР	допоміжні роботи
ТП	технологічний процес
ВУ	об'єм колонки

## ВСТУП

Фенілаланін, будучи незамінною амінокислотою, що поступає в організм людини виключно з раціону, виконує ключову роль у синтезі білків, катехоламінових нейромедіаторів і тирозину. Еволюційна відсутність метаболічного шляху, що забезпечує ендогенний синтез цієї амінокислоти, у поєднанні з її важливими функціями, зумовлює актуальність промислового виробництва фенілаланіну для задоволення потреб людства [1,2].

Дана амінокислота відіграє значну роль у різноманітних галузях: на фармацевтичному ринку випускається як дієтична добавка, у складі протипухлинного препарату та розчинів для парентерального харчування; її використовують як вихідну речовину для синтезу штучного підсолоджувача аспартаму, як компонента косметичних засобів; має потенціал у сфері діагностики та природоохоронної діяльності [3-9].

Існують різні підходи до отримання амінокислот: хімічний синтез, мікробіологічний синтез та екстракція з природних джерел. Перший спосіб є поширеним промисловим методом для великомасштабного виробництва окремих амінокислот, проте пов'язаний з низкою суттєвих недоліків. Зокрема, широке використання невідновних токсичних реагентів та каталітичних комплексів на основі дорогоцінних металів призводить до значного забруднення довкілля та утворення значної кількості токсичних побічних продуктів. Крім того, хімічний синтез зазвичай призводить до отримання рацемічної суміші енантіомерів, що вимагає додаткових стадій розділення [10,11]. На відміну від хімічного синтезу, мікробіологічний синтез фенілаланіну позбавлений цього недоліку. Окрім того, він демонструє вищу ефективність і є екологічно більш прийнятним [12].

У клінічній практиці парентеральне харчування є важливим методом забезпечення організму нутрієнтами при неможливості або недостатності ентерального чи перорального надходження [13]. Препарати для парентерального

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>		
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробив		Савчук О.О.			Літера	Аркцш	Аркцшів
Консульт.						10	3
Керівник		Пирог Т.П.			<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. контр.							
Зав. каф.		Стабніков В.П.					
<b>ВСТУП</b>							

харчування, згідно з сучасною класифікацією, поділяються на три основні групи: джерела енергії, амінокислотні розчини та жирові емульсії. Препарати амінокислот при повільному введенні ефективно засвоюються, сприяють позитивному азотистому балансу та компенсації білкової недостатності [14].

Фенілаланін є важливим нутрієнтом у контексті нейродегенеративних та онкологічних захворювань. При хворобі Паркінсона, поширеному неврологічному розладі, фенілаланін може сприяти зменшенню деяких неврологічних проявів: ригідність м'язів, погіршення пам'яті та депресивні стани [15]. Перетворення фенілаланіну на дофамін є ключовим процесом у регуляції настрою та когнітивних функцій, що підкреслює його потенційну роль у подоланні психологічних проблем [3]. В онкології, де в Україні щорічно реєструється значна кількість нових випадків, препарат Алкеран, що містить мелфалан (похідне фенілаланіну), є ефективним алкілюючим агентом, який застосовується у лікуванні різних видів раку [4].

Природні мікроорганізми характеризуються обмеженою здатністю до накопичення фенілаланіну у високих концентраціях. Це зумовлено наявністю регуляторних механізмів, що контролюють біосинтез цієї амінокислоти на рівнях синтезу ферментів (репресія кінцевим продуктом) та їхньої активності (алостеричне інгібування). Для досягнення надсинтезу цільового продукту застосовують регуляторні та ауксотрофні мутанти або генетично модифіковані штами мікроорганізмів [16].

Продуцентами фенілаланіну можуть бути штами *Escherichia coli* Xllp21, *Corynebacterium glutamicum*, *E. coli* PHE07, *E. coli* xllp3 та *E. coli* HD-A2 [17-21]. Однак *E. coli* Xllp21 має суттєві переваги над іншими, оскільки виявляє найбільшу швидкість та здатність до біосинтезу цільового продукту (72,9 г/л).

У межах даної кваліфікаційної роботи поставлено за мету здійснити проектування промислової ділянки, призначеної для реалізації доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу фенілаланіну. Ключовим результатом роботи стала розробка комплексної технологічної та апаратурної схеми для ефективного промислового культивування штаму *Escherichia coli* Xllp21 з метою отримання цільового продукту.

Новизна даної кваліфікаційної роботи полягає розробці потенційної промислової технології на основі штаму *Escherichia coli* X11p21, що вирізняється високою синтезувальною здатністю (72,9 г/л) за умови росту на дешевому поживному середовищі та нетривалого періоду культивування (52 год).

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕНІЛАЛАНІНУ

### 1.1. Фізико-хімічні властивості

Фенілаланін ( $\alpha$ -аміно- $\beta$ -фенілпропіонова кислота) – незамінна протеїногенна ароматична  $\alpha$ -амінокислота. За зовнішнім виглядом - кристалічний порошок білого або майже білого кольору. Брутто-формула -  $C_9H_{11}NO_2$ , молекулярна маса – 165,19 г/моль, температура плавлення – 283 °С [22,23].

Вперше був виділений в 1879 р. з паростків люпину (*Lupinus luteus*), а в 1882 р. Ерленмеєр та Ліпп успішно здійснили його синтез з фенілацетальдегіду, ціаніду водню та аміаку [24]. Генетичний кодон фенілаланіну був ідентифікований у 1961 р. Маттеєм і Ніренбергом [25].

За хімічною будовою амінокислота є похідною аланіну з фенольним замісником в  $\beta$ -карбоні. (рис 1.1.). Гідрофобна природа бічного радикалу робить фенілаланін неполярним. Існує він у двох оптично ізомерних формах L- і D- і у вигляді рацемату (DL). Помірно розчинний у воді, в розведених мінеральних кислотах і розчинах гідроксидів лужних металів; дуже мало розчинний в етанолі; майже не розчинний в ефірах. [23].

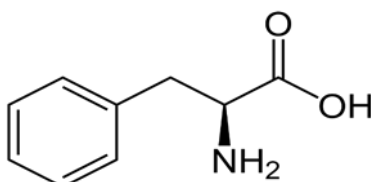


Рис. 1.1. Молекула фенілаланіну

Міститься в багатих на білок продуктах, таких як молоко, яйця, сир, арахіс, боби сої, насіння соняшника, м'ясо та інше [22].

### 1.2. Практичне застосування фенілаланіну

На промисловий ринок дана амінокислота випускається як дієтична добавка, у складі штучного підсолоджувача аспартама, застосовується в косметичній, діагностичній та природоохоронній областях [3-9].

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>			
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Савчук О.О.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕНІЛАЛАНІНУ	Літера	Аркцш	Аркцшів
Консульт.							13	6
Керівник		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Стадніков В.П.						

### 1.2.1. Фенілаланін як складник лікарських засобів

Саме L-енантіомер цієї амінокислоти відповідає за біологічні функції. Він відіграє важливу роль у підтримці нормальної роботи центральної нервової системи, зокрема при хронічному болю, депресії та інших порушеннях, пов'язаних із дисфункцією нервової системи. Бере участь у синтезі нейромедіаторів, таких як норадреналін, адреналін і дофамін, а також є попередником тирозину. Фенілаланін має багато цінних властивостей як ноотропний засіб: підвищує мотивацію, покращує увагу, концентрацію та настрій, зменшує тривожність [1].

Випускається амінокислота у вигляді капсул або у формі розчину для інфузій (рис. 1.2).



Рис. 1.2. Дієтична добавка «L-Фенілаланін» від виробника Bekandze (зліва), Розчин для інфузій «Аміносол» від виробника Nemofarm (справа)

Алкеран - це хіміотерапевтичний препарат, який використовується для лікування множинної мієломи та раку яєчників (рис. 1.3). Він зв'язується з молекулою ДНК ракових клітин та інтеркалює між парами основ, порушуючи нормальну структуру та функції нуклеїнової кислоти. Таке пошкодження ДНК перешкоджає реплікації ракових клітин і зрештою призводить до їхньої загибелі. Діючою речовиною цього препарату є мелфалан, який за своєю хімічною структурою є похідним азотистого іприту та фенілаланіну (рис. 1.4) [26, 27].



Рис. 1.3. «Алкеран» від виробника Aspen

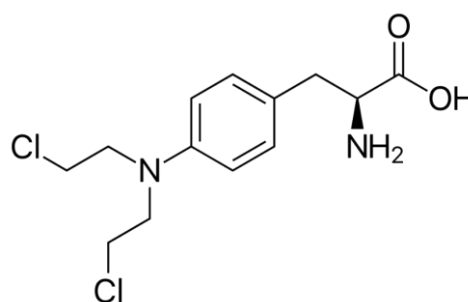


Рис. 1.4. Структурна формула мелфалану

### 1.2.2. Фенілкетонурія

Фенілкетонурія - це рідкісне аутосомно-рецесивне вроджене порушення метаболізму фенілаланіну. Дефіцит ферменту фенілаланінгідроксилази (ФАГ) в печінці перешкоджає повному або частковому перетворенню амінокислоти в тирозин, що призводить до високих рівнів фенілаланіну в крові. Через гематоенцефалічний бар'єр він проникає у мозок та спричиняє негативний вплив на його розвиток і функціонування. Хоча повне вилікування хвороби неможливе, важливо контролювати її перебіг і запобігати ускладненням. Для цього слід дотримуватися суворої дієти з обмеженням продуктів, багатих на фенілаланін і аспартам, а також приймати необхідні ліки та спеціальні харчові добавки для підтримання нормального рівня амінокислот в організмі [28].

Сапроптерин - діюча речовина препарату «Кюван» - імітує дію природного 6R-тетрагідробіоптерину (6R-BH<sub>4</sub>), що є кофактором гідроксилаз ароматичних амінокислот (рис. 1.5). Лікарський засіб активує ФАГ, сприяючи нормалізації окисного розщеплення амінокислоти, що дозволяє знизити її накопичення в організмі

та покращити здатність до засвоєння фенілаланіну, що надходить із продуктами харчування [29].



Рис. 1.5. «Куван» від виробника Merck Serono

### 1.2.3. Фенілаланін у складі харчових добавок

NutraSweet є торговою маркою аспартаму (рис.1.6.) – штучного підсолоджувача, що перевищує цукор за рівнем солодкості приблизно у 200 разів. Завдяки своїй високій інтенсивності підсолодження та низькій калорійності, аспартам широко застосовується в харчовій промисловості. Зокрема, він входить до складу газованих напоїв, жувальних гумок, розчинної кави, готових сніданків і кондитерських виробів [6].



Рис. 1.6. Упаковка аспартаму від виробника NutraSweet

Аспартам являє собою метиловий естер дипептиду, що складається із L- $\alpha$ -аспарагінової кислоти та L-фенілаланіну (рис. 1.7). Після надходження в організм аспартам піддається гідролізу під дією травних ферментів, зокрема естераз і пептидаз. У процесі розщеплення утворюються окремі складові сполуки, серед яких

аспарагінова кислота, фенілаланін і метанол. Останній зазнає подальшого метаболічного перетворення, в результаті якого утворюються формальдегід та мурашина кислота [6].

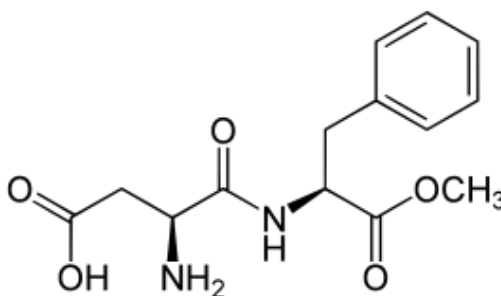


Рис. 1.7. Структурна формула аспартаму

Безпечність аспартаму є предметом пильної уваги та дискусій. Регуляторні органи, такі як Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) та Європейська агенція безпеки харчової продукції (EFSA), неодноразово визнавали аспартам безпечним для людини в межах встановлених допустимих добових норм споживання [6].

Однак, у 2023 р. Міжнародне агентство з дослідження раку (IARC), що входить до складу Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO), класифікувало аспартам як «можливо канцерогенний для людини» (група 2B), що свідчить про обмеженість доказів його потенційної здатності викликати рак [30]. IARC зазначає, що ця класифікація не є остаточною, та вимагає проведення додаткових досліджень для кращого розуміння потенційного ризику раку, який спричиняє підсолоджувач.

#### **1.2.4. Фенілаланін як компонент косметичних засобів**

Фенілаланін в сфері косметики в основному використовується як засіб для кондиціонування шкіри та волосся та має важливе медичне застосування при пігментації шкіри. При нанесенні на шкіру та волосся зменшує втрату води та зберігає зволоженіми. Він також зменшує ефекти старіння, такі як зморшки, тонкі лінії та темні плями, що утворюються на шкірі через старіння та вплив зовнішніх факторів. Використовується у складі кремів, тонерів, засобів для захисту від сонця та інших засобах по догляду за шкірою та волоссям [7].

Фенілаланін бутирамід (ФБ) – синтетична похідна масляної кислоти, зберігає корисні фармакокінетичні властивості вихідної сполуки, уникаючи при цьому її неприємні сенсорні та хімічні обмеження, що обмежували використання в дерматології. Це багатообіцяюче рішення для препаратів по догляду за шкірою. Дослідження показують, що ФБ ефективно проникає в шкіру, не потрапляючи в кров, і виявляє значну заспокійливу, депігментуючу та освітлювальну дії, знімає почервоніння, про що свідчить помітне зниження еритемного індексу, покращує еластичність та пружність шкіри [31, 32].

### **1.2.5. Інші сфери використання фенілаланіну**

Нещодавнє дослідження підтвердило ефективність D-амінокислот (на прикладі D-фенілаланіну та етидроновної кислоти) як інгібіторів мікробної корозії сульфатредуючими бактеріями [33]. Подальші експерименти з цими речовинами можуть дати нове розуміння того, як боротись з біоплівкою.

2-фенілетанол, синтезований мікробіологічним методом з L-фенілаланіну, використовується як ароматизатор в харчовій, парфумерній та косметичній промисловостях; є попередником 2-фенілетилацетату, що застосовується як ароматизатор з квітковим та трояндовим запахом [8].

Фторильовані похідні L- та D-фенілаланіну можуть використовуватись як радіофармацевтичний препарат при позитронно-емісійній томографії (ПЕТ). Даний вид молекулярної візуалізації надає інформацію про метаболізм пухлини, що дозволяє більш точно діагностувати та визначати терапевтичну відповідь у нейроонкології, порівняно, наприклад, з магнітно-резонансною томографією (МРТ). ПЕТ добре підходить для розмежування новоутворень від неспецифічних змін, викликаних хіміотерапевтичним лікуванням, використовується для раннього виявлення пухлин і метастазів, а також є визнаним інструментом для діагностики, стадіювання та планування лікування різних злоякісних новоутворень [9].

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

В 70-90-ті роки мікробний синтез фенілаланіну розроблявся з використанням мутантів *Corynebacterium glutamicum* [34-36], а також *Escherichia coli* [37, 38] і *Bacillus subtilis* [39].

Першим біологічним агентом в мікробних технологіях одержання фенілаланіну був *C. glutamicum*. Класичний метод підготовки корінебактерій для синтезу амінокислоти фокусувався на одержанні ауксотрофів за тирозином та регуляторних мутантів, стійких до аналогів фенілаланіну (4-флуорофенілаланін та р-амінофенілаланін), реалізацією випадкового мутагенезу N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідином [34].

Окрім класичних генетичних підходів, штами мікроорганізмів покращували за допомогою технології рекомбінантної ДНК [40, 41]. Значне збільшення виробництва фенілаланіну було досягнуто шляхом ампліфікації генів, відповідальних за синтез ферментів хоризматмутази та префенатдегідратази [42, 43]. З накопиченням інформації про метаболізм та генетику корінебактерій розвивалась метаболічна інженерія для синтезу фенілаланіну в *C. glutamicum*, яка була заснована на: інтенсифікації реакцій, що обмежують швидкість шикіматного та пентозофосфатного шляхів, збільшенні кількості фосфоенолпірувату, модифікації транспортної системи для ароматичних амінокислот та блокуванні конкурентних шляхів [44]. Поєднання генної та метаболічної інженерії дозволило створити кілька перспективних штамів *C. glutamicum*, однак кількість синтезованого ними цільового продукту все ще значно поступається концентрації фенілаланіну, отриманій *E. coli*.

Варто зазначити, що між цими біологічними агентами існують розбіжності у метаболізмі ароматичних амінокислот. В *E. coli* є три ізоферменти ДАГФ-синтази,

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>					
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b>					
Розробив	Савчук О.О.							Літера	Аркцш	Аркцшів
Консульт.									19	26
Керівник	Пирог Т.П.							<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. контр.										
Зав. каф.	Стадніков В.П.									

що кодуються *aroG*, *aroF* і *aroH* та інгібуються фенілаланіном, тирозином і триптофаном відповідно. У *S. glutamicum* наявні два ізоферменти 3-дезоксид-арабіногептулозо-7-фосфатсинтази, які кодуються генами *aroG* та *aroF* та інгібуються фенілаланіном, хоризматом, префенатом і тирозином та тирозином відповідно.

Також в *E. coli* ферменти хоризматмутаза та префенатдегідратаза, що кодуються геном *PheA*, інгібуються фенілаланіном та тирозином, а у *S. glutamicum* хоризматмутаза та префенатдегідратаза кодуються генами *csm* і *pheA*, відповідно. Дослідження показали, що на відміну від кишкової палички, в *S. glutamicum* на активність ХМ (хоризматмутази) не впливають фенілаланін, триптофан чи тирозин, тоді як активність ПД (префенатдегідратази) інгібується фенілаланіном [45].

Ці відмінності метаболізму сприяють складності регулювання біосинтезу амінокислоти у корінебактерій, тому для мікробного синтезу цільового продукту частіше використовують *E. coli*.

Через значну роль фосфоенолпірувату було проведено багато маніпуляцій з геном *ppsA*, що кодує фосфоенолпіруватсинтазу, для збільшення синтезу цієї сполуки. В статті [46] для покращення доступності внутрішньоклітинного фосфоенолпірувату інактивували піруваткінази, що кодуються генами *PycA* та *PycF*. Ця стратегія була застосована для підвищення додаткової доступності фосфоенолпірувату для синтезу шикімової кислоти в *E. coli*. Штами з видаленими *pycA* та *pycF* можуть мати вищі концентрації внутрішньоклітинного ФЕП, який спрямовуватиметься на шлях синтезу фенілаланіну.

Ще одним методом збільшення синтезу цільового продукту є інтеграція у *S. glutamicum*, що продукує триптофан, плазмиду, який містить гени, що кодують ферменти ДАГФ-синтазу (3-дезоксид-арабіногептулозо-7-фосфатсинтази), ХМ та ПД від регуляторних мутантів *S. glutamicum*, у яких кожен з відповідних ферментів десенсибілізований до ретроінгібування. Внаслідок цього було успішно перенаправлено потік вуглецю з триптофану на фенілаланін [47].

У 2024 р. опубліковано статтю [48], в якій повідомляється про одержання L-фенілаланіну біоконверсією недорогих ароматичних прекурсорів (бензальдегіду або

бензилового спирту). Спочатку шляхом скринінгу та коекспресії ферментів треонінальдолази та L-фенілаланіндегідратази було отримано ключовий проміжний продукт біосинтезу амінокислоти – фенілпіруват, а додаткове введення енамінодезамінази дозволило додатково підвищити пул фенілпірувату на 16,3%. Потім було сконструйовано кофакторно-самодостатній шлях виробництва L-фенілаланіну з бензилового спирту - процес, в якому НАДН/НАД<sup>+</sup> в різних окисно-відновних станах взаємоперетворюються за допомогою ферментів бензил-алкогольдегідрогенази і фенілаланіндегідрогенази і не потребують відновника, що підвищує ефективність біотрансформації. Проте розроблений підхід має суто наукове значення і поки що не може бути використаний для одержання фенілаланіну, оскільки концентрація амінокислоти становить всього 1,1 г/л.

Як продуценти надсинтетики фенілаланіну вивчались *E. coli* Xllp21, *S. glutamicum* (назва штаму відсутня), *E. coli* PHE07, *E. coli* xllp3 та *E. coli* HD-A2.

Для того, аби збільшити концентрацію синтезованого цільового продукту, над *E. coli* W3110 було проведено ряд маніпуляцій метаболітної та генетичної інженерії: інактивовано фосфотрансферазну систему, забезпечено надекспресію генів *galP* та *glk*, що привело до підвищення швидкості поглинання глюкози під час ферментації; внаслідок мутагенезу в С-кінцевому структурному спіраль-поворот-спіраль мотиві *TyrR* було посилено біосинтетичний шлях; точно налаштовано надекспресію ферменту *AroD*, що покращила швидкість поглинання глюкози; здійснено дерегуляцію зворотного інгібування ДАГФ-синтази, ХМ і ПД щоб спрямувати потік вуглецю від центрального метаболізму до фенілаланіну; виділено ауксотрофний за тирозином штам [17].

Збільшення концентрації цільового продукту в порівнянні з диким штамом в *S. glutamicum* було досягнуто шляхом надекспресії ключових генів *ppsA*, *tktA*, *aroE*, *aroA*, *aroL* і *tyrB*, *pheA<sup>fbr</sup>* і *aroF<sup>fbr</sup>*; видалення генів *ptsI*, *aceE* та *ldh*, інтеграції зчеплених генів *iolT2-ppgK* у ділянку *ptsI* та інактивації *aroP* [18], а в *E. coli* PHE07 - шляхом модифікації регулятора *FruR* методом мутагенезу [19].

Аби досягти надсинтезу амінокислоти штамом *E. coli* xllp3 - 61.3 г/л, *E. coli* W3110 піддали регуляції експресії *AroK* в залежності від внутрішньоклітинної

концентрації фенілаланіну, що привело до посилення регуляції транскрипції інших генів цього шляху [20].

Щоб підвищити концентрацію фенілаланіну в штамі *E. coli* HD-A2 надмірно експресували гени *aroF*, *pheA<sup>fbr</sup>* та *aroA* [21].

Дані, представлені у табл. 2.1, вказують на те, що *E. coli* Xllp21 та *E. coli* PHE07 синтезують приблизно однакову кількість цільового продукту й використовують середовище з однаковим складом, але різною кількістю компонентів та тривалістю культивування. Штами *E. coli* xllp3 та *E. coli* HD-A2 також мають подібну ситуацію, але навіть культивуються протягом одного і того ж періоду часу; відмінності присутні лише в умовах культивування та кількісному складі поживних середовищ. Тому на наступному етапі вибору біологічного агенту розрахуємо вартість поживних середовищ для культивування вибраних мікроорганізмів.

## Особливості одержання фенілаланіну

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л (л/л)	Титр амінокислоти, г/л	Умови культивування	Література
<i>Escherichia coli</i> Xllp21	Глюкоза - 224 Дріжджовий екстракт – 4 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 10 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 5 MgSO <sub>4</sub> - 5 FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0.015 MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O - 0.015 Бетаїн - 3 Біотин - 0.00001 Тирозин - 0,25 NH <sub>4</sub> OH – 0,0604	72,9	pH 7,0 ± 0,1 контролювався за допомогою додавання 25%-вого NH <sub>4</sub> OH 52 год.; 37 °C; Глюкоза (початкова концентрація) – 20 г/л коли вихідна глюкоза в середовищі була вичерпана, середовище підживлювали невеликими дозами свіжої глюкози для підтримки концентрації не нижче 5 г/л; концентрація розчиненого кисню постійно підтримувалась на рівні 40% шляхом регулювання швидкості перемішування (400-1000 об/хв) та швидкості аерації (2-5 л/л/хв)	Liu, Y., Xu, Y., Ding, D., Wen, J., Zhu, B., & Zhang, D. Genetic engineering of <i>Escherichia coli</i> to improve L-phenylalanine production. BMC biotechnology. 2018, 18(1): 1-12. doi: 10.1186/s12896-018-0418-1
<i>Corynebacterium glutamicum</i> (назва штаму відсутня)	Глюкоза – 110 Кукурудзяний екстракт - 7 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 25 MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 1 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1 Цитрат натрію – 2 Глутамінова кислота - 1 CaCO <sub>3</sub> - 25	15,76 ± 0,23	pH 6.8–7.0 72 год.; 30 °C; Глюкоза (початкова концентрація) – 86 г/л Коли концентрація глюкози наближалась до 10 г/л, додавали певну дозу для досягнення концентрації 20 г/л	Zhang, C., Zhang, J., Kang, Z., Du, G., & Chen, J. Rational engineering of multiple module pathways for the production of L-phenylalanine in <i>Corynebacterium glutamicum</i> . <i>Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology</i> . 2015, 42(5): 787-797. doi: 10.1007/s10295-015-1593-x

<p><i>Escherichia coli</i> PHE07</p>	<p>Глюкоза – 242 Дріжджовий екстракт - 4 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 10 MgSO<sub>4</sub> – 5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 5 FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,015 MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O - 0,015 Бетаїн - 3 Біотин - 0.00001 Тирозин - 1,5 NH<sub>4</sub>OH – 0,0712</p>	<p>70,50 ± 1,02</p>	<p>pH 6,8–7.0 контролювався за допомогою додавання NH<sub>4</sub>OH 56 год 37 °C Глюкоза (початкова концентрація) - 10 В процесі ферментації концентрацію глюкози підтримували на рівні 1–5 г/л шляхом додавання 700 г/л глюкози; концентрація розчиненого кисню постійно підтримувалась на рівні 25-30% шляхом перемішування (250 об/хв)</p>	<p>Chen, M., Liang, H., Han, C., Zhou, P., Xing, Z., Chen, Q., &amp; Xie, R. Engineering of global transcription factor FruR to redirect the carbon flow in <i>Escherichia coli</i> for enhancing L-phenylalanine biosynthesis. <i>Microbial Cell Factories</i>. 2022, 21(1), 222. doi: 10.1186/s12934-022-01954-7</p>
<p><i>Escherichia coli</i> xllp3</p>	<p>Глюкоза – 191 Дріжджовий екстракт - 4 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 10 MgSO<sub>4</sub> – 5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 5 FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,015 MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O - 0,015 Тирозин – 0,25 NH<sub>4</sub>OH – 0.0482</p>	<p>61.3</p>	<p>pH 7.0 контролювався за допомогою додавання 10%-вого NH<sub>4</sub>OH 48 год Початкова температура становила 33°C, а при OD<sub>600</sub> = 30 підвищували до 38°C; Глюкоза (початкова концентрація) - 20 В процесі ферментації концентрацію глюкози підтримували на рівні 1–5 г/л шляхом додавання 600 г/л глюкози; концентрація розчиненого кисню постійно підтримувалась на рівні 20% шляхом регулювання швидкості перемішування та швидкості аерації</p>	<p>Wu, J., Liu, Y., Zhao, S., Sun, J., Jin, Z., &amp; Zhang, D. Application of dynamic regulation to increase L-phenylalanine production in <i>Escherichia coli</i>. <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> 2019, 29: 923-932. doi: 10.4014/jmb.1901.01058</p>

<p><i>Escherichia coli</i> HD-A2</p>	<p>Глюкоза – 186 Дріжджовий екстракт - 4 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 10</p> <p>MgSO<sub>4</sub> – 5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 5 FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,015 MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O - 0,015 Бетаїн - 1 NH<sub>4</sub>OH – 0,0447</p>	<p>62.47</p>	<p>pH 7.0 контролювався за допомогою додавання 25%-вого NH<sub>4</sub>OH 48 год</p> <p>Глюкоза (початкова концентрація) - 20 Початкова температура становила 33°C, а при OD<sub>600</sub> = 35 підвищували до 38°C; В процесі ферментації концентрацію глюкози підтримували на рівні 1–5 г/л шляхом додавання 800 г/л глюкози; концентрація розчиненого кисню постійно підтримувалась на рівні 40% шляхом регулювання швидкості перемішування (300-900 об/хв) та швидкості аерації (2-3 л/л/хв)</p>	<p>Ding, D., Liu, Y., Xu, Y., Zheng, P., Li, H., Zhang, D., &amp; Sun, J. Improving the production of L-phenylalanine by identifying key enzymes through multi-enzyme reaction system in vitro. Scientific reports. 2016, 6(1), 32208. doi: 10.1038/srep32208</p>
--	---	--------------	---	---

## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища для досліджуваних біологічних агентів

Для визначення вартості поживних середовищ для культивування продуцентів фенілаланіну необхідно знати кінцеві концентрації усіх компонентів. Окрім цього, для усіх досліджуваних агентів застосовували дробне підживлення, що зумовлює необхідність знань про кінцеву концентрацію джерела вуглецю для визначення порцій підживлювального розчину. В статтях [17-21] не вказано необхідних для цього даних, тому потрібно розрахувати скільки глюкози та аміачної води (як джерела азоту) було витрачено на біосинтез фенілаланіну у ферментері.

Мінімальні вимоги, яким повинні відповідати поживні середовища, на яких вирощують мікроорганізми – наявність всіх елементів, які є у складі клітини та доступна форма їх засвоєння мікроорганізмами.

До складу бактеріальної клітини входять такі елементи, % до маси сухої речовини: вуглець – 50; кисень – 20; азот – 10–14; водень – 8; фосфор – 3; сірка, калій, натрій – 1; кальцій, магній, хлор – 0,5; залізо – 0,2; решта елементів – близько 0,3.

Мікроорганізми вимагають відносно високих концентрацій невеликої кількості елементів із періодичної системи. Їх визначають як десять основних біологічних елементів: вуглець, кисень, водень, азот, сірка, фосфор, калій, магній, кальцій і залізо. Окрім цих головних біоелементів, мікроорганізмам також потрібні мінорні біоелементи, які, зазвичай, знаходяться у водопровідній воді. Ріст мікроорганізмів та біосинтез цільового продукту у поживному середовищі в основному залежить від концентрації двох основних компонентів: джерела вуглецю та джерела азоту. Інші складові середовища, такі як сірка, фосфор та інші елементи, як правило, присутні у достатній кількості або надлишку.

### **Здійснимо розрахунок складу поживного середовища для вирощування *E. coli* ХІр21.**

Тривалість культивування 52 год, концентрація фенілаланіну в культуральній рідині становить 72,9 г/л. Концентрацію біомаси визначимо як добуток оптичної густини культуральної рідини в кінці ферментації на 0,35:  $69 \times 0,35 = 24,15$  г/л.

### ***Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення***

*Потреби джерела вуглецю для синтезу фенілаланіну.* Як джерело вуглецю для одержання фенілаланіну використовується глюкоза.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 72,9 г фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну  $C_9H_{11}NO_2$  становить 165. Отже, у 165 г фенілаланіну міститься 108 г Карбону, а в 72,9 г фенілаланіну  $(108 \times 72,9) / 165 = 47,7$  г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 47,7 г Карбону. Молекулярна маса глюкози  $C_6H_{12}O_6$  становить 180. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 47,7 г Карбону міститься у  $(47,7 \times 180) / 72 = 119,25$  г глюкози. Тому для одержання 72,9 г фенілаланіну, вміст глюкози у середовищі повинен бути 119,25 г/л.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 50 % субстрату окиснюється до  $CO_2$  для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме  $(119,25 \times 0,5) + 119,25 = 178,9$  г/л.

*Потреби джерела вуглецю для синтезу біомаси.* У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 24,15 г біомаси становить  $24,15 \times 0,5 = 12,1$  г. Ця кількість Карбону міститься у  $(12,1 \times 180) / 72 = 30,25$  г глюкози.

Враховуючи 50% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 24,15 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(30,25 \times 0,5) + 30,25 = 45,4$  г/л глюкози. Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (24,15 г/л) та фенілаланіну (72,9 г/л), становить  $178,9 + 45,4 = 224,3$  г/л  $\sim 224$  г/л. Потрібно мати на увазі, що така кількість субстрату (200-250 г/л) не може бути внесена у середовище одразу, початкова концентрація глюкози у середовищі становить, як правило, 20 г/л, а решта субстрату (204 г/л) вноситься у процесі дробного підживлення.

### ***Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення***

*Потреби азоту для синтезу фенілаланіну.* Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й фенілаланіну. Розрахуємо вміст  $(NH_4)_2SO_4$  у середовищі, необхідний

для одержання 72,9 г/л фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну становить 165. У 165 г фенілаланіну міститься 14 г Нітрогену (N), тоді у 72,9 г фенілаланіну вміст Нітрогену становить  $(72,9 \times 14) / 165 = 6,19$  г.

*Потреби азоту для синтезу біомаси.* Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 24,15 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 2,42 г. Продуцент фенілаланіну асимілює як джерела азотного живлення мінеральний (амонійний) та органічний Нітроген.

Дріжджовий екстракт містить 9-14 % азоту. Таким чином, у 4 г екстракту вміст азоту (за елементом N) становить 0,36 – 0,56 г, або в середньому 0,46 г азоту.

Отже, кількість амонійного азоту становить  $2,42 - 0,46 = 1,96$  г.

Таким чином, для синтезу фенілаланіну і біомаси необхідно  $6,19 + 1,96 = 8,15$  г/л амонійного азоту. Джерелами амонійного азоту є сульфат амонію (концентрація у середовищі 10 г/л) і 25 % розчин аміачної води ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), використовуваний у процесі культивування для регуляції рН.

У 10 г/л сульфату амонію міститься  $(10 \times 28) / 132 = 2,12$  г азоту. Отже, у вигляді аміачної води необхідно внести  $8,15 - 2,12 = 6,03$  г/л азоту.

Розрахуємо необхідну кількість  $\text{NH}_4\text{OH}$ , в якій міститься 6,03 г/л азоту:  $(35 \times 6,03) / 14 = 15,1$  г/л. Далі розрахуємо об'єм 25 % розчину аміачної води, який вноситься на 1 л середовища (культуральної рідини):  $(100 \times 15,1) / 25 = 60,4$  мл.

### ***Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі***

Джерелами Фосфору у промисловому виробництві фенілаланіну є двозаміщений Калій фосфорнокислий –  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . У біомасі міститься близько 3 % Фосфору (за елементом P). Отже, для синтезу 24,15 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити  $24,15 \times 0,03 = 0,7245$  г/л. Ця кількість Фосфору міститься у  $(0,7245 \times 136) / 31 = 3,18$  г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . В середовищі дана сіль міститься в концентрації 5 г/л, що є цілком достатнім.

### ***Інші компоненти середовища***

Джерелами таких необхідних для росту бактерій елементів, як Магній, Ферум і Манган є  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ . Крім того, до складу середовища

входять необхідні для ауксотрофного штаму ростові фактори – тирозин, бетаїн, біотин а також інші компоненти, що входять до складу дріжджового екстракту.

### **Здійснимо розрахунок складу поживного середовища для вирощування *S. glutamicum*.**

Тривалість культивування 72 год, концентрація фенілаланіну в культуральній рідині становить 15,76 г/л, а концентрація біомаси - 28,2 г/л.

***Потреби джерела вуглецю для синтезу фенілаланіну.*** Як джерело вуглецю для одержання фенілаланіну використовується глюкоза.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 15,76 г фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну  $C_9H_{11}NO_2$  становить 165. Отже, у 165 г фенілаланіну міститься 108 г Карбону, а в 15,76 г фенілаланіну  $(108 \times 15,76) / 165 = 10,3$  г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 10,3 г Карбону. Молекулярна маса глюкози  $C_6H_{12}O_6$  становить 180. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 10,3 г Карбону міститься у  $(10,3 \times 180) / 72 = 25,75$  г глюкози. Тому для одержання 15,76 г фенілаланіну, вміст глюкози у середовищі повинен бути 25,75 г/л.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 50 % субстрату окиснюється до  $CO_2$  для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме  $(25,75 \times 0,5) + 25,75 = 38,6$  г/л.

***Потреби джерела вуглецю для синтезу біомаси.*** У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 28,2 г біомаси становить  $28,2 \times 0,5 = 14,1$  г. Ця кількість Карбону міститься у  $(14,1 \times 180) / 72 = 35,25$  г глюкози.

Враховуючи 50% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 28,2 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(35,25 \times 0,5) + 35,25 = 52,88$  г/л глюкози. Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (28,2 г/л) та фенілаланіну (15,76 г/л), становить  $38,6 + 52,88 = 91,48$  г/л  $\sim 91$  г/л. (в статті вказано 110 г/л – тому працюємо з 110 г/л).

**Потреби азоту для синтезу фенілаланіну.** Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й фенілаланіну. Розрахуємо вміст  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  у середовищі, необхідний для одержання 15,76 г/л фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну становить 165. У 165 г фенілаланіну міститься 14 г Нітрогену (N), тоді у 15,76 г фенілаланіну вміст Нітрогену становить  $(15,76 \times 14) / 165 = 1,34$  г.

**Потреби азоту для синтезу біомаси.** Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 28,2 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 2,82 г. Продуцент фенілаланіну асимілює як джерела азотного живлення мінеральний (амонійний) та органічний Нітроген.

Кукурудзяний екстракт містить 1,9 % азоту. Таким чином, у 7 г екстракту вміст азоту (за елементом N) становить 0,133 г азоту.

Отже, кількість амонійного азоту становить  $1,34 - 0,13 = 1,21$  г.

Таким чином, для синтезу фенілаланіну і біомаси необхідно  $1,34 + 1,21 = 2,55$  г/л амонійного азоту. Джерелами амонійного азоту є сульфат амонію (концентрація у середовищі 25 г/л) і 25 % розчин аміачної води ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), використовуваний у процесі культивування для регуляції Рн.

У 25 г/л сульфату амонію міститься  $(25 \times 28) / 132 = 5,3$  г азоту.

Таким чином, кількість сульфату у поживному середовищі забезпечує необхідну кількість азоту та не зобов'язує додатково використовувати 25 %-ий розчин аміачної води.

### **Здійснимо розрахунок складу поживного середовища для вирощування *E. coli* RHE07.**

Тривалість культивування 56 год, концентрація фенілаланіну в культуральній рідині становить 70,5 г/л, а концентрація біомаси - 37 г/л.

**Потреби джерела вуглецю для синтезу фенілаланіну.** Як джерело вуглецю для одержання фенілаланіну використовується глюкоза.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом C) міститься в 70,5 г фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$  становить 165. Отже, у 165 г

фенілаланіну міститься 108 г Карбону, а в 70,5 г фенілаланіну  $(108 \times 70,5) / 165 = 46,1$  г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 46,1 г Карбону. Молекулярна маса глюкози  $C_6H_{12}O_6$  становить 180. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 46,1 г Карбону міститься у  $(46,1 \times 180) / 72 = 115,35$  г глюкози. Тому для одержання 70,5 г фенілаланіну, вміст глюкози у середовищі повинен бути 115,35 г/л.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 50 % субстрату окиснюється до  $CO_2$  для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме  $(115,35 \times 0,5) + 115,35 = 173$  г/л.

**Потреби джерела вуглецю для синтезу біомаси.** У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 37 г біомаси становить  $37 \times 0,5 = 18,5$  г. Ця кількість Карбону міститься у  $(18,5 \times 180) / 72 = 46,25$  г глюкози.

Враховуючи 50% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 37 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(46,25 \times 0,5) + 46,25 = 69,4$  г/л глюкози. Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (37 г/л) та фенілаланіну (70,5 г/л), становить  $173 + 69,4 = 242,4$  г/л  $\sim 242$  г/л.

**Потреби азоту для синтезу фенілаланіну.** Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й фенілаланіну. Розрахуємо вміст  $(NH_4)_2SO_4$  у середовищі, необхідний для одержання 70,5 г/л фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну становить 165. У 165 г фенілаланіну міститься 14 г Нітрогену (N), тоді у 70,5 г фенілаланіну вміст Нітрогену становить  $(70,5 \times 14) / 165 = 6$  г.

**Потреби азоту для синтезу біомаси.** Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 37 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 3,7 г. Продуцент фенілаланіну асимілює як джерела азотного живлення мінеральний (амонійний) та органічний Нітроген.

Дріжджовий екстракт містить 9-14 % азоту. Таким чином, у 4 г екстракту вміст азоту (за елементом N) становить 0,36 – 0,56 г, або в середньому 0,46 г азоту.

Отже, кількість амонійного азоту становить  $3,7 - 0,46 = 3,24$  г.

Таким чином, для синтезу фенілаланіну і біомаси необхідно  $6 + 3,24 = 9,24$  г/л амонійного азоту. Джерелами амонійного азоту є сульфат амонію (концентрація у середовищі 10 г/л) і 25 % розчин аміачної води ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), використовуваний у процесі культивування для регуляції рН.

У 10 г/л сульфату амонію міститься  $(10 \times 28) / 132 = 2,12$  г азоту. Отже, у вигляді аміачної води необхідно внести  $9,24 - 2,12 = 7,12$  г/л азоту.

Розрахуємо необхідну кількість  $\text{NH}_4\text{OH}$  (молекулярна маса 35), в якій міститься 7,12 г/л азоту:  $(35 \times 7,12) / 14 = 17,8$  г/л. Далі розрахуємо об'єм 25 % розчину аміачної води, який вноситься на 1 л середовища (культуральної рідини):  $(100 \times 17,8) / 25 = 71,2$  мл.

### **Здійснимо розрахунок складу поживного середовища для вирощування *E. coli* x11p3.**

Тривалість культивування 48 год, концентрація фенілаланіну в культуральній рідині становить 61.3 г/л. Концентрацію біомаси визначимо як добуток оптичної густини культуральної рідини в кінці ферментації на 0,35:  $62,63 \times 0,35 = 21,92$  г/л.

***Потреби джерела вуглецю для синтезу фенілаланіну.*** Як джерело вуглецю для одержання фенілаланіну використовується глюкоза.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 61.3 г фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$  становить 165. Отже, у 165 г фенілаланіну міститься 108 г Карбону, а в 61.3 г фенілаланіну  $(108 \times 61,3) / 165 = 40,1$  г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 40,1 г Карбону. Молекулярна маса глюкози  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  становить 180. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 40,1 г Карбону міститься у  $(40,1 \times 180) / 72 = 100,25$  г глюкози. Тому для одержання 61.3 г фенілаланіну, вміст глюкози у середовищі повинен бути 100,25 г/л.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 50 % субстрату окиснюється до  $\text{CO}_2$  для одержання енергії, необхідної для

конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме  $(100,25 \times 0,5) + 100,25 = 150,34$  г/л.

**Потреби джерела вуглецю для синтезу біомаси.** У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 21,92 г біомаси становить  $21,92 \times 0,5 = 10,96$  г. Ця кількість Карбону міститься у  $(10,96 \times 180) / 72 = 27,4$  г глюкози.

Враховуючи 50% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 21,92 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(27,4 \times 0,5) + 27,4 = 41,1$  г/л глюкози.

Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (21,92 г/л) та фенілаланіну (61.3 г/л), становить  $41,1 + 150,34 = 191,44$  г/л  $\sim 191$  г/л.

**Потреби азоту для синтезу фенілаланіну.** Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й фенілаланіну. Розрахуємо вміст  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  у середовищі, необхідний для одержання 61.3 г/л фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну становить 165. У 165 г фенілаланіну міститься 14 г Нітрогену (N), тоді у 61.3 г фенілаланіну вміст Нітрогену становить  $(61.3 \times 14) / 165 = 5,2$  г.

**Потреби азоту для синтезу біомаси.** Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 21,92 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 2,2 г. Продукент фенілаланіну асимілює як джерела азотного живлення мінеральний (амонійний) та органічний Нітроген.

Дріжджовий екстракт містить 9-14 % азоту. Таким чином, у 4 г екстракту вміст азоту (за елементом N) становить 0,36 – 0,56 г, або в середньому 0,46 г азоту.

Отже, кількість амонійного азоту становить  $2,2 - 0,46 = 1,74$  г.

Таким чином, для синтезу фенілаланіну і біомаси необхідно  $5,2 + 1,74 = 6,94$  г/л амонійного азоту. Джерелами амонійного азоту є сульфат амонію (концентрація у середовищі 10 г/л) і 25 % розчин аміачної води ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), використовуваний у процесі культивування для регуляції рН.

У 10 г/л сульфату амонію міститься  $(10 \times 28) / 132 = 2,12$  г азоту. Отже, у вигляді аміачної води необхідно внести  $6,94 - 2,12 = 4,82$  г/л азоту.

Розрахуємо необхідну кількість  $\text{NH}_4\text{OH}$  (молекулярна маса 35), в якій міститься 4,82 г/л азоту:  $(35 \times 4,82) / 14 = 12,05$  г/л. Далі розрахуємо об'єм 25 % розчину аміачної

води, який вноситься на 1 л середовища (культуральної рідини):  $(100 \times 12,05) / 25 = 48,2$  мл.

### **Здійснимо розрахунок складу поживного середовища для вирощування *E. coli* HD-A2 .**

Тривалість культивування 48 год, концентрація фенілаланіну в культуральній рідині становить 62.47 г/л, а концентрація біомаси - 37 г/л. Концентрацію біомаси визначимо як добуток оптичної густини культуральної рідини в кінці ферментації на 0,35:  $50 \times 0,35 = 17,5$  г/л.

***Потреби джерела вуглецю для синтезу фенілаланіну.*** Як джерело вуглецю для одержання фенілаланіну використовується глюкоза.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 62.47 г фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну  $C_9H_{11}NO_2$  становить 165. Отже, у 165 г фенілаланіну міститься 108 г Карбону, а в 62.47 г фенілаланіну  $(108 \times 62.47) / 165 = 40,9$  г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 40,9 г Карбону. Молекулярна маса глюкози  $C_6H_{12}O_6$  становить 180. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 40,9 г Карбону міститься у  $(40,9 \times 180) / 72 = 102,25$  г глюкози. Тому для одержання 62.47 г фенілаланіну, вміст глюкози у середовищі повинен бути 102,25 г/л.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 50 % субстрату окиснюється до  $CO_2$  для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме  $(102,25 \times 0,5) + 102,25 = 153,4$  г/л.

***Потреби джерела вуглецю для синтезу біомаси.*** У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 17,5 г біомаси становить  $17,5 \times 0,5 = 8,75$  г. Ця кількість Карбону міститься у  $(8,75 \times 180) / 72 = 21,9$  г глюкози.

Враховуючи 50% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 17,5 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(21,9 \times 0,5) + 21,9 = 32,9$  г/л глюкози.

Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (17,5 г/л) та фенілаланіну (62.47 г/л), становить  $153,4 + 32,9 = 186,3$  г/л  $\sim 186$  г/л.

**Потреби азоту для синтезу фенілаланіну.** Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й фенілаланіну. Розрахуємо вміст  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  у середовищі, необхідний для одержання 62.47 г/л фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну становить 165. У 165 г фенілаланіну міститься 14 г Нітрогену (N), тоді у 62.47 г фенілаланіну вміст Нітрогену становить  $(62.47 \times 14) / 165 = 5,3$  г.

**Потреби азоту для синтезу біомаси.** Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 17,5 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 1,75 г. Продуцент фенілаланіну асимілює як джерела азотного живлення мінеральний (амонійний) та органічний Нітроген.

Дріжджовий екстракт містить 9-14 % азоту. Таким чином, у 4 г екстракту вміст азоту (за елементом N) становить 0,36 – 0,56 г, або в середньому 0,46 г азоту.

Отже, кількість амонійного азоту становить  $1,75 - 0,46 = 1,29$  г.

Таким чином, для синтезу фенілаланіну і біомаси необхідно  $5,3 + 1,29 = 6,59$  г/л амонійного азоту. Джерелами амонійного азоту є сульфат амонію (концентрація у середовищі 10 г/л) і 25 % розчин аміачної води ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), використовуваний у процесі культивування для регуляції рН.

У 10 г/л сульфату амонію міститься  $(10 \times 28) / 132 = 2,12$  г азоту. Отже, у вигляді аміачної води необхідно внести  $6,59 - 2,12 = 4,47$  г/л азоту.

Розрахуємо необхідну кількість  $\text{NH}_4\text{OH}$  (молекулярна маса 35), в якій міститься 4,47 г/л азоту:  $(35 \times 4,47) / 14 = 11,18$  г/л. Далі розрахуємо об'єм 25 % розчину аміачної води, який вноситься на 1 л середовища (культуральної рідини):  $(100 \times 11,18) / 25 = 44,7$  мл.

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, середовище для культивування *S. glutamicum* майже у 2 та 1,5 рази дешевше, ніж для *E. coli* Xllp21 і *E. coli* HD-A2 відповідно. Проте концентрація синтезованої амінокислоти корінебактеріями є найнижчою. Тому для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту.

## Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів фенілаланіну

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л (л/л)	Ціна компонента, грн/кг (грн/л)	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Escherichia coli</i> Xllp21	Глюкоза	224	49.80	11,15	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza">https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza</a>
	Дріжджовий екстракт	4	169.49	0,68	<a href="https://www.alibaba.com/product-detail/Best-Price-Food-Grade-Yeast-Extract_1600339891711.html">https://www.alibaba.com/product-detail/Best-Price-Food-Grade-Yeast-Extract_1600339891711.html</a>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	19.20	0,192	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amoniyu">https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amoniyu</a>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	44	0,22	<a href="https://selitra.biz/uk/p616273983-kaliju-monophosphat.html">https://selitra.biz/uk/p616273983-kaliju-monophosphat.html</a>
	MgSO <sub>4</sub>	5	29	0,145	<a href="https://chemsale.com.ua/ua/product/magnij-sernokislyj-sulfat-magniya/">https://chemsale.com.ua/ua/product/magnij-sernokislyj-sulfat-magniya/</a>
	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.015	35	0,000525	<a href="https://ukrstarline.ua/himichna-produkciya/kuporos-zaliznyj-zalizo-sirchanokysle">https://ukrstarline.ua/himichna-produkciya/kuporos-zaliznyj-zalizo-sirchanokysle</a>
	MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0.015	52,80	0,000792	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu">https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu</a>
	Бетаїн	3	179	0,54	<a href="https://kreon-d.com.ua/ua/p780678820-betain.html">https://kreon-d.com.ua/ua/p780678820-betain.html</a>
	Біотин	0.00001	625	0,00000625	<a href="https://selitra.biz/uk/p1178653367-vitamin-h2.html">https://selitra.biz/uk/p1178653367-vitamin-h2.html</a>
	Тирозин	0,25	954	0,24	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-l-tyrozyn">https://www.systopt.com.ua/item-l-tyrozyn</a>
	NH <sub>4</sub> OH	0,0604	20,4	1,23	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-amiak-vodnyj">https://www.systopt.com.ua/item-amiak-vodnyj</a>
<b>Вартість 1 л середовища – 14,4 грн</b>					

<i>Corynebact erium glutamicum</i> (назва штаму відсутня)	Глюкоза	110	49.80	5,48	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza">https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza</a>
	Кукурудзяний екстракт	7	35	0,245	<a href="https://flagma.ua/uk/kukurudzianyi-ekstrakt-o5052730.html">https://flagma.ua/uk/kukurudzianyi-ekstrakt-o5052730.html</a>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25	19.20	0,48	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amonyu">https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amonyu</a>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	44	0,044	<a href="https://selitra.biz/uk/p616273983-kaliju-monophosphat.html">https://selitra.biz/uk/p616273983-kaliju-monophosphat.html</a>
	Цитрат натрію	2	67	0,134	<a href="https://chemsale.com.ua/ua/product/natrij-czitrats/">https://chemsale.com.ua/ua/product/natrij-czitrats/</a>
	Глутамінова кислота	1	120	0,12	<a href="https://megachem.com.ua/ua/kislota-glutaminovaya.html">https://megachem.com.ua/ua/kislota-glutaminovaya.html</a>
	CaCO <sub>3</sub>	25	27	0,675	<a href="https://flagma.ua/uk/karbonat-kalciyu-vuglekisliyi-kalciy-o13623229.html">https://flagma.ua/uk/karbonat-kalciyu-vuglekisliyi-kalciy-o13623229.html</a>
<b>Вартість 1 л середовища – 7,18 грн</b>					
<i>Escherichia coli</i> PHE07	Глюкоза	242	49.80	12,05	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza">https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza</a>
	Дріжджовий екстракт	4	169.49	0,68	<a href="https://www.alibaba.com/product-detail/Best-Price-Food-Grade-Yeast-Extract_1600339891711.html">https://www.alibaba.com/product-detail/Best-Price-Food-Grade-Yeast-Extract_1600339891711.html</a>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	19.20	0,19	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amonyu">https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amonyu</a>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	44	0,22	<a href="https://selitra.biz/uk/p616273983-kaliju-monophosphat.html">https://selitra.biz/uk/p616273983-kaliju-monophosphat.html</a>
	MgSO <sub>4</sub>	5	29	0,145	<a href="https://chemsale.com.ua/ua/product/magnij-sernokislyj-sulfat-magniya/">https://chemsale.com.ua/ua/product/magnij-sernokislyj-sulfat-magniya/</a>

	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.015	35	0,000525	<a href="https://ukrstarline.ua/himichna-produkciya/kuporos-zaliznyj-zalizo-sirchanokysle">https://ukrstarline.ua/himichna-produkciya/kuporos-zaliznyj-zalizo-sirchanokysle</a>
	MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0.015	52,80	0,000792	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu">https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu</a>
	Бетаїн	3	179	0,54	<a href="https://kreon-d.com.ua/ua/p780678820-betain.html">https://kreon-d.com.ua/ua/p780678820-betain.html</a>
	Біотин	0.00001	625	0,00000625	<a href="https://selitra.biz/uk/p1178653367-vitamin-h2.html">https://selitra.biz/uk/p1178653367-vitamin-h2.html</a>
	Тирозин	1,5	954	1,43	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-l-tyrozyin">https://www.systopt.com.ua/item-l-tyrozyin</a>
	NH <sub>4</sub> OH	0,0712	20,4	1,45	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-amiak-vodnyj">https://www.systopt.com.ua/item-amiak-vodnyj</a>
<b>Вартість 1 л середовища – 16,71 грн</b>					
<i>Escherichia coli</i> xllp3	Глюкоза	191	49.80	9,51	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza">https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza</a>
	Дріжджовий екстракт	4	169.49	0,68	<a href="https://www.alibaba.com/product-detail/Best-Price-Food-Grade-Yeast-Extract_1600339891711.html">https://www.alibaba.com/product-detail/Best-Price-Food-Grade-Yeast-Extract_1600339891711.html</a>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	19.20	0,19	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amoniyu">https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amoniyu</a>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	44	0.22	<a href="https://selitra.biz/uk/p616273983-kaliju-monophosphat.html">https://selitra.biz/uk/p616273983-kaliju-monophosphat.html</a>
	MgSO <sub>4</sub>	5	29	0,145	<a href="https://chemsale.com.ua/ua/product/magnij-sernokislyj-sulfat-magniya/">https://chemsale.com.ua/ua/product/magnij-sernokislyj-sulfat-magniya/</a>
	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.015	35	0,000525	<a href="https://ukrstarline.ua/himichna-produkciya/kuporos-zaliznyj-zalizo-sirchanokysle">https://ukrstarline.ua/himichna-produkciya/kuporos-zaliznyj-zalizo-sirchanokysle</a>

	MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0.015	52,80	0,000792	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu">https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu</a>
	Тирозин	0,25	954	0.24	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-l-tyrozyln">https://www.systopt.com.ua/item-l-tyrozyln</a>
	NH <sub>4</sub> OH	0,0482	20,4	0,98	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-amiak-vodnyj">https://www.systopt.com.ua/item-amiak-vodnyj</a>
	<b>Вартість 1 л середовища – 11,97 грн</b>				
<i>Escherichia coli</i> <i>HD-A2</i>	Глюкоза	186	49.80	9,26	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza">https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza</a>
	Дріжджовий екстракт	4	169.49	0,68	<a href="https://www.alibaba.com/product-detail/Best-Price-Food-Grade-Yeast-Extract_1600339891711.html">https://www.alibaba.com/product-detail/Best-Price-Food-Grade-Yeast-Extract_1600339891711.html</a>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	19.20	0,19	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amoniyu">https://www.systopt.com.ua/item-amonij-sirchanokyslyj-sulfat-amoniyu</a>
	MgSO <sub>4</sub>	5	44	0.22	<a href="https://selitra.biz/uk/p616273983-kaliju-monophosphat.html">https://selitra.biz/uk/p616273983-kaliju-monophosphat.html</a>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	29	0,145	<a href="https://chemsale.com.ua/ua/product/magnij-sernokislyj-sulfat-magniya/">https://chemsale.com.ua/ua/product/magnij-sernokislyj-sulfat-magniya/</a>
	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,015	35	0,000525	<a href="https://ukrstarline.ua/himichna-produkciya/kuporos-zaliznyj-zalizo-sirchanokysle">https://ukrstarline.ua/himichna-produkciya/kuporos-zaliznyj-zalizo-sirchanokysle</a>
	MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,015	52,80	0,000792	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu">https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu</a>
	Бетаїн	1	179	0,18	<a href="https://prom.ua/ua/p845018931-betain.html">https://prom.ua/ua/p845018931-betain.html</a>
	NH <sub>4</sub> OH	0,0447	20,4	0,91	<a href="https://www.systopt.com.ua/item-amiak-vodnyj">https://www.systopt.com.ua/item-amiak-vodnyj</a>
	<b>Вартість 1 л середовища – 11,59 грн</b>				

Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що умовна вартість фенілаланіну, синтезованого штамом *E. coli* HD-A2, є найнижчою (0,185 грн/г), а кількість утвореного цільового продукту за 1 год є найвищою для штаму *E. coli* X11p21 (1,4 г/год). Найоптимальнішим БА варто прийняти *E. coli* X11p21, оскільки, не дивлячись на вищу ціну за 1 л середовища порівняно з *E. coli* HD-A2, що зумовлено більшим часом ферментації, вигідніше продукувати надсинтез фенілаланіну буде саме цей штам.

На нашу думку, найоптимальнішим БА варто прийняти *E. coli* X11p21 за такими причинами: 1) штам синтезує максимальну концентрацію фенілаланіну (72,9 г/л), причому з найвищою швидкістю (1,4 г/год); 2) вартість 1 л середовища не набагато (всього на 19,5 %) перевищує таку для штаму *E. coli* HD-A2, проте ця вища вартість зумовлена більшим вмістом субстрату у середовищі, необхідного для синтезу вищої концентрації фенілаланіну; 3) тривалість культивування є невеликою (52 год), що всього на 4 год перевищує таку для штаму HD-A2. Ми вважаємо, що цю незначну різницю у тривалості виробничого біосинтезу можна буде без проблем компенсувати на етапах підготовки посівного матеріалу.

**Умовна вартість 1 г фенілаланіну, синтезованого різними біологічними агентами**

Біологічний агент	Концентрація фенілаланіну, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість фенілаланіну, синтезованого за год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г фенілаланіну, грн/г
<i>Escherichia coli</i> Xllp21	72,9	52	1,4	14,4	0,1975
<i>Corynebacterium glutamicum</i> (назву штаму не наведено)	15,76	72	0,22	7,18	0,456
<i>Escherichia coli</i> PHE07	70,50	56	1,26	16,71	0,237
<i>Escherichia coli</i> xllp3	61,3	48	1,28	11,97	0,1953
<i>Escherichia coli</i> HD-A2	62,47	48	1,3	11,59	0,185

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

*Escherichia coli* (кишкові палички) – грамнегативні, неспороутворюючі, паличкоподібні бактерії (рис. 2.1). Їх розміри варіюються в межах 1-3 мкм x 0,4-0,7 мкм. В поживних середовищах розташовуються поодинці або парами. Більшість штамів характеризується рухливістю, що забезпечується перитрихіальним розташуванням джгутиків, проте зустрічаються й нерухомі форми. Деякі штами також можуть формувати капсули та мати фімбрії [49].

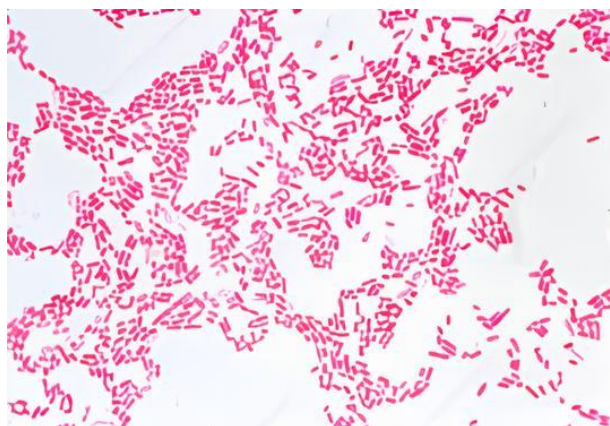


Рис. 2.1 Препарат *Escherichia coli* у світловому мікроскопі (x400) [50]

*Escherichia coli* належать до хемоорганогетеротрофних мікроорганізмів і характеризується факультативним анаеробним типом дихання. Ці бактерії здатні рости в широкому діапазоні температур – від 10 до 40 °С, проте оптимальна температура для більшості штамів становить близько 37 °С. Щодо кислотності середовища, *E. coli* демонструє стійкість до рН від 4,5 до 9,5, проте максимальні темпи росту спостерігаються при нейтральних значеннях (приблизно рН 7,0) [49].

*E. coli* активно ферментує широкий спектр вуглеводів, включаючи L-арабінозу, фруктозу, галактозу, глюкозу, лактозу, мальтозу, рамнозу, мелібіозу, рафінозу, сорбіт, ксилозу та манітол. Не здатні зброджувати сахарозу, арабіт і целобіозу, а також не гідролізують желатин. Характерна позитивна каталазна активність, позитивна реакція на метиловий червоний та індолий тест, не мають гемолітичної активності [49, 51].

На МПА *E. coli* утворюють сірувато-білі, вологі, гладкі, непрозорі або напівпрозорі колонії у круглій форми (рис. 2.2). Гладкі форми (S) колоній, молодих колоній легко емульгуються у фізіологічному розчині. Шорсткі форми (R) колоній, що спостерігаються у старих культурах, з тьмяною поверхнею, часто автоаглютинуються у фізіологічному розчині [49].



Рис. 2.2 Колонії *E. coli* на МПА [52]

На агарі Макконкі колонії *E. coli* демонструють рожеве забарвлення (рис. 2.3) внаслідок ферментації лактози, катаболізм якого призводить до утворення лактату, що спричиняє зниження показника рН культурального середовища. Наявний у складі середовища рН-індикатор змінює свій колір на рожевий за умов підвищеної кислотності [49, 53].

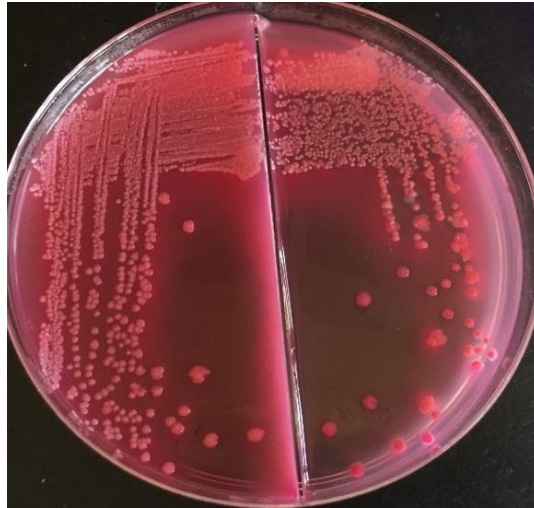


Рис. 2.3. Колонія кишкової палички на агарі Макконкі [54]

На середовищі Левіна колонії *E. coli* демонструють зелений металевий блиск (рис. 2.4.), що пояснюється метахроматичними властивостями барвників (еозину і метиленового синього) і здатністю бактерій ферментувати лактозу, що змінює рН середовища на кислий [49].

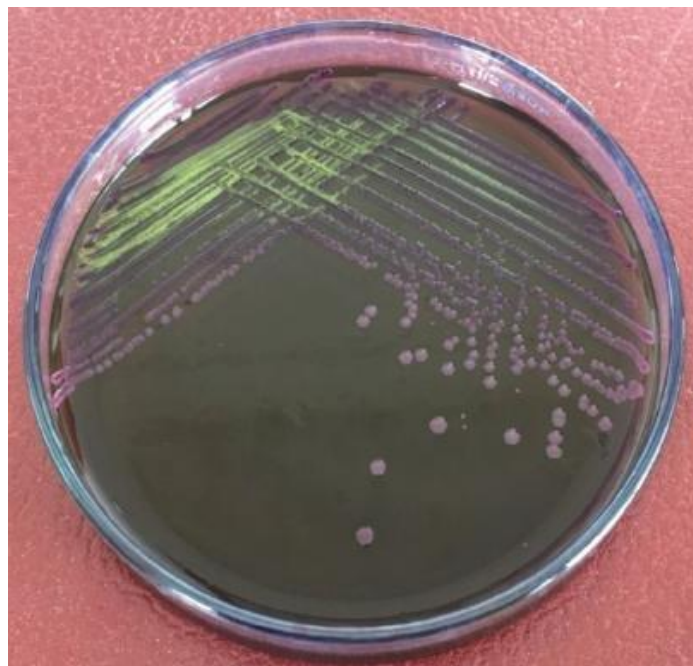


Рис. 2.4. Колонія кишкової палички на середовищі Левіна [55]

## 2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Філогенетичну класифікацію для *E. coli* наведено відповідно бази даних NCBI

- National Center for Biotechnology Information [56]:

Домен – *Bacteria*

Тип – *Pseudomonadota*

Клас – *Gamma proteobacteria*

Порядок – *Enterobacterales*

Родина – *Enterobacteriaceae*

Рід – *Escherichia*

Вид – *Escherichia coli*

Штам - *Escherichia coli* X11p21

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### 3.1. Розрахунок потреби у фенілаланіні

Основні властивості фенілаланіну обумовлюють його різноманітність лікувальних застосувань. Як дієтична добавка, ця амінокислота використовується для лікування неврологічних захворювань, у складі розчинів для інфузій з амінокислотним складом – для парентерального харчування, в лікарських засобах – для лікування онкозахворювань.

Хвороба Паркінсона (ХП) - прогресуюче нейродегенеративне захворювання, що характеризується селективною дегенерацією дофамінергічних нейронів у чорній субстанції середнього мозку. Характеризується тремором, головним чином у стані спокою, ригідністю кінцівок, сповільненістю рухів і труднощами з утриманням рівноваги. Також хворі можуть мати депресивний стан, проблеми зі сном та пам'яттю. За даними науковців, причини захворювання не встановлено, однак спричинене воно поєднанням генів, впливу навколишнього середовища та способу життя [57].

ХП є невиліковною, але за допомогою медикаментозної терапії можна значно покращити якість життя пацієнтів. Більшість ліків, які застосовуються для лікування, діють за принципом поповнення дефіциту дофаміну в мозку або стимуляції його рецепторів. Вживання фенілаланіну стабілізує мовну функцію і тонус м'язів [3, 57].

За останні 25 років поширеність ХП подвоїлася. За глобальними оцінками WHO, у 2019 році в світі налічувалося понад 8,5 мільйонів осіб з цією хворобою [58].

За даними, що містяться в електронній системі охорони здоров'я, в Україні хворобу Паркінсона встановлено 56 135 людям [59]. Згідно з інструкцією, для покращення мовлення і тону м'язів фенілаланін приймається двічі на день [3].

Перетворення фенілаланіну на дофамін є одним з ключових процесів для регуляції настрою, мотивації та когнітивних функцій. Тому достатня кількість фенілаланіну в організмі може допомогти боротися з різними психологічними проблемами. COVID-19, спричинений вірусом SARS-CoV-2, є респіраторним

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>			
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</b>	Літера	Аркцш	Аркцшів
Розробив	Савчук О.О.						45	11
Консульт.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Керівник	Пирог Т.П.							
Н. контр.								
Зав. каф.	Стадніков В.П.							

інфекційним захворюванням. Крім проблем з серцево-судинною, дихальною та імунною системами, COVID-19 може викликати менш очевидні наслідки, такі як порушення когнітивних функцій. Нещодавні дослідження показують, що деякі люди після одужання від COVID-19 відчувають когнітивний дефіцит, наприклад, погіршення пам'яті та уваги, а також порушення сну, що свідчить про те, що дана хвороба може мати довгостроковий вплив на когнітивні функції [60].

У мета-аналізі 18 досліджень, що охопили 10 530 пацієнтів (госпіталізованих і не госпіталізованих), загальна поширеність неврологічних симптомів через три місяці після одужання від COVID-19 представляла собою: втома (37%), затуманення свідомості (32%), проблеми з пам'яттю (28%), розлади уваги (22%), головний біль (15%). Серед нервово-психічних симптомів переважали порушення сну (31%), тривога (23%) і депресія (17%) [61].

У 2022 році в Україні було зафіксовано 1 684 035 випадків захворювань на COVID 19, 14 763 з яких закінчились смертю хворого [62]. Тобто одужали 1 669 272 пацієнти. За даними дослідження [61] 28 % пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, мали проблеми з порушенням когнітивних функцій, тобто:

$$1\ 669\ 272 \times 28\ \% = 467\ 396 \text{ осіб.}$$

Допустимо, що лише 20% від цієї кількості прийматимуть фенілаланін.

$$467\ 396 \times 20\ \% = 93\ 479 \text{ осіб}$$

За інструкцією, дієтичну добавку з фенілаланіном необхідно приймати 30 днів по 2 капсули на день [3].

Парентеральне харчування (ПХ) - це комплексна медикаментозна терапія, що застосовується, коли шлунково-кишковий тракт (ШКТ) в несправному стані або недоступна для використання [63]. Основним показанням до ПХ є пацієнти з кишковою недостатністю (синдром короткої кишки, запальні захворювання кишечника), тяжкою кишковою непрохідністю, а також недоношені новонароджені з ще не повністю розвиненим апаратом ШКТ. Висока потреба в парентеральному харчуванні при лікуванні недостатності харчування та запобіганні ускладненням у періопераційному періоді. ПХ також застосовується онкологічними пацієнтами, що мають побічні ефекти (мукозит, стоматит, езофагіт), пов'язані з токсичністю хіміо-

або променевої терапії, які суттєво впливають на пероральне/пероральне вживання їжі протягом більше семи днів, і в загальному для профілактики та лікування недоїдання, яке може призвести до переривання/затримки лікування з негативним впливом на індивідуальний прогноз. Також, ПХ є життєво необхідним для критично хворих пацієнтів з мезентеріальною ішемією, кишковою кровотечею, неконтрольованим блюванням, перитонітом та гострим панкреатитом. Щодо тривалості ПХ: може бути позитивним (і рятівним) для пацієнтів з хронічною кишковою недостатністю, а також тимчасовим або паліативним в інших клінічних станах [64].

Амінокислоти є структурними одиницями білків, ключовими елементами для хімічних процесів, що забезпечують життєдіяльність організму. Білки можуть відігравати структурну роль (формувати м'язи, органи, залози, зв'язки, сухожилля, нігті, волосся, кістки) або бути гормонами та ферментами, що каталізують і регулюють більшість життєво важливих процесів в організмі. Деякі амінокислоти беруть участь в регуляції ключових метаболічних шляхів, що мають фундаментальне значення для імунітету, розмноження, підтримки і росту. Білки та амінокислоти також є єдиним джерелом азоту для людини. Оскільки організм не має запасів білка, ріст організму, збереження клітинної структури, загоєння ран, ферментативна та гормональна спадковість залежать від постійної кількості цих речовин для компенсації щоденних втрат [65].

З початку повномасштабного вторгнення в Україну кількість випадків з опіками значно зросла. До медичних закладів потрапляли військові з мінно-вибуховими опіками, в зимній період 2023 року цивільні громадяни отримували багато побутових опіків [66]. Точну кількість випадків зафіксувати важко, тому зробимо припущення, що 2023 році в Україні зазнали опіків 40 000 людей [67]. Нехай 25% з них мають важку форму, що вимагає використання парентерального харчування [68]. Тобто це:

$$40\,000 \times 0,25 = 10\,000 \text{ осіб}$$

Захворюваність на гострий панкреатит в Україні становить 6,7-6,95 на 10 тис. Населення. Близько 10-11% хворих на гострий панкреатит потребують хірургічного

втручання [69], тобто в 2023 році лікування з гострою формою панкреатиту потребувало орієнтовно 2 652 людей.

При повному парентеральному харчуванні амінолом доза введення становить 800 мл щоденно, курс лікування займає 14 днів [5].

Незважаючи на значний прогрес у медицині, рак залишається однією з найбільших медичних проблем сучасності. Його висока смертність поступається лише захворюванням серцево-судинної системи. Щорічно до 10 млн людей у всьому світі вперше стикаються з цим діагнозом [70].

Серед асортименту лікарських засобів для лікування онкологічних захворювань алкеран, дієвий проти певних видів раку, діюча речовина якого складається з фенілаланіну [4, 71].

Згідно зі статистичними даними, у 2022 році в Україні було зареєстровано 4412 випадків захворювання на множинну мієлому, 31754 випадків – на рак яєчників, 168836 випадків – на рак молочної залози [70].

Припустимо, що 75% хворих мають пізню стадію раку яєчників [72], тобто це:

$$31754 \times 0,75 = 23\ 815 \text{ жінок.}$$

Стандартний режим лікування аденокарциноми яєчників передбачає прийом 0,2 мг/кг маси тіла на добу, перорально, розподіляючи на кілька прийомів протягом 5 днів. Цей цикл повторюється кожні 4–8 тижнів або після відновлення функцій кісткового мозку [4].

Лікування множинної мієломи становить 4-денний курс із дозуванням 0,15 мг/кг на добу. Курс повторюють кожні 6 тижнів [4].

Припустимо, що 45% хворих мають пізню стадію раку молочних залоз [73], тобто це:

$$168836 \times 0,45 = 75\ 976 \text{ жінок}$$

Лікування карциноми молочної залози включає прийом препарату перорально у дозі 0,15 мг/кг маси тіла або 6 мг/м<sup>2</sup> поверхні тіла на добу протягом 5 днів, з повторенням циклу кожні 6 тижнів [4].

Дані щодо річних потреб українців у фенілаланіні узагальнені в табл. 3.1, 3.2 та 3.3.

Таблиця 3.1.

## Річна потреба українців в препараті «Алкеран»

Вид онкологічного захворювання	К-сть хворих в Україні (у тяжкому стані)	Тривалість курсу лікування, днів	Кількість курсів	К-сть фенілаланіну, що споживається одним хворим за курс лікування, мг	К-сть фенілаланіну, що споживається одним хворим за всі курси лікування, мг	Загальна кількість фенілаланіну, що споживається усіма хворими за один рік, кг
Множинна мієлома	4412	4	8	42	336	1,5
Рак яєчників	23 815	5	8	70	560	13,3
Рак молочної залози	75 976	5	8	52,5	420	31,9
Разом						32,4

Таблиця 3.2.

## Річна потреба українців в препараті «Амінол»

Назва захворювання	К-сть хворих в Україні (у тяжкому стані)	Тривалість курсу лікування, днів	К-сть фенілаланіну, що споживається одним хворим за курс лікування, г	Загальна кількість фенілаланіну, що споживається усіма хворими за один рік, кг
Опіки	10 000	14	78,4	784
Гострий панкреатит	2 652	14	78,4	207,9
Разом				991,9

## Річна потреба українців в дієтичній добавці фенілаланіну

Назва захворювання	К-сть хворих в Україні	Тривалість курсу лікування, днів	К-сть фенілаланіну, що споживається одним хворим за курс лікування, г	Загальна кількість фенілаланіну, що споживається усіма хворими за один рік, кг
Хвороба Паркінсона	56 135	30	30	1 684
Порушення когнітивних функцій	93 479	30	30	2804
Разом				4 488

Отже, загальна кількість фенілаланіну, необхідна для забезпечення українців цільовим продуктом, становить:

$$32,4 + 991,9 + 4\,488 = 5\,512,3 \text{ кг} = 5512 \text{ кг}$$

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

На українському ринку ЛЗ та дієтичні добавки, що містять фенілаланін, представлені здебільшого продукцією від іноземних компаній-виробників: Excella GmbH (Німеччина), Now Foods (США), Source Naturals (США), Calson Labs(США), Solgar (США), Ostrovit (Польща), Naya Labs (США), Fresenius Kabi (Німеччина), Hemofarm (Сербія), Bekandze (Україна), Юрія-Фарм (Україна).

Перелік поширених в Україні препаратів з фенілаланіном представлено в *табл. 3.4.*

*Таблиця 3.4.*

#### Перелік поширених в Україні препаратів з фенілаланіном

Найменування лікарського засобу	Країна виробник	Кількість фенілаланіну в 1 л/1 капсулі	Об'єм лікарського засобу /кількість капсул (таблеток)	Ціна лікарського засобу, грн
DL-Фенілаланін (Solgar)	США	500 мг	100 капсул	1421
L-Фенілаланін (Now Foods)	США	500 мг	120 капсул	464
L-Фенілаланін (Source Naturals)	США	250 мг	100 таблеток	554
L- Фенілаланін (Bekandze)	Україна	500 мг	60 таблеток	225
Аміносол Нео 15% (Hemofarm)	Сербія	5,5 г	500 мл	444,3
Аміновен Інфант 10% (Fresenius Kabi)	Австрія	3,75 г	100 мл	676,5
Амінол (Юрія-Фарм)	Україна	7 г	400 мл	680
Алкеран (Excella GmbH)	Німеччина	2 мг (мелфалану)	25 таблеток	2606,5

Частка українських фірм серед усієї номенклатури продукції становить близько 20%, тому націлимо наше виробництво на забезпечення цієї кількості засобів.

$$5\ 512\ \text{кг} \times 20\% = 1\ 102,4\ \text{кг} = 1\ 102\ \text{кг}$$

Знаючи, що *Escherichia coli* Х11р21 синтезує 72,9 г (кг) фенілаланіну з 1 л (м<sup>3</sup>) культуральної рідини [21], можна розрахувати об'єм культуральної рідини, що необхідна для отримання 1102 кг амінокислоти:

$$\begin{aligned}72,9 \text{ кг} &- 1 \text{ м}^3 \\1102 \text{ кг} &- x \text{ м}^3 \\x &= 15,12 \text{ м}^3 = 15 \text{ м}^3\end{aligned}$$

В результаті необхідно отримати:

$$V_{\text{кр}} = 15 + (15 \times 0,4) = 21 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини}$$

Де 0,4 – втрати культуральної рідини при виділенні фенілаланіну

### **3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу фенілаланіну**

Виконаємо розрахунок, який дозволить визначити оптимальну кількість стадій ферментації та об'єм культурної рідини, що отримується за один цикл.

Прийmemo кількість трудоднів ( $T_{\text{тр}}$ ) – 90, тоді об'єм культуральної рідини за добу становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{тр}} = 21/90 = 0,23 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл складатиме:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \cdot 0,23 \cdot 59) / 24 = 0,62 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

де  $T_{\text{цф}}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (52 год) та час підготовки ферментера до роботи (7 год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1$ ).

Стадії підготовки ферментера становлять: миття та огляд (1 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1,5 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (0,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1,5 год).

Кількість циклів дорівнює:

$$N_{\text{цк}} = 24 \cdot T_{\text{тр}} / T_{\text{цф}} = 24 \times 90 / 59 = 36,6 \text{ (37) циклів}$$

Знаючи об'єм культурної рідини, необхідний для одного циклу, та коефіцієнт заповнення ( $K_3$ ) ферментера, розрахуємо його геометричний об'єм:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_3 = 0,62/0,7 = 0,88 \text{ м}^3$$

Найближчим за геометричним об'ємом стандартних апаратів є ферментер  $V_{\Phi} = 1 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 0,62/1 = 0,62 \text{ – не перевищує заданого значення}$$

### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу фенілаланіну *Escherichia coli* X1p21**

Протягом одного виробничого циклу отримують  $0,62 \text{ м}^3$  культуральної рідини. При її одержанні необхідно враховувати втрати, що виникають внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{\Phi}$ ), які становлять 10-15%.

Таким чином, з урахуванням компенсації 10% втрат, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед початком виробничого біосинтезу повинен становити:

$$V_{\text{РОБ.1}} = V_{\text{КР}} / (1 - E_{\Phi}) = 0,62 / 0,9 = 0,69 \text{ м}^3$$

де  $E_{\Phi}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює  $0,69 \text{ м}^3$ . За вибраного коефіцієнта заповнення  $0,7$  геометричний об'єм ферментера складає:  $V_{\Phi} = 0,69 / 0,7 = 0,99 \text{ м}^3$ . Оберемо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{СТ1}} = 1 \text{ м}^3$  і уточнимо коефіцієнт заповнення:

$$K_{31} = 0,69/1 = 0,69.$$

Посівний матеріал для ферментера складає 10 % від загального об'єму поживного середовища.

Для засіву  $V_{\text{РОБ.1}} = 0,69 \text{ м}^3$  середовища необхідно приготувати

$$V_{\text{ПМ1}} = V_{\text{РОБ.1}} \times X_{\Phi} = 0,69 \times 0,1 = 0,069 \text{ м}^3 = 69 \text{ л посівного матеріалу,}$$

де  $X_{\Phi} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера

Об'єм поживного середовища в ферментері тоді становитиме:

$$V_{\text{ПС1}} = V_{\text{РОБ.1}} - V_{\text{ПМ1}} = 690 - 69 = 621 \text{ л}$$

Враховуючи технологічні втрати культуральної рідини на етапі отримання  $69 \text{ л}$  інокуляту в посівному апараті, що становлять 10 % від загального об'єму внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, сумарний об'єм поживного

середовища та посівного матеріалу, необхідний для завантаження посівного апарату, визначається як:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{ПМ1}} / (1 - E_{\text{Ф}}) = 69 / 0,9 = 76,7 \text{ л} \approx 77 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 77 л за коефіцієнта заповнення 0,7 можна одержати в посівному апараті об'ємом:  $V_{\text{ПА2}} = 77 / 0,7 = 110 \text{ л}$ . Візьмемо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат  $V_{\text{СТ2}} = 130 \text{ л}$  та уточнимо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{з2}} = 77 / 130 = 0,59.$$

Розрахуємо об'єм посівного матеріалу для інокуляції 77 л з урахуванням того, що посівний матеріал складає лише десятю частину від загального об'єму поживного середовища:

$$V_{\text{ПМ2}} = V_{\text{РОБ.2}} \times X_{\text{Ф}} = 77 \times 0,1 = 7,7 \approx 8 \text{ л посівного матеріалу}$$

де  $X_{\text{Ф}} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Об'єм поживного середовища в інокуляторі складатиме:

$$V_{\text{ПС2}} = V_{\text{РОБ.2}} - V_{\text{ПМ2}} = 77 - 8 = 69 \text{ л}$$

При отриманні 8 л посівного матеріалу в інокуляторі слід врахувати втрати культуральної рідини, зумовлені краплевиносом через колектор відпрацьованого повітря. Враховуючи, що ці втрати складають 10% від загального об'єму, необхідно визначити початковий об'єм поживного середовища, який забезпечить отримання зазначеного об'єму посівного матеріалу:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{ПМ2}} / (1 - E_{\text{Ф}}) = 8 / 0,9 = 8,8 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 8,8 л за коефіцієнта заповнення 0,7 можна отримати в посівному апараті об'ємом:  $V_{\text{ПА3}} = 8,8 / 0,7 = 12,6 \text{ л} \approx 13 \text{ л}$ . Прийmemo найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{СТ3}} = 15 \text{ л}$ , та уточнимо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{з.3}} = 8,8 / 15 = 0,59.$$

Посівний матеріал становить 10 % від загального об'єму поживного середовища. Для засіву 8,8 л поживного середовища потрібно:

$$V_{\text{ПМ3}} = V_{\text{РОБ.3}} \cdot X_{\text{Ф}} = 8,8 \cdot 0,1 = 0,88 \approx 0,9 \text{ л посівного матеріалу}$$

де  $X_{\text{Ф}} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Тоді об'єм поживного середовища в інокуляторі дорівнюватиме:

$$V_{\text{ПСЗ}} = V_{\text{РОБ.З}} - V_{\text{ПМЗ}} = 8,8 - 0,9 = 7,9 \approx 8 \text{ л}$$

Щоб отримати посівний матеріал об'ємом  $V_{\text{ПМЗ}} = 0,9$  л для засіву інокулятора, можна культивувати бактерії в колбах на качалці. Зазвичай для цього використовують колби об'ємом  $V_{\text{колб}} = 750$  мл з коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{ЗК}} = 0,2$ .

Кількість колб тоді складатиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{ПМЗ}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{ЗК}}) = 900 / (750 * 0,2) = 6 \text{ колб}$$

Висновки стосовно кількості стадій і об'ємів підготовки посівного матеріалу представлені у табл. 3.5.

*Таблиця 3.5.*

**Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу**

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{\text{кр}}$ , м3 (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини $V_{\text{роб.}}$ , м3 (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$ , м3 (л)	Об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ , м3 (л)	Коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап}}$ , частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{ст}}$ , м3 (л)
IV	0,62	0,69	(69)	(621)	0,7	1
III	(69)	(77)	(8)	(69)	0,7	(130)
II	(8)	(8,8)	(0,9)	(8)	0,7	(15)
I	(0,9)	(0,9)	-	(0,9)	0,2	6 колб

Таким чином, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу фенілаланіну у ферментері об'ємом  $1 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення  $0,7$  буде проходити у три етапи.

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ФЕНІЛАЛАНІНУ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ *ESCHERICHIA COLI* XLLP21

### 4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату біологічним агентом

Джерелом вуглецю для *E. coli* Xllp21 є глюкоза [17]. Зважаючи на відсутність інформації щодо шляхів катаболізму ростового субстрату у штаму *E. coli* Xllp21 в базі даних Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), для реконструкції метаболічного шляху утилізації глюкози буде розглянуто дикий штам *E. coli* K-12 W3110, який слугував основою для генетичних модифікацій з метою отримання цільового штаму.

Відповідно до даних KEGG та статті [17, 74], катаболізм глюкози у штаму *E. coli* K-12 W3110 здійснюється шляхом гліколізу – основного метаболічного шляху для розщеплення глюкози.

На першому етапі  $\alpha$ -D-глюкоза фосфорилується до  $\alpha$ -D-глюкозо-6-фосфату за участю ферменту глюкокінази (КФ 2.7.1.2). Далі  $\alpha$ -D-глюкозо-6-фосфат під дією глюкозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.9) ізомеризується у D-фруктозо-6-фосфат. Наступний крок включає фосфорилування D-фруктозо-6-фосфату з утворенням D-фруктозо-1,6-дифосфату, що каталізується ферментом фосфотруктокіназою-2 (КФ 2.7.1.11). Далі цей проміжний метаболіт розщеплюється на два тривуглецеві з'єднання – гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксиацетонфосфат – за участю альдолази (КФ 4.1.2.13). Дигідроксиацетонфосфат перетворюється у гліцеральдегід-3-фосфат під дією триозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1). Гліцеральдегід-3-фосфат потім окиснюється до 1,3-дифосфогліцерату під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12), після чого 1,3-дифосфогліцерат перетворюється у 3-фосфогліцерат за допомогою фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3). Далі 3-фосфогліцерат ізомеризується до 2-фосфогліцерату під дією фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.11), який потім перетворюється у фосфоенолпіруват за участю енолази (КФ 4.2.1.11). Завершується гліколіз утворенням пірувату з фосфоенолпірувату внаслідок дії піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>			
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Савчук О.О.				РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ФЕНІЛАЛАНІНУ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ <i>ESCHERICHIA COLI</i> XLLP21	Літера	Аркцш	Аркцшів
Консульт.							56	6
Керівник	Пирог Т.П.					Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П.							

На рис. 4.1. представлено схему катаболічних перетворень глюкози в *E. Coli* K-12 W3110.

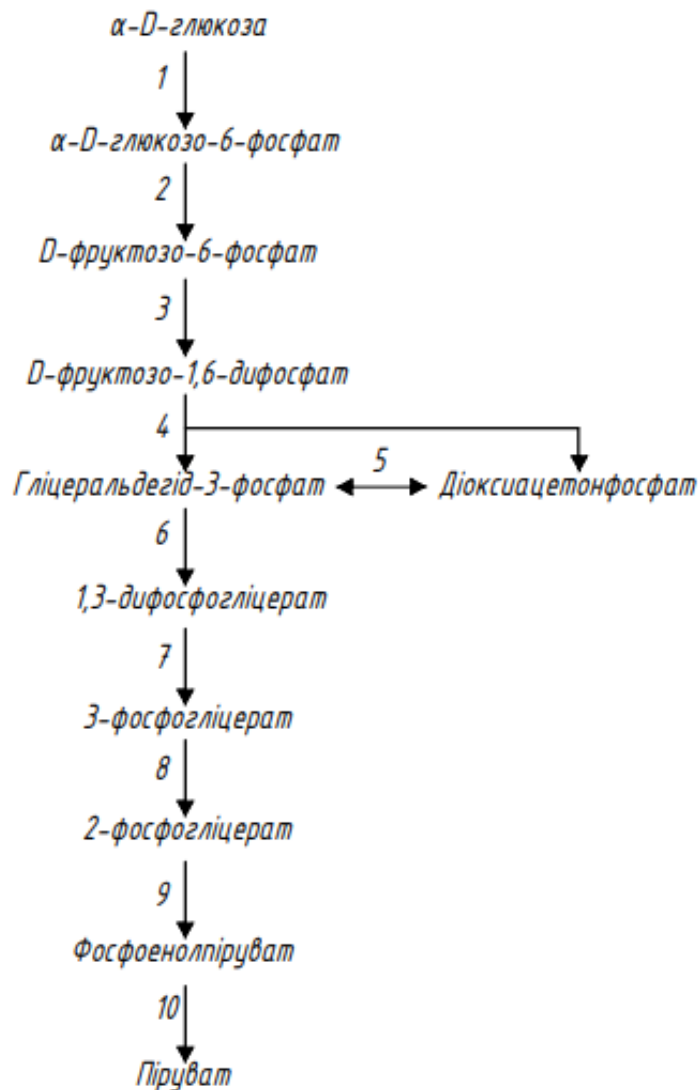


Рис. 4.1. Схема катаболізму глюкози у *E. coli* K-12 W3110

Ферменти: 1 – глюкокіназа (КФ. 2.7.1.2); 2 - глюкозофосфатізомераза (КФ. 5.3.9.1); 3 – фосфотруктокіназа-2 (КФ. 2.7.1.11); 4 – альдолаза (КФ. 4.1.2.13); 5 - триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ. 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 8 - фосфогліцераткіназа-1 (КФ. 5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ. 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40)

#### 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у фенілаланін

Процес росту K-12 W3110 супроводжується метаболізмом глюкози через шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса, кінцевим продуктом якого є піруват. Трансформація пірувату в ацетил-КоА цим штамом може здійснюватись двома основними

ферментативними системами: піруватдегідрогеназним комплексом (КФ 1.2.4.1, 1.8.1.4 та 2.3.1.12) та піруват:фередоксин-оксидоредуктазою (КФ 1.2.7.1). Ацетил-КоА, що утворюється внаслідок цих реакцій, є субстратом для подальшого функціонування циклу трикарбонових кислот [75].

Внаслідок відсутності інформації про шляхи біотрансформації ростового субстрату у штаму *Escherichia coli* Xllp21 в енциклопедії KEGG, для моделювання подальшого метаболізму буде використано інформацію про дикий штам *E. coli* K-12 W3110, що є генетичним попередником досліджуваного штаму.

Згідно з даними KEGG, анаплеротичні процеси в *E. coli* W3110 включають реакцію карбоксилювання фосфоенолпірувату, що каталізується фосфоенолпіруваткарбоксикіназою (КФ 4.1.1.49) з утворенням оксалоацетату, а також карбоксилювання пірувату до малату за участі малатдегідрогенази декарбоксилювальної (КФ 1.1.1.38) [76].

Фенілаланін входить до родини ароматичних амінокислот, попередниками яких є фосфоенолпіруват (інтермедіат гліколізу) та еритрозо-4-фосфат (інтермедіат пентозофосфатного шляху).

У пентозофосфатному шляху глюкозо-6-фосфат під дією глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49) перетворюється на глюконат-6-фосфат [77]. Фермент фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44) каталізує окисне декарбоксилювання глюконат-6-фосфату, що призводить до утворення вуглекислого газу і рибулозо-5-фосфату. Після цього рибулозо-5-фосфат підлягає дії двох ферментів: під дією рибулозо-5-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.6) перетворюється у рибозо-5-фосфат, під дією рибулозо-5-фосфат-3-епімерази (КФ 5.1.3.1) - утворюється ксилулозо-5-фосфат. Транскетолаза (КФ 2.2.1.1) каталізує перенесення карбонового фрагмента від ксилулозо-5-фосфату до рибозо-5-фосфату, що призводить до утворення гліцеральдегід-3-фосфату та седогептулозо-7-фосфату. Під дією трансальдолази (КФ 2.2.1.2) вуглецевий фрагмент із седогептулозо-7-фосфату переноситься на гліцеральдегід-3-фосфат, тим самим утворюючи фруктозо-6-фосфат та еритрозо-4-фосфат. Реакція переносу вуглецевого фрагменту із ксилулозо-5-фосфату на еритрозо-4-фосфат з утворенням фруктозо-6-фосфату та гліцеральдегід-3-фосфату здійснюється за участі транскетолази (КФ 2.2.1.1).

Внаслідок конденсації еритрозо-4-фосфату та фосфоенолпірувату за участі 3-дезоксигептулозонатсинтази (КФ 2.5.1.54) утворюється 3-дезоксигептулозонат-7-фосфат, який потім перетворюється на 3-дегідрохінат внаслідок дії 3-дегідрохінатсинтази (КФ 4.2.3.4) [78]. Дегідрохінатдегідратаза (КФ 4.2.1.10) перетворює 3-дегідрохінат на 3-дегідрошикімат, а шикіматдегідрогеназа (КФ 1.1.1.25) - 3-дегідрошикімат на шикімат. В результаті трьох послідовних реакцій за участі шикіматкінази (КФ 2.7.1.71), 3-фосфошикімат-1-карбоксивінілтрансферази (КФ 2.5.1.19) та хоризматсинтази (КФ 4.2.3.5) з шикімату утворюється хоризмат – проміжний продукт синтезу ароматичних кислот. Під дією хоризматмутази (КФ. 5.4.99.5) з хоризмату утворюється префенат, який за участі префенатдегідратази (КФ. 4.2.1.51) перетворюється в фенілпіруват. Кінцевою реакцією є трансамінування фенілпірувату до фенілаланіну ароматичною амінотрансферазою класу I (КФ 2.6.1.57).

Схему біосинтезу фенілаланіну з глюкози наведено на *рис. 4.2.*

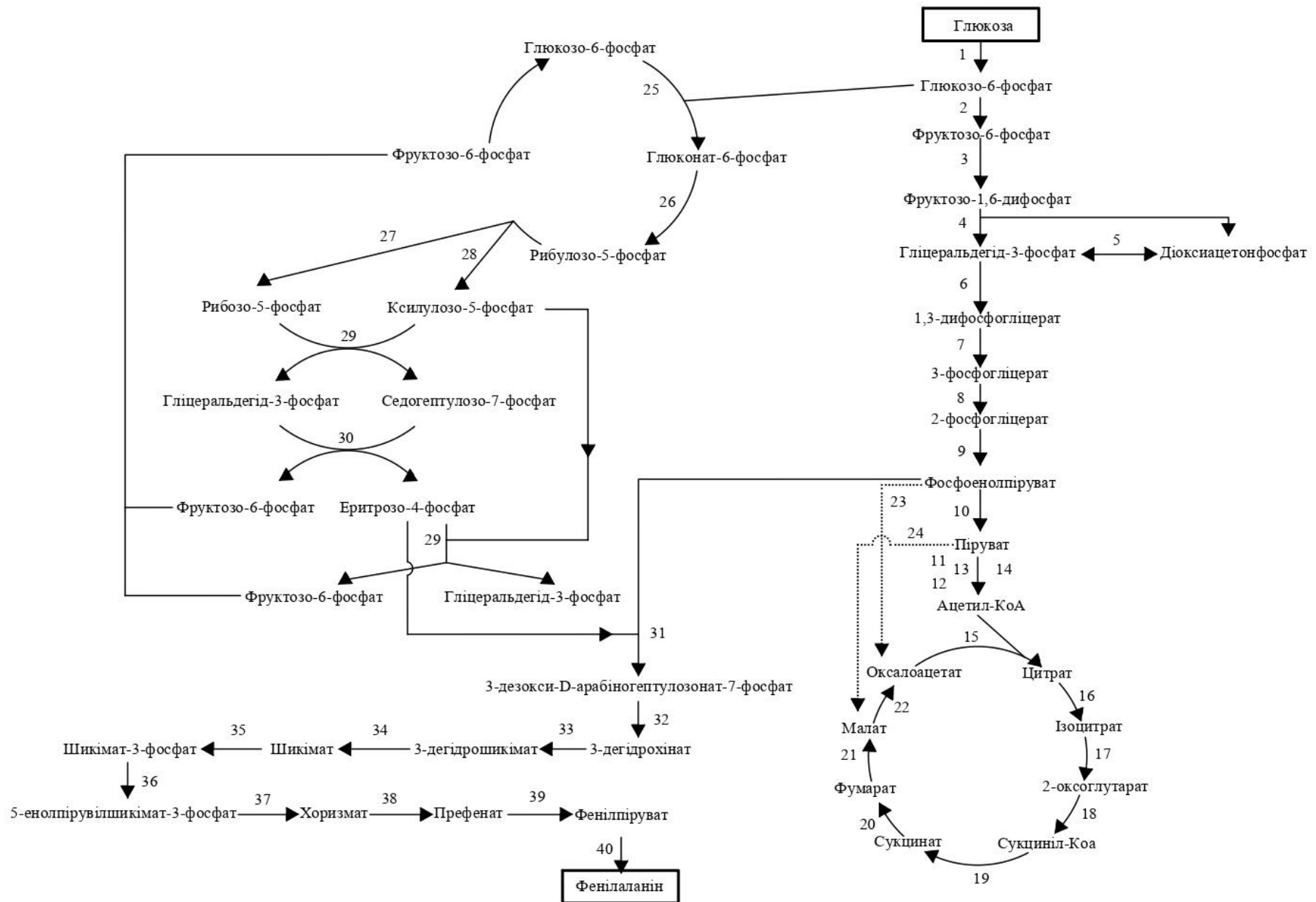


Рис. 4.2. Схематичне зображення біотрансформації глюкози *Escherichia coli* X1p21 у фенілаланін

Ферменти: 1 – глюкокіназа (КФ. 2.7.1.2); 2 - глюкозофосфатізомераза (КФ. 5.3.9.1); 3 – фосфофруктокіназа-2 (КФ. 2.7.1.11); 4 – альдолаза (КФ. 4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ. 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 8 - фосфогліцераткіназа-1 (КФ. 5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ. 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40); 11. КФ 1.2.4.1 - E1 компонент піруватдегідрогеназного комплексу; 12. КФ 1.8.1.4 – дегідроліпоатдегідрогеназа; 13. КФ 2.3.1.12 – E2 компонент піруватдегідрогеназного комплексу; 14. КФ. 1.2.7.1 – піруват:фередоксин-оксидоредуктаза; 15. КФ 2.3.3.1 – Цитратсинтаза; 16. КФ 4.2.1.3 – аконітатгідратаза; 17. КФ 1.1.1.42 – Ізоцитратдегідрогеназа; 18. КФ 1.2.4.2 - 2-оксоглутаратдегідрогеназа; 19. КФ 6.2.1.5 - Сукциніл-КоА-синтетаза; 20. КФ 1.3.5.1 – сукцинатдегідрогеназа; 21. КФ 4.2.1.2 – Фумаратгідратаза; 22. КФ 1.1.1.37 – Малатдегідрогеназа; 23. КФ 4.1.1.49 – фосфоенолпіруваткарбоксікіназа; 24. КФ 1.1.1.38 - малатдегідрогеназа декарбоксілювальна; 25. КФ 1.1.1.49 - глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; 26. КФ 1.1.1.44 - фосфоглюконатдегідрогеназа (НАДФ<sup>+</sup>-залежна, декарбоксілююча); 27. КФ 5.3.1.6 - рибулозо-5-фосфатізомераза; 28. КФ 5.1.3.1 - рибулозо-5-фосфатепімераза; 29. КФ 2.2.1.1 – транскетолаза; 30. КФ 2.2.1.2 – трансальдолаза; 31. КФ 2.5.1.54 - 3-дезоксид-7-фосфогептулонатсинтаза; 32. КФ 4.2.3.4 - 3-дегідрохінатсинтаза; 33. КФ 4.2.1.10 – дегідрохінатдегідратаза; 34. КФ 1.1.1.25 – шикіатдегідрогеназа; 35. КФ 2.7.1.71 – шикіаткіназа; 36. КФ 2.5.1.19 - 3-фосфошикіат-1-карбоксивінілтрансфераза; 37. КФ 4.2.3.5 – хоризматсинтаза; 38. КФ. 5.4.99.5 – Хоризматмутаза; 39. КФ. 4.2.1.51 – префенатдегідратаза; 40. КФ 2.6.1.57 - ароматична амінотрансфераза, I клас.

## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

*Escherichia coli* відносяться до групи факультативних анаеробних мікроорганізмів. За анаеробних умов в кишкових паличках спостерігається зниження регуляції генів, важливих для основних клітинних функцій та процесів, тим самим погіршуючи біосинтез цільового продукту [79]. Тому для ферментації фенілаланіну необхідно забезпечити аеробні умови вирощування мікроорганізмів.

У процесі вирощування посівного матеріалу та культивування, яке відбувається при температурі 37 °C і рН 7,0, існує високий ризик контамінації мезофілами та нейтрофілами, що ставить під загрозу здійснення належного процесу синтезу амінокислоти. Тому виникає необхідність забезпечити асептичні умови. Для цього здійснюється стерилізація обладнання і комунікацій, поживного середовища, підживлювального розчину та аераційного повітря. Також доцільним є створення надлишкового тиску в ферментері стерильним повітрям, яке, окрім забезпечення асептичних умов, підвищує розчинність газів, що є важливим для аеробної ферментації.

Сумарна концентрація глюкози в культуральному середовищі, що є необхідною для забезпечення оптимального синтезу заданої кількості біомаси та цільової амінокислоти продуцентом, складає 224 г/л. Така концентрація не може бути внесена у середовище відразу, тому ферментація відбуватиметься з підживленням. Також, для біосинтезу цільового продукту здійснюють глибинне культивування, яке, на відміну від поверхневого, може піддаватись допоміжним роботам для створення асептичних умов.

Синтез фенілаланіну спостерігається під час фази експоненціального росту, тому використання безперервного культивування було б більш виправданим [80]. Необхідною умовою ефективного виробництва цільового продукту є підживлення в процесі біосинтезу, однак безперервне культивування не може забезпечувати її

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>					
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>					
Розробив	Савчук О.О.							Літера	Аркцш	Аркцшів
Консульт.									62	31
Керівник	Пирог Т.П.							<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. контр.										
Зав. каф.	Стабніков В.П.									

виконання. Тому застосування періодичного культивування в цьому випадку є більш доцільним.

Під час культивування *E. coli* значення рН поживного середовища може змінюватися. На це впливають різні фактори, пов'язані з метаболічними процесами, наприклад, виділення проміжних продуктів, таких як цитрат, малат, сукцинат, вуглекислий газ та інших [81]. Тому використання 25 %-ого розчину аміачної води для регуляції рН є обов'язковим.

Знаючи умови культивування та фізіолого-біохімічні особливості продуцента необхідно обрати ферментер, конструкція та оснащення якого забезпечать належний біосинтез фенілаланіну.

Для створення аеробних умов в рідкому поживному середовищі ферментер оснащують мішалкою, барботером і датчиком рО<sub>2</sub>. Завдяки регулюванню швидкості перемішування та подачі повітря досягають необхідного рівня розчиненого кисню.

Вимог до типу мішалки у випадку використання як біологічного агента *E. coli* немає, тому оберемо турбінну мішалку. Вона, окрім підвищення рівня диспергування газу в культуральній рідині, інтенсифікує масообмінні процеси.

Однією з ключових передумов ефективного біотехнологічного процесу є підтримання стабільного та гомогенного температурного режиму в усьому об'ємі культуральної рідини. З цією метою ферментер оснащується сорочкою та датчиком безперервного контролю температури.

Наявність в поживному середовищі речовин з високим вмістом білків, наприклад, дріжджового екстракту, та аерація зумовлює піноутворення, що є неприпустимим, оскільки підвищує рівень контамінації та ускладнює використання усього робочого об'єму ферментера. Для вирішення цієї проблеми використаємо, наприклад, механічний піногасник.

Моніторинг значення рН в процесі біосинтезу цільового продукту відбувається за допомогою датчика рН.

Оскільки протягом виробництва фенілаланіну здійснюють дробне живлення, ферментер повинен бути оснащений патрубком для подачі підживлювального розчину.

Обов'язковим є наявність патрубків для подачі стерильного середовища, пари для стерилізації, води для охолодження чи нагріву реактора, для видалення вуглекислого газу та відпрацьованого повітря.

## 5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Як зазначалося раніше, *E. coli* є факультативним анаеробом. За умов кисневого дефіциту спостерігається пригнічення експресії генів, відповідальних за ключові клітинні процеси, що негативно впливає на біосинтез фенілаланіну [79]. Ось чому важливо включити підготовку стерильного аераційного повітря до технологічної схеми.

Для запобігання контамінації робочої культури при пересівах на чашки Петрі або пробірки з середовищем та при додаванні інокулятів до колб важливо забезпечити асептичні умови робочого середовища. Для цього в мікробіологічних лабораторіях і боксах біологічної безпеки/ламінарних боксах дезінфікують повітря за допомогою ультрафіолетового випромінювання (УФ-ламп) [82]. Також можна використовувати ламінарні бокси, асептичні умови яких забезпечують ламінарні потоки очищеного фільтрами повітря [83].

Процес підготовки стерильного аераційного повітря, що подається у ферментер під час виробничого біосинтезу та у інокуляторі при вирощуванні інокуляту, виконується наступним чином [84]:

1. Відбір атмосферного повітря: на найвищій точці будівлі встановлюється повітрозабірний пристрій.
2. Попереднє очищення повітря: понижує концентрацію дрібних твердих або рідких частинок та мікроорганізмів у повітрі, тим самим попереджає пошкодження турбокомпресора.

Ефективність очищення повітря за допомогою фільтрів безпосередньо залежить від рівня його забруднення. Розміри мікроорганізмів коливаються від 0,01 до 25 мкм, часто вони прикріплюються до частинок пилу, що може ускладнити їх уловлювання. В загальному, в 1 м<sup>3</sup> повітря може міститися  $1 \times 10^3$  –  $1,5 \times 10^3$  клітин. Окрім бактерій, у повітрі завжди присутні органічні та неорганічні частинки пилу та водяна пара [85].

3. Стиснення повітря до 0,35-0,5 МПа: необхідне для подолання гідравлічного опору фільтрувальних елементів та забезпечення ефективної дисперсії повітря в культуральному середовищі.

Важливо зазначити, що компресія повітря спричиняє підвищення його температури та вологовмісту. Останній наслідок неприпустимий, оскільки не лише псує фільтри внаслідок злипання волокон та утворення шляхів обтікання, але й створює оптимальні умови для розвитку бактерій, що може призвести до мікробіологічного забруднення очищеного повітря [86]. Це пояснює необхідність у технологічній схемі під час підготовки стерильного аераційного повітря теплообмінника та вологовідокремлювача.

4. Охолодження повітря: теплообмінний апарат знижує температуру повітря до 25–40°C, що спричиняє процес конденсації вологи.
5. Зневоднення повітря: з метою сепарації конденсату та масляних домішок, що утворюються в процесі стиснення повітря, встановлюють ресивер. Його функція полягає також в згладжуванні пульсацій потоку і, тим самим, забезпечує стабільну подачу повітря на наступні стадії очищення.
6. Підігрів повітря: здійснюється для кінцевого видалення вологи шляхом пропускання його через теплообмінник.
7. Стадія грубого очищення повітря: відбувається в основних фільтрах. Такі фільтри ефективно затримують до 98% частинок розміром 1-1,5 мкм, тобто більшість бактерій [85].

Для виготовлення таких фільтрів найчастіше використовують волокнисті матеріали. Їхньою особливістю є здатність утримувати частинки не лише на поверхні, але й усередині самого матеріалу. Щоб покращити характеристики фільтра, можна змінювати щільність упаковки волокон або товщину фільтруючого шару. Оптимальним рішенням є багат шарові фільтри з різною щільністю кожного шару. Такі фільтри ефективно затримують пил, довговічні та мають низький опір повітряному потоку [85].

Також застосовують фільтри з базальтових волокон. Цей матеріал має високу стійкість до пари та високих температур, не горить і не гниє, однак може містити гострі частинки, що є його недоліком [85].

8. Стадія тонкого очищення повітря: здійснюється за участі індивідуальних фільтрів, що встановлюються перед кожним ферментером [82].

З метою ефективного уловлювання мікробних частинок в якості фільтруючих матеріалів застосовують тонковолокнисті матеріали, такі як скловата (діаметр волокон 1-2 мкм) та базальтове тонке і супертонке волокно (БСТВ) з діаметром волокон 0,7-1,0 мкм [82].

Широке застосування в якості фільтруючого матеріалу знайшли мембрани з ацетилцелюлози (тканина Петрянова). До їхніх плюсів належать низький аеродинамічний опір та висока ефективність затримки мікроорганізмів. Однак, низька механічна міцність та схильність до деградації під впливом вологи є суттєвими вадами [82].

Вибір методу стерилізації фільтра обумовлений його конструкцією та матеріалом фільтруючого елемента. Для фільтрів з полімерних матеріалів, таких як ацетилцелюлоза, застосовують хімічні методи стерилізації, наприклад, обробку парою формаліну [82]. Оптимальним режимом стерилізації фільтрів з мінеральних волокон, кераміки або металокераміки є обробка парою під тиском при температурі 125-130 °С. Такий режим забезпечує повне знищення мікроорганізмів, не пошкоджуючи фільтруючий елемент.

Завершальним етапом є сушіння фільтра гарячим повітрям [87].

### **5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

#### **5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів**

Під час оцінки мийних та дезінфікуючих засобів необхідно враховувати ряд критично важливих факторів, які впливають на їх ефективність та безпечність використання [88]:

- хімічна природа основної діючої речовини;
- діапазон антимікробної активності;
- безпечність для персоналу;

- розчинність та стійкість при зберіганні;
- відсутність корозійної активності;
- вартість засобу;

Оптимальний вибір мийних та дезінфікуючих засобів здійснено на основі аналізу даних Державного реєстру дезінфекційних засобів [89] та їхньої відповідності критеріям антимікробної активності та інших релевантних характеристик.

Дезінфекційний засіб «Ultra Dez» призначений для поточної та заключної дезінфекції, генерального прибирання, а також обробки поверхонь, приладів та обладнання у фармацевтичній і мікробіологічній галузях. Характеризується антимікробною дією щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій, мікобактерій, вірусів, грибів *Candida* і плісняви. Поєднання діючих речовин різної хімічної природи (похідної гуанідину полігексаметиленгуанідин гідрохлориду, спирту ізопропілового та четвертинної амонієвої сполуки бензалконіум хлориду) сприяє підвищенню ефективності дезінфектанту. Засіб не викликає корозії та не пошкоджує матеріали, такі як скло, полімери, пластмаси та кераміка. Робочі концентрації не подразнюють шкіру, але через вміст бензалконію хлориду можуть викликати алергічні реакції у осіб з підвищеною особовою чутливістю. 5,0 %-ві розчини вважаються безпечними при інгаляційній дії. Не рекомендується поєднувати із аніонними поверхнево-активними речовинами [90].

Засіб дезінфікуючий «ONclean Оху (ОНклін Оксі)» призначений для дезінфекції поверхонь на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної та біотехнологічної промисловості. Робочі розчини проявляють виражену дезінфікуючу дію, ефективно видаляючи органічні забруднення (механічні, жирові, білкові) з поверхонь, не залишаючи залишків. Дезінфектант демонструє широку антимікробну активність щодо бактерій (*Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, антибіотикорезистентні *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Escherichia coli*, сальмонели, *Helicobacter pylori*, *Legionella*), вірусів (гепатити А, В, С, ВІЛ, парагрип, паповавіруси, аденовіруси, поліомавіруси, поліовіруси, норовіруси, коронавіруси, ротавіруси, ентеровіруси, вірус вакцинії, вірус Ебола, SARS-CoV, віруси герпесу, віруси грипу, зокрема А(Н5N1) та А(Н1N1)),

грибів (кандиди, дерматофіти, *Aspergillus niger*), а також овоцидну дію. Ефективний проти мікроорганізмів у складі біоплівки та проявляє пролонговану антимикробну дію протягом 3 годин. Зберігає активність у присутності органічних забруднень. Виявляє альгіцидні властивості. Засіб характеризується екологічною безпекою, розпадаючись на нетоксичні сполуки. У концентрованій формі є подразнюючим для шкіри, слизових оболонок очей та дихальних шляхів. Мутагенних, тератогенних та канцерогенних ефектів не виявлено [91].

Дезінфікуючий засіб «Vasept Glutar» є концентрованим розчином на основі глутарового альдегіду (7,8-8,2%) та комплексу четвертинно-амонієвих сполук (алкілдиметилбензиламоній хлорид 14,8-15,2%, дидецилдиметиламоній хлорид 6,8-7,2%). Призначений для поточної та заключної дезінфекції, а також генеральних прибирань на підприємствах фармацевтичної промисловості. Засіб проявляє широку антимикробну активність щодо грамнегативних та грампозитивних бактерій (включаючи *Mycobacterium tuberculosis*, збудників особливо небезпечних інфекцій, внутрішньолікарняних інфекцій, дифтерії, скарлатини, коклюшу, менінгіту, дизентерії, паратифів, сальмонельозів, *Listeria monocytogenes*, MRSA, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), вірусів (поліовіруси, гепатити В, С, ВІЛ-1 та -2, герпесвіруси, SARS-CoV, віруси грипу (включаючи H5N1 та H1N1), парагрипу, ротавіруси, коронавіруси, вакциніявіруси, паповавіруси, аденовіруси, норовіруси, ентеровіруси), грибів (роду *Candida*, *Aspergillus*, патогенних дерматофітів) та має спороцидні властивості. Робочі розчини не чинять шкірно-подразнюючої та сенсibiliзуючої дії. При роботі з концентратом необхідно використовувати засоби індивідуального захисту (рукавички, уникати потрапляння в очі та на шкіру) [92].

Дезінфікуючий засіб "Амінорм" дозволений для поточної та заключної дезінфекції поверхонь приміщень і технологічного обладнання на фармацевтичних та біотехнологічних підприємствах. Діючими речовинами препарату є 1,3-пропандіамін, N-(3-амінопропіл)-N-додецил – 2,0%-3,0%, алкіл(C12-C16)диметилбензиламонійхлорид 8,0%-10,0%, хелатний та антикорозійний комплекси, регулятор рН, інгібітор корозії. Несумісний з милами та аніонними ПАВ. Засіб має бактерицидну дію проти багатьох грампозитивних та грамнегативних

бактерій (включаючи кишкову паличку, ентеробактерії, стафілококи, стрептококи, ентерококи, синьогнійну паличку та інші). Виявляє туберкулоцидні (щодо *Mycobacterium tuberculosis* та *M. terrae*) та спороцидні властивості. Ефективний проти вірусів (поліомієліту, гепатитів А, В, С, ВІЛ, рота-, корона-, філо-, ханта-, ентеровірусів, грипу, парагрипу, герпесу) та грибів (кандид, дерматофітів, пліснявих грибів, включно зі спорами). Засіб "Амінорм" характеризується пролонгованою знезаражувальною дією, активний при високому рівні органічного забруднення, ефективно видаляє та запобігає утворенню біологічних плівок, а також активний проти мікроорганізмів у складі біоплівок. Робочі розчини засобу характеризуються низьким рівнем подразнення шкіри, слизових оболонок верхніх дихальних шляхів та очей. Засіб не виявляє канцерогенних, мутагенних, ембріотоксичних, тератогенних та гонадотоксичних властивостей. Засіб є біологічно розкладним [93].

Лужний пінний мийний засіб з антимікробною та дезінфікуючою дією «PUR-272» призначений для очищення, миття та дезінфекції поверхонь обладнання, стін, стель у фармацевтичній та мікробіологічній промисловості. До складу засобу входять натрій гіпохлорит - 4,0-6,0%, натрій гідроксид – 2,0-7,0% та калій гідроксид - 1,0-5,0%, що забезпечують ефективне видалення білкових, жирових та механічних забруднень. Засіб активний проти грамнегативної та грампозитивної мікрофлори, зокрема *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Oospora lactis*, *Salmonella typhimurium*, а також грибів роду *Candida*, дерматофітів, пліснявих грибів та специфічної мікрофлори (термотолерантні та загальні коліформні бактерії). Робочі розчини до 1,0% (за активним хлором) не викликають подразнення шкіри та органів дихання при одноразовій дії, однак концентрат засобу чинить подразнюючу дію на шкіру, слизові оболонки очей і дихальних шляхів; багаторазове використання може спричинити сухість та лущення шкіри, тому дуже важливо використовувати засоби індивідуального захисту [94].

«Efir C-12» — лужний пінний мийний засіб з дезінфікуючими властивостями, що містить активний хлор. Призначений для очищення та санітарної обробки обладнання з нержавіючої сталі, а також облицьованих кахлем стін і підлогових

покриттів у харчовій, фармацевтичній та інших галузях. Засіб ефективно видаляє білкові, жирові та інші органічні забруднення, чинить виражену антимікробну дію. Не містить силікатів та фосфатів. До складу препарату входять: гідроксид натрію — 25%, гіпохлорит натрію — 5%, поверхнево-активні речовини — 10%, що забезпечують миючі та дезінфекційні властивості засобу. Робочі розчини Efir C-12 не рекомендовані для використання на поверхнях з алюмінію, цинку та інших кольорових металів через можливу корозійну дію [95].

Узагальнена інформація про мийні та дезінфікуючі засоби представлена в *табл. 5.1*. Також важливим аспектом дезінфекційних засобів є антисептики для рук.

Антисептичний засіб «Antivirax» містить у своєму складі етанол денатурований (80% м/м), перекис водню, гліцерин та демінералізовану воду. характеризується широким спектром антимікробної активності, включаючи збудників вірусних та грибкових інфекцій, бактеріальних захворювань. Засіб є повністю безпечним для здоров'я працівників, що робить його придатним для регулярного використання у виробничих умовах [96,97].

Дезінфікуючий засіб «Гронтнол Е» містить у своєму складі етиловий спирт, хлоргексидину біглюконат, функціональні добавки, зокрема натуральну олію алое вера та комплекс провітамінів. Засіб забезпечує зручність у використанні, оскільки сприяє легшому надяганню медичних рукавичок, має антиперспірантні, ранозагоювальні та протизапальні властивості, швидко висихає та не залишає нальоту. Препарат демонструє широкий спектр антимікробної активності щодо різноманітних бактерій, вірусів та грибів. «Гронтнол Е» не спричиняє подразнення шкіри та не має сенсibiliзуючої дії навіть при багаторазовому застосуванні, не порушує водно-ліпідний баланс шкіри, а навпаки – сприяє її зволоженню та пом'якшенню. Проте при потраплянні на слизові оболонки очей засіб може викликати подразнення. Водночас «Гронтнол Е» є екологічно безпечним, що підвищує його привабливість для використання у виробничих умовах [98].

## Порівняльна характеристика засобів для миття та дезінфекції

Назва засобу	Склад	Призначення	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (конц. робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість*	Джерело
Дезінфекційний засіб «Ultra Dez»	полігексаметиленгуанідин гідрохлорид 2%, спирт ізопропіловий 5,5 %, бензалконіум хлорид 3,25%,	для поточної та заключної дезінфекції, генерального прибирання, а також обробки поверхонь, приладів та обладнання	Грамнегативна грампозитивна бактерії, віруси, гриби роду <i>Candida</i> пліснява	безбарвна прозора рідина, практично без запаху (може відчуватися легкий запах ізопропанолу). рН концентрату – $7,0 \pm 1,5$ . Водні розчини, що утворюються, є прозорими та мають добрі змочувальні та мийні властивості. Засіб легко змивається з оброблених поверхонь, не залишаючи плям та нальоту.	Не викликає корозії та не пошкоджує матеріали, такі як скло, полімери, пластмаси, кераміка, гума, каучук, штучна шкіра, кахель, порцеляна, поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбованим, гальванічним, полімерним покриттям	Спосіб застосування: протирання ганчіркою, змоченою у робочому розчині (діапазон концентрації 0,5-3,0%). Норма витрати розчину – 100 мл/м <sup>2</sup> .	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру засобів 2021 року за №414 Дата внесення: 17.12.2021 Термін дії до: 17.12.2026	5 л коштує 514 грн	[90]
Засіб дезінфікуючий «ONclean Оху (ОНклін Оксі)»	перексид водню – 35,0%	для дезінфекції поверхонь на підприємствах біотехнологічної промисловості	Грамнегативна грампозитивна бактерії, віруси, гриби роду <i>Candida</i> , пліснява, водорості	Безбарвна прозора рідина, яка повністю розчиняється у воді та має окислювальні властивості.. Засіб ефективно дезінфікує поверхні, усуваючи різні типи забруднень (механічні, жирові, білкові, вуглеводневі). Після обробки розчин легко змивається, не залишаючи слідів, нальоту чи плям.	Не викликає корозії та не пошкоджує матеріали, такі як скло, гума, каучук, полімерні матеріали, силікон, пластмаси	Спосіб застосування: протирання ганчіркою, змоченою у робочому розчині (діапазон концентрації 3,0-6,0%). Норма витрати розчину – 100 мл/м <sup>2</sup> .	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру засобів 2023 року за №12 Дата внесення: 28.03.2023 Термін дії до: 28.03.2028	5 л коштує 593 л	[91]
Дезінфікуючий засіб «Vasept Glutar»	глутаровий альдегід - 7,8-8,2%, алкілдиметилбензиламоній хлорид - 14,8-15,2%, дидецилдиметиламоній хлорид - 6,8-7,2%	для очищення, миття та дезінфекції поверхонь обладнання, стін, стель, підлоги	Грамнегативна грампозитивна бактерії, віруси, гриби, спори	однорідна прозора рідина. Деззасіб характеризується мають мийні, очищувальні та дезодоруючі властивості. не потребує змивання, не фіксує органічні забруднення, легко змивається та не залишає слідів. Ефективно видаляє механічні, білкові, жирові забруднення.	Засіб безпечний для різних матеріалів (пластик, гума, метали, скло)	Спосіб застосування: протирання ганчіркою, змоченою у робочому розчині (діапазон концентрації 0,1-0,3 %).	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру засобів 2022 року за №86 Дата внесення: 24.05.2022 Термін дії до: 24.05.2027	1 л коштує 450 грн	[92]

Засіб дезінфікуючий «АМІНОРМ»	1,3-Пропандіамін, N-(3-амінопропіл)-N-додецил - 2,0% - 3,0%, алкіл(C12 - C16) диметилбензиламонійхлорид 8,0% – 10,0%	для поточної та заключної дезінфекції поверхонь приміщень і технологічного обладнання	Грамнег. та грам поз. бактерії, віруси, гриби	Деззасіб являє собою однорідну прозору рідину від світло-жовтого до зеленого кольору зі специфічним запахом сировини. Робочі розчини (рН 7,5-11,0 для 0,05%-1,0%) мають мийні, дезодоруючі, змочувальні та емульгуючі властивості, усувають неприємні запахи (включаючи цвіль). Добре змивається, не залишає слідів, не фіксує органічні забруднення, не знебарвлює та не пошкоджує тканини. Ефективно видаляє механічні, білкові та жирові забруднення.	Засіб безпечний для широкого спектра матеріалів, включаючи різні метали (корозійностійкі та нестійкі, кольорові сплави, анодований алюміній, олово, нелегована сталь, латунь, бронза), цементи, кераміку, гуму, скло, полімери (включаючи штучну шкіру, каучук, латекс, поліамід, полікарбонат, полівінілхлорид, акрилове скло, полістирол, силікон, альгінат, гідроколоїд), пластмаси, дерево, кахель, порцеляну, фаянс	Спосіб застосування: протирання ганчіркою, змоченою у робочому розчині (діапазон концентрації 0,1-0,5 %). Норма витрати розчину – 50-100 мл/м <sup>2</sup> .	Миючий засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2022 року за №48 Дата внесення: 17.02.2022 Термін дії до: 17.02.2027	5 л коштує 1560 грн	[93]
Мийний засіб з дезінфекційною дією «PUR-272»	натрій гіпохлорит - 4,0-6,0%, натрій гідроксид – 2,0-7,0% та калій гідроксид - 1,0-5,0%	для очищення, миття та дезінфекції поверхонь обладнання, стін, стель	Грамнег. та грам поз. бактерії, гриби	Безбарвна прозора рідина, з помірним запахом гіпохлориту. Має мийні властивості, ефективно видаляє різні забруднення, не фіксує їх, легко змивається і не залишає слідів.	Розчин безпечний для більшості матеріалів (нержавіюча сталь, скло, гума, полімери, дерево, кераміка, покриття), крім кольорових металів	Спосіб застосування: протирання ганчіркою, змоченою у робочому розчині (діапазон концентрації 1,0-3,0 %).	Миючий засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №891 Дата внесення: 19.08.2020 Термін дії до: 19.08.2025	5 л коштує 550 грн	[94]
Дезінфікуючий миючий засіб «Efir C-12»	гідроксид натрію — 25%, гіпохлорит натрію — 5%, поверхнево-активні речовини — 10%	для очищення та санітарної обробки обладнання, стін та підлогових покриттів	Грамнег. та грам поз. бактерії	рідина щільністю 1,18...1,22 кг/дм <sup>3</sup> , має концентрацію водневих іонів (рН) 10,0...11,0, вміст активного хлору 5,0 % або 300-400 ppm. Ефективно видаляє органічні забруднення білкової та жирової природи	Засіб безпечний для поверхонь з нержавіючої сталі, пластику, кахлю та керамограніту. При обробці алюмінію та міді рекомендується обережність. Перед використанням доцільно провести пробне миття для підбору оптимальних умов — концентрації, температури та тривалості.	Спосіб застосування: протирання ганчіркою, змоченою у робочому розчині (діапазон концентрації 3,0-5,0 %).	Миючий засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2021 року за №319 Дата внесення: 25.08.2021 Термін дії до: 25.08.2026	24 л коштує 1944 грн	[95]

Примітка: \*ціни наведені станом на 21.05.2025:

<https://nikohoreca.com.ua/ua/p2103433084-helper-prof-dezinfikuyuchij.html> <https://hlorka.in.ua/ua/p2422776537-onclean-oxy-onklin.html>  
<https://vladasept.com.ua/ua/p1747150234-zasib-dezinfikuyuchij-vasept.html> <https://hlorka.in.ua/ua/p1798536629-aminorm.html>  
<https://coagulant.com.ua/catalog/pur-272/> <https://pro-formula.com.ua/efir-c-12-ua.html>



стерилізації розчину глюкози, Р-35 – реактор-змішувач на 300 л для приготування композиції В; Р-31 – реактор-змішувач на 500 л для приготування композиції Б; Ф-37 – ферментер об'ємом 1 м<sup>3</sup>, Л – лабораторія, Ш – приміщення з шейкерами

Біотехнологічні підприємства з ферментаційним обладнанням об'ємом від 1 м<sup>3</sup> повинні відповідати чинним будівельним вимогам. Відповідно, ширина конструкції становитиме 18 м, а довжина – 6 м, що узгоджується з розмірами стандартних плит. В табл. 5.2. представлено габарити основного обладнання.

Таблиця 5.2.

**Геометричні характеристики виробничих установок для виготовлення фенілаланіну *E. coli* xllp21**

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Збірник (З-38) для аміачної води	40	0,6	0,53
Ферментер (Ф-37)	1000	0,9	3
Реактор-змішувач (Р-35) для приготування композиції В	300	1,5	2,8
Реактор-змішувач (Р-31) для приготування композиції Б	500	1,5	2,8
Реактор-змішувач (Р-29) для приготування композиції А	50	0,325	0,96
Інокулятор (І-26)	100	0,4	1,21
Реактор-змішувач (Р-24) для приготування композиції В	40	0,5	0,75
Реактор-змішувач (Р-21) для приготування композиції Б	60	0,856	1,58
Реактор-змішувач (Р-19) для приготування композиції А	5	0,9	1,3
Інокулятор (І-18)	15	1	1,9
Реактор-змішувач (Р-16) для приготування композиції В	5	0,41	0,84
Реактор-змішувач (Р-14) для приготування та стерилізації композиції Б	5	0,9	1,3
Реактор-змішувач (Р-12) для приготування та стерилізації розчину глюкози	300	1,5	2,8
Реактор-змішувач (Р-9) для приготування та стерилізації 6% розчину натрію гідроксиду	2	0,54	1,65
<b>Всього</b>	<b>2 422</b>		

Для забезпечення подачі невеликих об'ємів компонентів, деяке обладнання розміщено над ферментером та інокулятором. На рівні 2,9 м над інокулятором (І-26)

встановлено: реактор-змішувач (P-14) для приготування та стерилізації композиції Б, реактор-змішувач (P-16) для приготування композиції В, інокулятор (I-18) та реактор-змішувач (P-19) для приготування композиції А. На висоті 3,8 м над ферментером (Ф-37) знаходяться: реактор-змішувач (P-9) для приготування та стерилізації 6% розчину натрію гідроксиду, збірник (З-38) для аміачної води та реактор-змішувач (P-29) для приготування композиції А.

Як зазначено в *табл. 5.2*, сумарний об'єм змішувальних реакторів інокуляторів та ферментера, що використовуються для культивування посівного матеріалу та промислового біосинтезу, дорівнює 2 422 м<sup>3</sup>.

Для підтримання належного рівня чистоти у виробничих зонах миття підлоги проводиться щоденно, тобто загалом 90 разів. Генеральне прибирання, що включає обробку стін, підлоги та вікон, здійснюється 3 рази на 90 днів. Для точного визначення необхідної кількості миючих та дезінфікуючих засобів необхідно розрахувати загальну площу обробки, враховуючи площу підлоги та стін.

Просторові параметри цеху виробничого біосинтезу характеризуються наступними значеннями: площа підлогового покриття – 72 м<sup>2</sup> (12 м × 6 м), площа стін – 216 м<sup>2</sup>  $[(12 \text{ м} \times 6 \text{ м}) + (6 \text{ м} \times 6 \text{ м})] \times 2$ , що дає сумарну площу обробки – 288 м<sup>2</sup> (72 м<sup>2</sup> + 216 м<sup>2</sup>). Детальна інформація щодо загальної площі обробки всього виробництва представлена в *табл. 5.3*.

*Таблиця 5.3.*

**Результати обчислень сумарної площі стінових та підлогових покриттів виробничих приміщень**

<b>Приміщення</b>	<b>Площа підлоги, м<sup>2</sup></b>	<b>Площа стін, м<sup>2</sup></b>	<b>Загальна площа, м<sup>2</sup></b>
Виробничий цех	72	216	288
Лабораторія	18	108	126
Приміщення з шейкерами	18	108	126
<b>Загальна площа</b>	<b>108</b>	<b>432</b>	<b>540</b>

Біосинтез фенілаланіну передбачає 37 виробничі цикли. З метою дотримання санітарних норм, обладнання підлягає обов'язковій санітарній обробці перед кожним циклом. Враховуючи додаткову операцію очищення після завершення останнього

циклу, загальна кількість санітарних обробок складає 38. В підсумку, сумарний об'єм деззасобів та засобів для миття дорівнюватиме:

$$2\,422 \times 38 = 92\,036 \text{ м}^3$$

Дані, що відображають сумарні площі, які підлягають миттю та дезінфекції, за весь період виробничих циклів, містяться в *табл. 5.4*.

*Таблиця 2.4.*

**Загальна площа поверхонь для очищення та дезінфекції, що виникає за весь період біосинтезу фенілаланіну *E. coli* xllp21**

<b>Поверхні, що підлягають санітарній обробці</b>	<b>Площа (об'єм) поверхні, м<sup>2</sup> (м<sup>3</sup>)</b>	<b>Кількість заходів з миття та/або дезінфекції, проведених протягом усіх виробничих циклів</b>	<b>Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за період усіх виробничих циклів, м<sup>2</sup> (м<sup>3</sup>)</b>
Обладнання	2 422	38	92 036
Підлога	108	90	9 720
Стіни	432	3	1 296

Для очищення інокуляторів, ферментерів та реакторів великих об'ємів, що використовуються у виробництві, застосовуються СІР-мийки, що забезпечує зменшення споживання мийних засобів порівняно з традиційними методами ручного очищення. За один цикл очищення автоматична станція використовує об'єм миючого засобу в середньому 25% від об'єму обладнання. Відповідно, для очищення та дезінфекції 92 036 м<sup>3</sup> апаратури річний обсяг використання миючого засобу складе:

$$92\,036 \times 0,25 = 23\,009 \text{ м}^3$$

З метою систематизації інформацію щодо вибору миючих та дезінфікуючих речовин доцільно подати як *табл. 5.5*.

**Систематизована характеристика споживання миючих та дезінфікуючих засобів під час промислового виробництва фенілаланіну**

Найменування препарату для миття/дезінфекції (активна речовина)	Обладнання або поверхня, що очищається/знезаражується	Конц. робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за період усіх виробничих циклів, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість робочого розчину за період усіх виробничих циклів*, л	Вартість 1 л/кг мийного/дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Сумарна ціна миття та/або дезінфекції за період усіх виробничих циклів, грн
Дезінфекційний засіб «Ultra Dez» (ЧАС, похідна гуанідину, ізопропіловий спирт)	Поверхні в приміщеннях	3,0	11 016	1 101,6	102,8	3,08	3 392,9
Дезінфекційний засіб «ONclean Оху (ОНклін Оксі)» (пероксид водню)	Поверхні в приміщеннях	6,0	11 016	1 101,6	118,6	7,12	7 843,4
Дезінфекційний засіб «Vasept Glutar» (глутаровий альдегід, комплекс ЧАС)	Поверхні в приміщеннях	0,2	11 016	1 101,6	450	0,9	991,4
Засіб дезінфікуючий «АМІНОРМ» (комплекс ПАР)	Поверхні в приміщеннях	0,25	11 016	1 101,6	312	0,78	859,2
Мийний засіб з дезінфекційною дією «PUR-272» (натрій гіпохлорит, натрій гідроксид, калій гідроксид)	Обладнання	1,0	92 036	23 009	110	1,1	25 309,9
	Поверхні в приміщеннях	0,5	11 016	1 101,6		0,55	605,9
Дезінфікуючий миючий засіб «Efig C-12» (гідроксид натрію, гіпохлорит натрію, ПАР)	Обладнання	3,0	92 036	23 009	81	2,43	55 911,9
	Поверхні в приміщеннях	5,0	11 016	1 101,6		4,05	4 461,5

\* - розрахунок виконано на основі нормативних показників споживання засобу для обробки поверхонь приміщень (100 мл/м<sup>2</sup>)

Згідно з результатами аналізу даних *табл. 5.5*, найбільш придатними для виробничого процесу є миючі та дезінфікуючі засоби «PUR-272» та «АМІНОРМ», оскільки обидва агенти демонструють економічно ефективне застосування за період усіх виробничих циклів.

Використання одного й того самого дезінфекційного засобу протягом тривалого часу може призвести до розвитку резистентності мікроорганізмів, що знижує ефективність дезінфекції. Для запобігання цьому явищу рекомендується впроваджувати ротацію засобів для дезінфекції раз на 1-3 місяці та підбирати засоби з різними активними діючими речовинами [88]. А тому, у разі необхідності заміни «АМІНОРМ» доцільним варіантом є використання «Vasept Glutar».

#### **5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища**

Відповідно до проведених раніше обчислень (*див. підпункт 3.4..*) біосинтез фенілаланіну здійснюється в промисловому ферментаторі об'ємом 1 м<sup>3</sup>, який заповнюється 0,621 м<sup>3</sup> поживного середовища (ПС) та 69 л посівного матеріалу (ПМ). Підготовка інокуляту проходить у 3 етапи:

- в колбах на шейкері, для яких готується 0,9 мл середовища культивування;
  - в інокуляторі на 15 л, рівень ПС в якому становить 8 л;
  - в інокуляторі на 130 л, для культивування в якому необхідно підготувати 69 л ПС;
- Для досягнення найвищої продуктивності бактеріального штаму *E. coli Xlip 21* при виробництві фенілаланіну використовується середовище, що містить (г/л) [17]:
- Глюкоза - 20;
  - Дріжджовий екстракт – 4;
  - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 10;
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 5;
  - MgSO<sub>4</sub> - 5;
  - FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,015;
  - MnSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O – 0,015;
  - Бетаїн - 3;
  - Біотин – 0,00001;

- Тирозин - 0,25;
- $\text{NH}_4\text{OH}$  – 60,4 мл;

#### 5.4.1. Обґрунтування необхідності приготування підживлювального розчину

Загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу необхідної кількості біомаси та амінокислоти, становить 224 г/л. Така концентрація не може бути внесена у середовище відразу, тому ферментація відбуватиметься з підживленням.

Виходячи з того, що початкова концентрація субстрату становить 20 г/л, а загальна потреба – 224 г/л, додаткова кількість глюкози, яку необхідно внести, дорівнює  $224 - 20 = 204$  г/л.

Для визначення загальної кількості глюкози, необхідної для приготування підживлювального розчину, проведемо розрахунок. Враховуючи, що загальний об'єм поживного середовища для виробництва становить 621 л, кількість глюкози, яку потрібно додати:

204 г глюкози - 1 л середовища,

X г глюкози - 621 л середовища.

$$X = \frac{621 \times 204}{1} = 126\,684 \text{ г} = 126,7 \text{ кг глюкози}$$

Наступний крок: визначимо об'єм 70% розчину глюкози, який міститиме необхідну кількість глюкози (126,7 кг):

70 кг глюкози – 100 л розчину,

126,7 кг глюкози – x л розчину.

$$X = \frac{126,7 \times 100}{70} = 181 \text{ л розчину}$$

Стерилізація та приготування 181 л цього розчину здійснюється в реакторі-змішувачі на 300 л при температурі 112°C протягом 30 хв.

З огляду на те, що процес біосинтезу триває 52 години, а підживлення проводиться періодично кожні 4 години (останнє – за 4 години до завершення), визначимо кількість порцій та об'єм кожної порції глюкозного розчину.

Кількість порцій підживлення:

$$\frac{52 - 4}{4} = 12$$

Об'єм 1 порції:

$$\frac{181}{12} = 15,1 \text{ л}$$

Для виробничого біосинтезу використовується ферментер об'ємом 1 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,7. За такої умови при використанні підживлюваного розчину та титрувального реагенту кінцевий об'єм в реактиві становитиме понад 800 л, тобто загальний коефіцієнт дорівнюватиме 0,8, що перевищує норму. Тому було прийнято рішення зменшити об'єм поживного середовища до 521 л, однак кількість компонентів вноситимемо з розрахунку на 621 л.

#### 5.4.2. Розрахунок кількості мінерних компонентів середовища та обґрунтування необхідності приготування запасного розчину біотину

Для кожної стадії виробництва необхідно розрахувати точну кількість таких мінерних компонентів (див. *табл. 5.6*).

*Таблиця 5.6.*

#### Розрахунок вмісту мінерних елементів у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст мікроелементів				
	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	Бетаїн	Біотин	Тирозин
0,9	13,5 мг	13,5 мг	2,7 г	9 мкг	0,225 г
8	120 мг	120 мг	24 г	80 мкг	2 г
69	1,035 г	1,035 г	207 г	0,69 мг	17,25 г
621	9,315 г	9,315 г	1,863 кг	6,21 мг	155,25 г

Після проведення аналізу даних *табл. 5.6*. та знаючи, що для введення в композицію компонента, вага якого менша 10 мг [84], необхідно приготувати концентрований розчин, дійшли до висновку про необхідність приготування запасного розчину біотину. Додаватиметься цей розчин під час усіх етапів приготування поживних середовищ.

Біотин погано розчиняється у воді - 22 мг/100 мл [99]. Для забезпечення стерильності розчину біотину здійснюють автоклавування при температурі 112°C протягом 30 хв.

### 5.4.3. Розрахунок кількості тирозину для кожної стадії виробництва і особливості його приготування

Тирозин теж характеризується низькою розчинністю у воді – 0,45 г/л [100].

Розрахуємо об'єм води, необхідний для приготування композиції з тирозином та необхідні для цього реактори для кожного етапу виробництва (табл. 5.7).

Для підготовки 0,9 л поживного середовища в колбах на шейкері використовують 225 мг тирозину.

$$\begin{array}{l} 450 \text{ мг} - 1000 \text{ мл} \\ 225 \text{ мг} - x \text{ мг} \\ X = \frac{225 \times 1000}{450} = 500 \text{ мл води} \end{array}$$

Для приготування цього об'єму розчину візьмемо колбу на 1 л. Автоклавування здійснюватиметься при  $p = 0,05$  МПа,  $t = 112$  °С,  $\tau = 30$  хв.

Дозування тирозину для приготування 8 л ПС в інокуляторі об'ємом 15 л становить 2 г.

$$\begin{array}{l} 0,45 \text{ г} - 1 \text{ л} \\ 2 \text{ г} - x \text{ мг} \\ X = \frac{2 \times 1}{0,45} = 4,4 \text{ л води} \end{array}$$

Оберемо 7-літровий реактор, в якому тирозин стерилізуватиметься упродовж 30 хв при температурі 112°С та тиску 0,05 МПа.

Процес підготовки поживного середовища в посівному апараті на 130 л передбачає додавання 17,25 г тирозину до 69 літрів поживного середовища.

$$\begin{array}{l} 0,45 \text{ г} - 1 \text{ л} \\ 17,25 \text{ г} - x \text{ мг} \\ X = \frac{17,25 \times 1}{0,45} = 38,3 \text{ л} \approx 38 \text{ л води} \end{array}$$

Стерилізація та приготування 38 л композиції з тирозином здійснюється в реакторі-змішувачі на 63 л за таких умов: температура - 112°С тиск - 0,05 МПа, час стерилізації - 30 хв.

Для приготування 621 л поживного середовища для виробничого біосинтезу використовують 155,25 г тирозину.

$$0,45 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$155,25 \text{ г} - x \text{ мг}$$

$$X = \frac{155,25 \times 1}{0,45} = 345 \text{ л води}$$

Для такого об'єму оберемо 500-літровий реактор, де композиція буде готуватись та стерилізуватись 30 хв при температурі 112°C та тиску 0,05 МПа.

*Таблиця 5.7.*

**Розрахунок вмісту та особливості приготування тирозину для всіх етапів виробництва**

Об'єм середовища, л	Вміст, г	Об'єм розчину, мл	Особливість приготування
0,9	225 мг	500 мл	В колбі на 1000 мл
8	2 г	4,4 л	В реакторі на 7 л
69	17,25 г	38 л	В реакторі на 63 л
621	155,25 г	345 л	В реакторі на 500 л

**5.4.4. Розрахунок кількості дріжджового екстракту і глюкози для кожної стадії і особливості приготування їх розчинів**

Розчинність дріжджового екстракту – 410 г/л [101]. Визначимо об'єм води, необхідний для його розчинення для кожного етапу приготування поживних середовищ (*табл. 5.8*).

При приготуванні поживного середовища для одержання посівного матеріалу в колбах на качалках необхідно додати 3,6 г дріжджового екстракту. Тобто:

$$410 \text{ г} - 1000 \text{ мл}$$

$$3,6 \text{ г} - x \text{ мл}$$

$$x = \frac{3,6 \times 1000}{410} = 25,6 \text{ мл води}$$

При підготовці 8 л поживного середовища на наступній стадії необхідно 32 г дріжджового екстракту.

$$410 \text{ г} - 1000 \text{ мл}$$

$$32 \text{ г} - x \text{ мл}$$

$$x = \frac{32 \times 1000}{410} = 78 \text{ мл води}$$

Для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 130 л, що містить 69 л ПС, застосовують 276 г дріжджового екстракту.

$$\begin{array}{l} 410 \text{ г} - 1000 \text{ мл} \\ 276 \text{ г} - x \text{ мл} \\ x = \frac{276 \times 1000}{410} = 763,2 \text{ мл води} \end{array}$$

При приготуванні поживного середовища для виробничого біосинтезу потрібно додати 2084 г дріжджового екстракту.

$$\begin{array}{l} 410 \text{ г} - 1000 \text{ мл} \\ 2484 \text{ г} - x \text{ мл} \\ x = \frac{2484 \times 1000}{410} = 6058,5 \text{ мл} \sim 6,1 \text{ л води} \end{array}$$

Через високу схильність глюкози до контамінації, задля запобігання мікробного забруднення, композиції зазвичай готують з максимально можливим вмістом (40%) цього вуглеводу (*табл.5.8*).

*Таблиця 5.8.*

### **Розрахунок вмісту та дріжджового автолізу та глюкози для всіх етапів виробництва**

Об'єм середовища, л	Дріжджовий екстракт		Глюкоза		Об'єм композиції А, мл (л)	Особливості приготування композиції А
	Вміст, г	Об'єм води, мл (л)	Вміст, г (кг)	Об'єм води, мл (л)		
0,9	3,6	25,6	18	45	50	У колбі на 100 мл
8	32	78	160	400	400	У колбі на 750 мл
69	276	763,2	1380	3450	(3,5)	У реакторі на 5 л
621	2484	(6,1)	(12,42)	(31,05)	(31,1)	У реакторі на 50 л

При аналізуванні розрахунків, що наведені в *табл. 5.8*, дійшли висновку, що оптимальні умови для створення концентратів дріжджового автолізу та глюкози потребують різного співвідношення компонентів та води. Це означає, що при фіксованому об'ємі композиції неможливо одночасно досягти максимальної

концентрації обох речовин. З огляду на це, загальний об'єм композиції буде розраховуватися таким чином, щоб забезпечити найвищу можливу концентрацію глюкози, оскільки саме цей компонент був визначений як пріоритетний у даному випадку.

#### **5.4.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в колбах на качалках**

Для першого етапу вирощування інокуляту використовують 6 качалочних колб об'ємом 750 мл, щоб одержати 0,9 л стерильного ПС. З урахуванням того, що різні компоненти вимагають різних режимів стерилізації, їх розподіляють на кілька композицій:

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт, бетаїн (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: тирозин (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція В:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Композиція Г:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

До термолабільних речовин застосовують м'які умови стерилізації, солі піддаються стандартним для них умовам автоклавування. Видокремлення фосфатної солі від інших необхідне для унеможливлення виникнення нерозчинних сполук в результаті взаємодії з солями кальцію та магнію при стерилізації.

Точні кількості компонентів для приготування поживного середовища для культивування кишкової палички в шейкері вказані в табл. 5.9.

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 900 мл поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
глюкоза	20	18	А	50
дріжджовий екстракт	4	3,6		
бетаїн	3	2,7		
Вода		50 мл		
Тирозин	0,00025	0,225	Б	500
Вода		500 мл		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	9	В	300
MgSO <sub>4</sub>	5	4,5		
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,015	0.0135		
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,015	0.0135		
Вода		350 мл		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	4,5	Г	50
Вода		50 мл		
Усього				900

**5.4.6. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л**

Інокулятор заповнюють поживним середовищем об'ємом 8 л, тому стерилізація виконуватиметься безпосередньо в інокуляторі, що потребує зміни складу компонентів середовища.

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт, бетаїн (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: тирозин (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція В: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0–4,5).

Для приготування та автоклавування композиції А використають колбу об'ємом 750 мл.

Підготовку та стерилізацію композиції Б здійснюють в реакторі на 7 л.

Безпосереднє приготування композиції В здійснюють в реакторі об'ємом 5 л, а потім за допомогою насоса перекачують в інокулятор на 15 л.

В результаті об'єднання солей задля запобігання випаданню осаду солей у композиції В, рН середовища необхідно підтримувати на рівні 4.0 - 4.5 та відкоригувати до 7.0 після стерилізації.

Необхідно враховувати, що під час стерилізації апарату утворюється конденсат, що займає близько 10% об'єму інокуляту.

У *табл. 5.10* викладено детальний розрахунок кількості кожного компонента, необхідного для приготування поживного середовища в інокуляторі об'ємом 15 л для вирощування інокулянта.

*Таблиця 5.10.*

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища в інокуляторі 15 л**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 8 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
глюкоза	20	160	А	0,4
дріжджовий екстракт	4	32		
бетаїн	3	24		
Вода		0,4 л		
тирозин	0,25	2	Б	4,4
Вода		4 л		
Конденсат		0,4 л		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	80	В	3,2
MgSO <sub>4</sub>	5	40		
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,015	0,12		
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,015	0,12		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	40		
Вода		2,9 л		
Конденсат		0,29 (0,3) л		
Усього				8

#### **5.4.7. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 130 л**

На етапі вирощування інокуляту в 130-літровому посівному апараті об'єм поживного середовища в інокуляторі складає 69 л, і піддається стерилізації в цьому ж апараті, склад композицій не змінюється.

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт, бетаїн (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: тирозин (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція В:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0–4,5).

Компоненти композиції А змішують та стерилізують в реакторі на 5 л.

У 63-літровому реакторі відбувається змішування компонентів для отримання композиції Б та її стерилізація

Для приготування композиції В використовують реактор-змішувач на 40 л, але стерилізацію здійснюють в інокуляторі об'ємом 130 л.

Для попередження утворення осаду в композиції В під час стерилізації необхідно створити кислотність розчину на рівні рН 4.0-4.5, а після стерилізації нейтралізувати до рН 7.0.

Для забезпечення точності приготування композицій, у розрахунок кількості води включають поправку на випаровування (10%), що виникає в процесі стерилізації обладнання.

Розрахунок кількості речовин, необхідних для приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 130 л представлено в *табл. 5.11*.

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища в інокуляторі  
об'ємом 130 л**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 69 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
глюкоза	20	1380	А	3,52 (3,5)
бетаїн	3	207		
Дріжджовий екстаркт	4	276		
Вода		3,2 (л)		
Конденсат		0,32 (л)		
тирозин	0,25	17,25	Б	38,5 (38)
Вода		35 (л)		
Конденсат		3,5 (л)		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	690	В	27,5
MgSO <sub>4</sub>	5	345		
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,015	1,035		
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,015	1,035		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	345		
Вода		25 (л)		
Конденсат		2,5 (л)		
Усього				69,52 (69)

**5.4.8. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>**

Об'єм поживного середовища, необхідний для отримання посівного матеріалу на цьому етапі виробництва, становить 521 л, компоненти об'єднані в ті самі композиції.

Композиція А: глюкоза, дріжджовий екстракт, бетаїн (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: тирозин (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція В: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0–4,5).

Процеси змішування, розчинення компонентів та стерилізації композиції А відбуваються в реакторі-змішувачі об'ємом 50 л.

Процеси змішування, розчинення компонентів та стерилізації композиції Б відбуваються в реакторі-змішувачі об'ємом 500 л.

В реакторі-змішувачі на 300 л здійснюється приготування композиції В, а в ферментері - стерилізація.

Перед стерилізацією важливо знизити рН композиції Б до 4.0 - 4.5, щоб запобігти утворенню осаду солей магнію, кальцію та фосфору, а після стерилізації обов'язково необхідно довести рН середовища до 7.0.

Для раціонального розрахунку об'єму води задля композицій враховують конденсат (10%), що залишається після стерилізації апарату.

Кількісний склад поживного середовища для виробничого біосинтезу ферментері на 1 м<sup>3</sup> представлено у вигляді табл. 5.12.

Таблиця 5.12.

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища в ферментері  
об'ємом 1 м<sup>3</sup>**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 621 л поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
глюкоза	20	12,4	А	31,1
дріжджовий екстракт	4	2,5		
бетаїн	3	1,7		
Вода		28,3 (л)		
Конденсат		2,83 (2,83) (л)		
бетаїн	0,25	155,25	Б	346,5 (347)
Вода		315 (л)		
Конденсат		31,5 (л)		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	6,2	В	143
MgSO <sub>4</sub>	5	3,1		
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,015	9,315 (г)		
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,015	9,315 (г)		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	3,1		
Вода		130 (л)		
Конденсат		13 (л)		
Усього				

#### 5.4.9. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Для оптимізації процесу отримання посівного матеріалу, основні та фосфорні солі для одержання посівного матеріалу в апаратах об'ємом 15 і 130 л та ферментері на 1 м<sup>3</sup> піддають попередній обробці кислотою для запобігання утворенню осаду.

Потім, перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище підлужнюють стерильним 6%-вим розчином їдкого натру, який стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

На кожен літр поживного середовища розраховують 2 мл 6 %-ого розчину НСІ (табл. 5.13).

Таблиця 5.13.

#### Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних розчинів НСІ та NaOH

Об'єм середовища, л	НСІ (6%)		NaOH	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,9	-	-	-	-
8	16	у колбі на 2 л	16	у колбі на 50 мл
69	138		138	у колбі на 250 мл
521	1042		1042	у реакторі на 2 л

Враховуючи, що титрувальний розчин кислоти не потребує стерилізації, доцільно приготувати його в одній колбі.

Транспорт амонійних сполук всередину бактеріальної клітини відбувається за механізмом антипорту з іоном водню [87]. Цей процес супроводжується збільшенням концентрації протонів у зовнішньому середовищі, що призводить до зниження рН культурального середовища. Одним з джерел Нітрогену в нашому випадку є  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , тому для забезпечення сталого нейтрального значення рН в процесі біосинтезу необхідне застосування 25%-ого розчину  $\text{NH}_4\text{OH}$  [17].

При розрахунку потреби азоту для синтезу фенілаланіну та біомаси визначили, що на 1 л поживного середовища необхідно вносити 60,9 мл розчину аміачної вади, тому для 590 л необхідно:

1 л – 60,9 мл

521 л – x мл

$$x = \frac{521 \times 60,9}{1} = 31\,729 \text{ мл} \sim 32 \text{ л розчину}$$

Розчин зберігають у збірнику об'ємом 40 л.

Присутність в складі поживного середовища речовин з високим вмістом білків, таких як дріжджовий екстракт, бетаїн та тирозин, в поєднанні з необхідністю інтенсивної аерації призводить до утворення піни. Це негативно впливає на процес ферментації, оскільки збільшує ризик контамінації та зменшує робочий об'єм ферментера [82].

На сьогоднішній час існує безліч методів піногасіння. При механічному піногасінні бульбашки піни руйнуються під дією обертових елементів (роторів, турбін тощо), які можуть бути встановлені безпосередньо в ферментері. Однак, ефективна робота механічних піногасних пристроїв пов'язана з необхідністю витратити додаткову енергію на привід обертових елементів, забезпечення надійної герметизації стиків і, у деяких випадках, використання мастильно-охолоджувальної рідини для зменшення тертя та зносу [82].

Для боротьби з піною часто використовують природні жири та олії. Завдяки більшій поверхневій активності вони витісняють молекули піноутворювачів з поверхні бульбашок, що призводить до зменшення їхньої стійкості та руйнування. Однак слід зазначити, що ці речовини можуть також впливати на інші процеси, наприклад, на аерацію середовища. Синтетичні піногасники демонструють значно вищу ефективність порівняно з природними речовинами, оскільки для досягнення того ж результату їх потрібно використовувати у значно менших кількостях [82].

Обраний нами ферментер [102] оснащений протипінним пристроєм у вигляді крильчатки, розміщеної у верхній частині апарата, тому здійснюватимемо механічний метод піногасіння.

У висновку, крім підготовки поживного середовища, технологічний процес включає в себе низку додаткових операцій:

- Підготовка стерильного повітря для подачі в апарати та очищення відпрацьованого повітря після завершення процесів в них.
- Приготування 6%-ого розчину HCl для підкислення середовищ перед стерилізацією в апаратах об'ємом 15, 130 л і 1 м<sup>3</sup>
- Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 15, 130 л і ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>
- Приготування і стерилізація запасного розчину біотину для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках, інокуляторах та ферментері об'ємом 15 л, 130 л та 1 м<sup>3</sup>
- Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози для виробничого біосинтезу

Для забезпечення повного циклу виробництва, крім реакторів для приготування композицій, необхідно передбачити додаткове обладнання:

- реактор-змішувач для приготування та стерилізації 6% титрувального розчину гідроксиду натрію (2 л) для підлужнення поживного середовища у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>;
- реактор-змішувач для приготування та стерилізації підживлюваного розчину глюкози (300 л) для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>;
- збірник для аміачної води, що використовується для регуляції рН культуральної рідини (40 л) для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>;

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

В табл. 6.1 описано головні технічні характеристики обладнання, що зображене на апаратурній схемі (див. графічна частина).

Таблиця 6.1

### Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу фенілаланіну

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Вентилятор KSFV09ML3S («Soler & Palau», США), обладнаний захисною сіткою. Матеріал: оцинкована сталь, швидкість вентилятора: 775 об/хв; габаритні розміри, мм: 914×838×1321 [103]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр панельного типу EN 779: G4/F5 («Технофільтр», Україна). Фільтрувальний матеріал: поліестр, скловолокно; продуктивність: 1100 м3/год; ; E = 90%; габаритні розмір: 592x287x48 [104]
К-3	Компресор	1	Компресор ALMiG F-Drive 30 («Almig», Німеччина). Продуктивність: 0,62 - 6,15 м3 /хв; робочий тиск: 5-13 бар; потужність двигуна: 30 кВт. Габарити, мм: 850x940x1805 [105]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач рефрижераторного типу ATS DSI 60 («ATS», Італія). Продуктивність: 1000 л/хв; споживана потужність: 0,22 кВт; максимальна температура стиснутого повітря на вході: +50 °С; номінальна точка роси - +5 °С; габарити, мм: 305x373x440 [106]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер КР-3000-11 («AIRPOL», Польща). Об'єм: 4000 л; макс. роб. тиск: 11 бар; габаритні розміри, мм: 1210x1210x3240 [107]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач НКВ 100-4 («Vents», Україна). Максимальний робочий тиск: 16 бар; максимальна робоча температури води – 100 °С; Продуктивність: 0,5 м3 /хв. Габарити, мм: 350×300×230 [108]
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Кишеньковий фільтр Filson («Filson Filter», Китай). Фільтроматеріал: скловолокно; E = 98% [109]

<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>				
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата
Розробив		Савчук О.О.		
Консульт.				
Керівник		Пирог Т.П.		
Н. контр.				
Зав. каф.		Стадніков В.П.		
<b>РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>			Літера	Аркцш
				93
			Аркцшів	6
<b>Кафедра БТМ</b>				

ІФ-8 ІФ-9 ІФ-10	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтр Corevital APB Sterilizing-Grade Bricap C («Cobetter», Швеція). Матеріал: полівініліденфторид; розмір пор: 0,2 мкм; максимальна робоча температура – 80 °С [109]
P-11	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації 6% розчину натрію гідроксиду	1	Реактор об'ємом 2 л («VuchiGlas», Швейцарія). Матеріал: боросилікатне скло 3.3; обладнаний мішалкою: до 3000 об/хв; рубашкою; робоча температура – до 200 °С; датчиком температури, манометром; розрахунковий тиск в резервуарі – до 0,6 МПа; габаритні розміри, мм: 810x540x1650 [111-113]
Д-12	Ваговий дозатор для подачі глюкози	1	Ваговий дозатор сипких продуктів ВЛД-1 («PackTech», Україна). Діапазон дозування – 2-300 кг; Електроживлення – 220 В; Споживання електроенергії – 1 кВт/год [114]
Л-13	Лічильник води (181 л води подаватимуться ≈23 хв)	1	Лічильник води МТК-UA 32. («Gross Group», Україна). Номінальна витрата води: 8 л/хв, максимальний тиск: 1 МПа [115]
P-14	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину глюкози	1	Біореактор об'ємом 300 л BLBIO-300SC («BLBIO», США). Матеріал: нержавіюча сталь 316L; обладнаний лопатевою мішалкою: 70-600 об/хв; розрахунковий тиск в резервуарі – 0,3 МПа; з рубашкою; датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , DO, температури; манометром, вимірюванням швидкості обертів мішалки; габаритні розміри, мм: 820x1500x2200 [116]
Н-15	Перистальтичний насос (15,1 л підживлювального розчину глюкози буде перекачуватись ≈15 хв)	1	Перистальтичний насос SEKO PR-1 («SEKO S.P.A.», Італія). Потужність: 5 Вт; максимальна продуктивність: 1 л/хв; максимальний тиск: 0,3 МПа [117]
P-16	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	1	Реактор об'ємом 7 л LBR-XGCA («LABOAO», Китай). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L, боросилікатне скло; обладнаний магнітною мішалкою; рубашкою; датчиками вимірювання рН, температури, манометром; габаритні розміри, мм: 800x500 [118]
Н-17	Перистальтичний насос (4,4 л композиції буде перекачуватись ≈15 хв)	1	Перистальтичний насос SEKO PR-18 («SEKO S.P.A.», Італія). Потужність: 6 Вт; максимальна продуктивність: 18 л/год (0,3 л/хв); максимальний тиск: 0,01 МПа [119]

P-18	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Реактор об'ємом 5 л РП-5 («Промвіт», Україна). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; обладнаний якірною мішалкою; до 60 об/хв; робоча температура – 20-95 °С; з рубашкою; датчиками вимірювання температури, манометром; габаритні розміри, мм: 620x410x840 [120]
H-19	Перистальтичний насос (3,2 л композиції буде перекачуватись ≈11 хв)	1	Перистальтичний насос SEKO PR-18 («SEKO S.P.A.», Італія). Потужність: 6 Вт; максимальна продуктивність: 18 л/год (0,3 л/хв); максимальний тиск: 0,01 МПа [119]
I-20	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 15 л RCP-C15L («Sartorius Stedim Biotech», Франція). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; обладнаний турбінною мішалкою: 200-1000 об/хв; з рубашкою; датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , DO, температури, манометром; габаритні розміри, мм: 1000x750x1900 [121]
P-21	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор об'ємом 5 л RCP-C05L («Sartorius Stedim Biotech», Франція). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; обладнаний турбінною мішалкою: 20-1500 об/хв; з рубашкою; датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , DO, температури, манометром; габаритні розміри, мм: 900x700x1300 [121]
L-22	Лічильник води (при мінімальних об'ємних витратах (1,7 л/хв) 35 л подаватимуться ≈21 хв)	1	Лічильник води BAYLAN KK-17 («BAYLAN», Туречина). Об'ємні витрати води: 0,1-16 м <sup>3</sup> /год (1,7 – 266,7 л/хв) [122]
P-23	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	1	Реактор об'ємом 60 л ФР-60 («Промвіт», Україна). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; обладнаний мішалкою: до 300 об/хв; робочий тиск – до 0,3 МПа; робоча температура – 0 - 40 °С (122 °С при стерилізації); з рубашкою; датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , температури, манометром; габаритні розміри, мм: 1437x856x1580 [123]
H-24	Насос перистальтичний (38 л композиції Б буде перекачуватись ≈26 хв)	1	Перистальтичний насос SEKO NPG 1.5 («SEKO S.P.A.», Італія). Потужність: 8 Вт; максимальна продуктивність: 1,5 л/хв; максимальний робочий тиск: 0,01 МПа [124]

Л-25	Лічильник води (при мінімальних об'ємних витратах (1,05 л/хв) 25 л води подаватимуться $\approx 24$ хв)	1	Лічильник води промисловий ЛВКч-25і («Склоприлад», Україна). Об'ємні витрати води: 0,063-7,875 м <sup>3</sup> /год (1,05-131,25 л/хв) [125]
Р-26	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Апарат СЕон 0,040 об'ємом 40 л («Єврохіммаш», Україна). Оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 100 об/хв; робоча температура – до 250 °С; габаритні розміри, мм: 600x500x750 [126]
Н-27	Насос мембранний (27,5 л композиції В буде перекачуватись $\approx 18$ хв)	1	Мембранний насос для рідин («Агротех», Україна). Максимальна потужність: 15 Вт; продуктивність: 1,5 л/хв; максимальний робочий тиск: 0,35 МПа [127]
І-28	Інокулятор	1	Інокулятор F3-100 об'ємом 130 л («Bionet», Іспанія). Матеріал: нержавіюча сталь А316L; оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 25-200 об/хв; датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , DO, температури; манометром; робоча температура – до 130 °С; габаритні розміри, мм: 1500x830x2273 [128]
Д-29	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ФС-75 («ТехноМашСтрой»). Межі зважування - 0.15-40 кг; Електроживлення – 220 В; Споживання електроенергії – 0,5-1 кВт/год [129]
Л-30	Лічильник води (при мінімальних об'ємних витратах (1,05 л/хв) 28,2 л води подаватимуться $\approx 27$ хв)	1	Лічильник води промисловий ЛВКч-25і («Склоприлад», Україна). Об'ємні витрати води: 0,063-7,875 м <sup>3</sup> /год (1,05-131,25 л/хв) [125]
Р-31	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор F3-50 об'ємом 50 л («Bionet», Іспанія). Матеріал: нержавіюча сталь А316L; оснащений сорочкою, лопатевою мішалкою: 25-200 об/хв; датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , DO, температури; манометром; робоча температура – до 130 °С; габаритні розміри, мм: 1500x810x2197 [128]

Л-32	Лічильник води (при об'ємних витратах (15 л/хв) 315 л води подаватимуться 21 хв)	1	Електронний лічильник K24 («PIUSI», Італія). Діапазон витрат: 10-120 л/хв; тиск: до 2 МПа [130]
Р-33	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	1	Біореактор об'ємом 500 л BLBIO-500SC («BLBIO», США). Матеріал: нержавіюча сталь 316L; обладнаний лопатевою мішалкою: 70-600 об/хв; розрахунковий тиск в резервуарі – 0,3 МПа; з рубашкою; датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , DO, температури; манометром, вимірюванням швидкості обертів мішалки; габаритні розміри, мм: 1500x2000x2800 [116]
Н-34	Насос перистальтичний (347 л композиції Б буде перекачуватись ≈26 хв)	1	Перистальтичний насос РТ 05 («Тарфо», Швеція). Продуктивність: 13,6 л/хв, частота обертання: 40 об/хв; максимальний тиск нагнітання: 1,5 МПа [131]
Д-35	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ФС-75 («ТехноМашСтрой», Україна). Межі зважування - 0.15-40 кг; Електроживлення – 220 В; Споживання електроенергії – 0,5-1 кВт/год [129]
Л-36	Лічильник води (130 л води подаватимуться ≈16 хв)	1	Лічильник води МТК-UA 32. («Gross Group», Україна). Номінальна витрата води: 8 л/хв, максимальний тиск: 1 МПа [115]
Р-37	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Біореактор об'ємом 300 л BLBIO-300SC («BLBIO», США). Матеріал: нержавіюча сталь 316L; обладнаний лопатевою мішалкою: 70-600 об/хв; розрахунковий тиск в резервуарі – 0,3 МПа; з рубашкою; датчиками вимірювання рН, рО <sub>2</sub> , DO, температури; манометром, вимірюванням швидкості обертів мішалки; габаритні розміри, мм: 1500x2000x2800 [116]
Н-38	Насос мембранний (143 л композиції В буде перекачуватись ≈18 хв)	1	Пневматичний мембранний насос SEKO DUOTEK AF000007PNTTPT1 («SEKO S.P.A.», Італія). Максимальна продуктивність: 8 л/хв.; максимальний тиск: 0,6 МПа. [132]

Ф-39	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 1 м3 («Ruian Global Machinery», Китай). Матеріал: нержавіюча сталь 316L. Обладнаний барботером, подвійною сорочкою, датчиком рО <sub>2</sub> , рН, температури; пробовідбірником, манометром, турбінною мішалкою: 220 об/хв. Потужність приводу: 2,2 кВт. Внутрішній тиск: 0,2 МПа. Габаритні розміри, мм: 900х3000 [102]
З-40	Збірник для аміачної води	1	Збірник з емальованої сталі об'ємом 40 л («Єврохіммаш», Україна). Габаритні розміри, мм: 600х500х530 [133]

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ФЕНІЛАЛАНІНУ.

Технологічна схема біосинтезу фенілаланіну *E. coli* Xllp21 включає два різновиди стадій: допоміжні роботи (ДР) та основний технологічний процес (ТП). Допоміжні роботи передбачають виконання таких етапів: підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl і NaOH; підготовка і стерилізація запасного розчину біотину, підживлювального розчину глюкози; приготування і стерилізація поживних середовищ. Основний технологічний процес охоплює наступні етапи: підготовка інокуляту та виробничий біосинтез.

У графічній частині курсової роботи містяться технологічна та апаратурна схеми.

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

#### ***ДР 1.1. Забір атмосферного повітря***

Повітрозабірний пристрій (ПЗ-1) забезпечує забір повітря з верхніх шарів атмосфери.

#### ***ДР 1.2. Очистка повітря від грубих часток***

Фільтр грубої очистки (Ф-2) ефективно затримує великі частинки пилу та інших забруднень, забезпечуючи початковий ступінь очищення повітря на рівні 90%.

#### ***ДР 1.3. Стиснення повітря***

Для забезпечення ефективної аерації культурального середовища та подолання опору фільтрів у ферментері, повітря (від ДР 1.2.) стискається в компресорі (К-3) до 0,35-0,5 МПа, що супроводжується його нагріванням до 120-250 °С.

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

Стиснене повітря (від ДР 1.3.) направляється до теплообмінника-охолоджувача (Т-4) для зниження температури до 25-30 °С, після чого - до ресивера (Р-5), де відбувається відділення конденсату та згладжування пульсацій потоку. Таким чином забезпечується зниження вологості повітря до 60-70%.

<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>				
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата
Розробив	Савчук О.О.			
Консульт.				
Керівник	Пирог Т.П.			
Н. контр.				
Зав. каф.	Стадніков В.П.			
<b>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ФЕНІЛАЛАНІНУ</b>				
Літера		Аркцш	Аркцшів	
		99	10	
<b>Кафедра БТМ</b>				

### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

В результаті проходження охолодженого повітря (від ДР 1.4.) крізь теплообмінник-нагрівач (Т-6) його температура підвищилась до 45-50 °С, а вологовміст знизився до 50%.

### *ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі*

Нагріте повітря з попередньої стадії (від ДР 1.5.) направляється до головного фільтра (Ф-7), встановленого біля ферментаційних відділень, і забезпечує високий ступінь очищення повітря, затримуючи до 98% мікроорганізмів.

### *ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Перед тим, як потрапити в ферментер (ТП 7.1), повітря (від ДР 1.6.) проходить через індивідуальний фільтр (ІФ-8), який затримує до 99,98% всіх забруднень, включаючи найдрібніші частинки та мікроорганізми.

## ***ДР 2. Приготування титрувальних розчинів***

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

*ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторах об'ємом 15 і 130 л та ферментері на 1 м<sup>3</sup>*

Для отримання 1196 мл 6%-го розчину HCl в колбу об'ємом 2 л наливають 1002 мл дистильованої води. Мірним стаканом на 200 мл вимірюють та подають 194 мл 37 %-го розчину соляної кислоти, перемішують. Важливо дотримуватись саме такого порядку змішування, аби запобігти утворенню сильної екзотермічної реакції.

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

*ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 15 л*

Щоб приготувати 16 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 0,96 г кристалічного їдкового натру. Наважку переносять у колбу на 50 мл, мірним циліндром на 25 мл відміряють 16 мл дистильованої води та додають до колби з наважкою. Суміш ретельно перемішують до повного розчинення речовини, колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С та тиску 0,15 МПа протягом 40 хв.

*ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 130 л*

Процес приготування 138 мл титрувального розчину лугу починається зі зважування 8,28 г кристалічного гідроксиду натрію на технічних вагах. Отримана наважка переноситься в мірну колбу об'ємом 250 мл. Далі, використовуючи мірний циліндр на 200 мл, додають 130 мл дистильованої води і ретельно перемішують до досягнення повного розчинення. Отриманий розчин закривають ватно-марлевою пробкою і автоклавують ( $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $p = 0,15\text{ МПа}$ ,  $\tau = 40\text{ хв}$ ).

*ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>*

1042 мл 6%-го розчину NaOH готують в реакторі (Р-9), оснащеному мішалкою. На технічних вагах зважують 62 г кристалічного їдкого натру і переносять в реактор на 2 л, у нього ж вносять 980 мл питної води, відміряної за допомогою мірного циліндра на 1 л. Для кращого розчинення компонентів суміш нагрівають до  $40^{\circ}\text{C}$  і вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізують розчин лугу при температурі  $131\text{ }^{\circ}\text{C}$  та тиску  $0,15\text{ МПа}$  упродовж 40 хв.

### ***ДР 3. Приготування і стерилізація запасного розчину біотину***

*ДР 3.1. Приготування і стерилізація запасного розчину біотину для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках та інокуляторі на 15 л*

На торсійних терезах зважують 2 мг біотину і поміщають у колбу об'ємом 200 мл, відміряють мірним циліндром 100 мл дистильованої води. Після перемішування колбу закривають ватно-марлевым корком і автоклавують протягом 30 хв при температурі  $112\text{ }^{\circ}\text{C}$  та тиску  $0,05\text{ МПа}$ .

*ДР 3.2. Приготування і стерилізація запасного розчину біотину для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 130 л та для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>*

За допомогою торсійних ваг відважують 7 мг біотину і переносять у колбу об'ємом 500 мл. Туди ж додають 313 мл дистильованої води, виміряної мірним циліндром на 500 мл. Розчин в колбі перемішують до повного розчинення вітаміну,

закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С та 0,05 МПа протягом 30 хв.

#### ***ДР 4. Підготовка та стерилізація підживлювального розчину глюкози***

*ДР 4.1. Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>*

Для приготування 181 л підживлювального розчину у реактор-змішувач (Р-12) через ваговий дозатор (Д-10) подають 126,7 кг глюкози, через лічильник (Л-11) додають 181 л питної води та вмикають мішалку. Аби покращити процес розчинення глюкози у сорочку реактора подають пару для досягнення температури до 40 °С. Стерилізують розчин в реакторі за таких умов: температура - 112 °С, тиск - 0,05 МПа, час стерилізації – 30 хв.

#### ***ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ***

*ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах*

##### *ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних терезах відважують 18 г глюкози, 3,6 г дріжджового екстракту та 2,7 г бетаїну. Потім переміщують їх у колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл дистильованої води, відміряної за допомогою мірного циліндра об'ємом 100 мл, перемішують і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С під тиском 0,05 МПа протягом 30 хв.

##### *ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

За допомогою торсійних терезів зважують 0,225 г тирозину та поміщають в колбу на 2 л. Використовуючи мірний циліндр, в колбу наливають 500 мл дистильованої води. Розчин змішують та автоклавують:  $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$   $p = 0,05\text{ МПа}$ ,  $\tau = 30\text{ хв}$ .

##### *ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції В*

Відважують на технічних вагах 9 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  і 4,5 г  $\text{MgSO}_4$ , на торсійних терезах – 0,0135 г  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  і 0,0135 г  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ . Всі речовини переносять в колбу об'ємом 500 мл. Потім, використовуючи мірний циліндр на 500 мл, наливають в колбу 300 мл дистильованої води. Суміш ретельно перемішують до повного

розчинення солей. Процес стерилізації відбувається за температури 131 °С та тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

*ДР 5.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г*

До колби місткістю 100 мл вносять 4,5 г дигідрофосфату калію, зваженого за допомогою технічних терезів, після чого вливають 50 мл дистильованої води, виміряної мірним циліндром такого ж об'єму. Суміш ретельно перемішують, колбу закривають ватно-марлевым корком і 40 хв автоклавують при температурі 131 °С та тиску 0,15 Мпа.

*ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 15 л*

*ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах відважують 160 г глюкози, 32 г дріжджового екстракту та 24 г бетаїну. Всі речовини поміщають в колбу об'ємом 750 мл, туди ж за допомогою піпетки на 5 мл додають 3,6 мл стерильного розчину біотину (від ДР 3.1.). Потім, використовуючи мірний циліндр на 500 мл, наливають в колбу 400 мл дистильованої води. Суміш ретельно перемішують, колбу з композицією закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві. Процес стерилізації здійснюється при температурі 112 °С та тиску 0,05 МПа протягом 30 хв.

*ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 2 г тирозину і переносять у реактор-змішувач (Р-14) об'ємом 7 л. Далі, за допомогою мірного циліндру на 2 л, в реактор додають 4 л питної води. Для прискорення процесу розчинення компонента у воді в сорочку апарата подають пару і, таким чином, доводять температуру композиції до 40 °С та вмикають мішалку. Процес стерилізації проводиться при  $t = 112$  °С,  $p = 0,05$  МПа,  $\tau = 30$  хв.

*ДР 5.2.3. Приготування і стерилізація композиції В*

В реактор-змішувач (Р-16) об'ємом 5 л завантажують 80 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 40 г  $\text{MgSO}_4$ , 40 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,12 г  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  і 0,12 г  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (відважують на технічних вагах). Туди ж доливають відміряну мірним циліндром об'ємом 2 л питну воду (3,9 л) та перемішують за допомогою перемішувача пристрою. Щоб

прискорити процес розчинення солей у сорочку реактора-змішувача подають пару для досягнення температури 40°C. Отриманий розчин перистальтичним насосом (Н-17) перекачують в попередньо простерилізований інокулятор (І-18) та, при постійному перемішуванні, подають 6 %-й розчин НСІ (від ДР 2.1.1) для досягнення рН 4,0 - 4,5. Після цього розчин солей стерилізують при 131°C (р = 0,15 МПа) протягом 40 хв.

*ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 130 л*

*ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

За допомогою технічних терезів відважують 1380 г глюкози, 276 г дріжджового екстракту та 207 г бетаїну. Всі наважки поміщають в реактор-змішувач (Р-19) об'ємом 5 л. Використовуючи мірний циліндр об'ємом 2 л, в реактор переливають 3,2 л питної води. Суміш піддається перемішуванню. З метою покращення розчинення компонентів розчин підігривають до 40 °С в результаті подачі пари в сорочку апарату. Стерилізація проходить при температурі 112 °С та тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв.

*ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

Після зважування на технічних вагах 17,25 г тирозину, його переносять у реактор-змішувач (Р-21) об'ємом 60 л. Далі, за допомогою лічильника (Л-20) в апарат подають 35 л питної води. В результаті надходження пари в сорочку реактора розчин підігривають до 40 °С. Після повного розчинення композицію стерилізують ( $t = 112$  °С,  $p = 0,05$  МПа,  $\tau = 30$  хв).

*ДР 5.3.3. Приготування і стерилізація композиції В*

В реактор-змішувач (Р-24) об'ємом 40 л поміщають попередньо зважені на технічних вагах 690 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  і 345 г  $\text{MgSO}_4$ , 345 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,035 г  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  і 1,035 г  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , вносять через лічильник (Л-23) 25 л питної води та вмикають перемішувальний пристрій. Щоб прискорити процес розчинення солей, реактор підігривають парою до температури 40 °С. Отриманий розчин насосом (Н-25) надходить в попередньо простерилізований інокулятор (І-28). Під час перемішування в середовище додають 6 %-й розчин НСІ (від ДР 2.1.1) для отримання рН 4,0 - 4,5. Стерилізують в інокуляторі 40 хв під тиском 0,15 МПа та температурі 131°C.

*ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>*

*ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А*

До реактора-змішувача (Р-29) місткістю 50 л вносять 12,42 кг глюкози, 2,5 кг дріжджового екстракту та 1,7 кг бетаїну, відважених за допомогою вагового дозатора (Д-27). Використовуючи лічильник (Л-28), в апарат подають 28,3 л питної води. Для забезпечення повного розчинення всіх компонентів, суміш перемішують та нагрівають до температури 40 °С подачею пари в сорочку. Отриману композицію стерилізують при температурі 112 °С та тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв.

*ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

До реактора-змішувача (Р-31) об'ємом 500 л вносять 155,25 г тирозину, який попередньо зважили на технічних терезах. Туди ж подають за допомогою лічильника (Л-30) 315 л питної води. Щоб прискорити процес розчинення тирозину, суміш підігрівають до 40 °С в результаті надходження пари в сорочку. Після того, як весь тирозин розчинився композиція стерилізується:  $t = 112\text{ °С}$ ,  $p = 0,05\text{ МПа}$ ,  $\tau = 30\text{ хв}$ .

*ДР 5.4.3. Приготування і стерилізація композиції В*

Через ваговий дозатор (Д-33) у реактор-змішувач (Р-35) об'ємом 300 л подають 6,2 кг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3,1 кг  $\text{MgSO}_4$  та 3,1 кг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , на технічних вагах зважують 9,315 г  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  і 9,315 г  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  і вносять в апарат. За допомогою лічильника (Л-34) в реактор подають 130 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Кращого розчинення досягають поданням пари в сорочку збірника, щоб температура в реакторі досягла 40°С. Насосом (Н-36) композицію перекачують в попередньо простерилізований ферментер (Ф-37) об'ємом 1 м<sup>3</sup> і подають 6 %-й розчин хлоридної кислоти (від ДР 2.1.1) щоб кінцеве значення рН становило 4,0 - 4,5. Стерилізують при 131°С під тиском 0,15 МПа 40 хв.

## ***ТП 6. Підготовка посівного матеріалу***

### ***ТП 6.1. Підтримання колекційної культури***

Штам *E. coli* X11p21 зберігають у пробірках зі скошеним агаром Лурія та ампіциліном при температурі  $4 \pm 1\text{ °С}$  і пересівають на свіже поживне середовище кожні 2-3 місяці.

### *ТП 6.2. Одержання робочої культури*

Для одержання ізольованих колоній колекційну культуру *E. coli* ХІІр21 розсівають методом виснажувального штриха на чашки Петрі з агаром Лурія та ампіциліном з подальшою інкубацією при  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  протягом 48-72 год.

### *ТП 6.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах*

За допомогою стерильної бактеріологічної петлі ізольовані колонії *E. Coli* ХІІр21 (від ТП 6.2.) пересівають у пробірки зі скошеним поживним середовищем (агар Лурія з ампіциліном). При цьому дотримуються певних особливостей роботи: з чашок Петрі відбирають колонії, що розташовуються на достатній відстані одна від одної (не менше 1 см); одна колонія розрахована на одну пробірку.

### *ТП 6.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках*

До колби з композицією Б (від ДР 5.1.2.) в стерильних умовах переливають стерильні композиції А (від ДР 5.1.1), В (від ДР 5.1.3.), Г (від ДР 5.1.4), додають запасний розчин біотину (0,4 мл) (від ДР 3.1.) і перемішують. Отримане поживне середовище розливають по 150 мл за допомогою стерильного мірного циліндра на 200 мл у 6 качалочних колб об'ємом 750 мл.

Кожна колба засівається суспензією клітин з окремої пробірки з робочою культурою *E. coli* ХІІр21 (від ТП 6.3.). Щоб суспендувати бактеріальні клітини необхідно до пробірки з посівом внести 5 мл фізіологічного розчину. Отриману суспензію обережно відбирають стерильною піпеткою та переносять у стерильні колби для культивування, які вже містять поживне середовище.

Культивування проводять на лабораторному шейкері при  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  упродовж 24 год. Після інкубації здійснюють мікробіологічний контроль та визначають біомасу, яка має становити 12-13 г/л. Завершивши контроль, вміст колб з інокулятором зливають у засівну колбу на 2 л.

### *ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л*

В інокулятор об'ємом (І-18) 15 л зі стерильною композицією В (від ДР 5.2.3.) через засівну колбу вносять композицію А (від ДР 5.2.1.), перистальтичним насосом (Н-15) перекачують композицію Б (від ДР 5.2.2). Вмикають механізм перемішування

і за допомогою 6% розчину NaOH (від ДР 2.2.1.) регулюють кислотність середовища до оптимального рівня (рН 6,8-7),

Далі в апарат через засівну колбу вносять інокулят (від ТП 6.4.). Культивують при  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 24 год, підтримуючи  $p\text{O}_2$  на рівні 40-50%. Регулювання  $p\text{O}_2$  здійснюють шляхом зміни швидкості перемішування та рівня аерації.

Для моніторингу процесу культивування кожні 4 год проводять відбір проб для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка має становити 12-13 г/л.

#### *ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 130 л*

До інокулятора (І-24) з стерильною композицією В (від ДР 5.3.3.), самопливом додається композиція А (від ДР 5.3.1), через засівну колбу вноситься 31 мл стерильного запасного розчину біотину (від ДР 3.2.). За допомогою насоса (Н-22) в інокулятор перекачується стерильна композиція Б (від ДР 5.3.2.). Після цього вмикається механізм перемішування і за допомогою 6% розчину гідроксиду натрію (від ДР 2.2.2.) регулюється кислотність середовища до оптимального рівня (рН 6,8-7,0). На заключному етапі самопливом вноситься посівний матеріал (від ТП 6.5).

Культивування здійснюється протягом 24 год при температурі  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . Для забезпечення оптимальних умов росту культури, концентрація розчиненого кисню ( $p\text{O}_2$ ) підтримується на рівні 40-50% від насичення повітря. Цей показник регулюється шляхом зміни швидкості обертання мішалки та інтенсивності подачі повітря в інокулятор.

У процесі вирощування посівного матеріалу з інокулятора кожні 4 год відбираються проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 12 – 13 г/л.

### **ТП 7. Виробничий біосинтез**

#### *ТП 7.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>*

До ферментера (Ф-37) з стерильною композицією В (від ДР 5.4.3.), за допомогою перистальтичного насоса (Н-32) додають стерильну композицію Б (від ДР 5.4.2.), самопливом – стерильну композицію А (від ДР 5.4.1.), через засівну колбу – 282 мл стерильного запасного розчину біотину (від ДР 3.2.), вмикають

перемішувальний пристрій. Для доведення кислотності середовища до оптимального рівня (рН 6,8-7,0) самоплином подають 6% розчин лугу (від ДР 2.2.3.). Інокулят (від ТП 6.6) з посівного апарату (І-26) подається у ферментер за допомогою труби перетискування.

Біосинтез здійснюють протягом 52 год при температурі  $37 \pm 2$  °С. Концентрація розчиненого кисню в культуральному середовищі підтримується на рівні 40-50% від максимального і регулюється цей показник шляхом зміни швидкості обертання мішалки та інтенсивності подачі повітря в ферментер.

Протягом усього процесу культивування підтримується стабільний рівень кислотності (рН) на позначці  $7,0 \pm 0,1$  шляхом періодичної подачі самоплином 25% розчину аміачної води зі збірника (З-38). Кожні 4 год за допомогою перистальтичного насоса (Н-13) в культуральне середовище вносять 15,1 л підживлювального розчину (від ДР 4.1.).

Кожні 4 год з культуральної рідини відбирають проби та здійснюють мікробіологічний контроль. Також визначають концентрацію біомаси (24 г/л) та фенілаланіну (73 г/л).

## РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ФЕНІЛАЛАНІНУ

З огляду на те, що фенілаланін є компонентом різноманітних фармацевтичних препаратів і дієтичних добавок, цільовий продукт виробничого процесу випускатиметься у формі порошку з високим ступенем чистоти.

Амінокислоти належить до екзометаболітів, оскільки виділяються клітинами продуцента в поживне середовище [20]. У зв'язку з цим, після відділення біомаси, подальше виділення фенілаланіну здійснюють з отриманого фільтрату.

### 8.1. Обґрунтування вибору методу відділення біомаси *Escherichia coli* xllp21 з культуральної рідини

У виробничих умовах для розділення компонентів культуральної рідини застосовують переважно методи центрифугування, фільтрації, сепарації, в окремих випадках — флотації [82].

Фундаментальним аспектом флотації є утворення стійких асоціатів "мікроорганізм - газова бульбашка", шляхом адсорбційних взаємодій. Градієнт густини між сформованими комплексами та супутнім рідким середовищем ініціює їхню міграцію у напрямку поверхні рідини, що призводить до формування пінної фази [134]. Зважаючи на те, що ефективність цього методу переважно визначається гідрофобною природою мікроорганізмів, що є критично важливим для адсорбції на газових бульбашках, застосування флотації для відділення бактеріальних клітин, які характеризуються переважно гідрофільною клітинною стінкою, є недоцільним [135].

Найпоширенішим різновидом відділення біомаси є фільтрування, що являє собою розділення твердої та рідкої фаз шляхом пропускання суспензії крізь пористу перегородку. До основних його переваг належать висока ефективність розділення фаз і здатність обробляти значні об'єми культуральної рідини. Водночас, цей метод має і певні недоліки: висока вартість обладнання, поступове зниження швидкості фільтрування внаслідок накопичення осаду на фільтрувальній перегородці, а також

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>					
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ФЕНІЛАЛАНІНУ</b>					
Розробив	Савчук О.О.							Літера	Аркцш	Аркцшів
Консульт.									109	16
Керівник	Пирог Т.П.							<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. контр.										
Зав. каф.	Стабніков В.П.									

можливість необхідності попередньої обробки культуральної рідини (регулювання рН, додавання коагулянтів чи фільтрувальних допоміжних речовин) [136,137].

Центрифугування є широко використовуваною технікою для відділення біомаси від ферментаційних бульйонів у біотехнологічних процесах [138-140]. Цей метод використовує відцентрову силу для осідання клітин і більших частинок, ефективно відокремлюючи їх від рідкої фази. Однією з головних переваг центрифугування є його висока ефективність у розділенні біомаси, що робить придатним для обробки великих об'ємів культуральної рідини. Крім того, центрифуги компактні, що полегшує інтеграцію в промислові робочі процеси. Проточні центрифуги, зокрема, користуються перевагою через їхню надійність і здатність обробляти середовища з високим вмістом твердих речовин. Однак центрифугування має певні недоліки: високовартісне обладнання та вплив на цілісність і життєздатність клітин при високих швидкостях центрифугування, що є критично важливим моментом, коли для подальших застосувань потрібна непошкоджена або життєздатна біомаса [138].

На відміну від звичайних центрифуг, сепаратори оснащені пакетом конічних тарілок на роторі. Суспензія подається в міжтарілковий простір, де під дією відцентрової сили важчі частинки осідають на нижніх поверхнях тарілок і накопичуються на стінці барабана, а освітлена рідина відводиться згори. Ця конструкція забезпечує ефективне розділення твердої та рідкої фаз. Їхньою головною перевагою є здатність ефективно обробляти великі об'єми рідини з високим вмістом твердих частинок, забезпечуючи безперервний процес розділення. Однак, до недоліків використання сепараторів слід віднести зниження ефективності сепарації при роботі з рідинами низької в'язкості або з дрібними, погано осаджуваними частинками [141].

На основі порівняльного аналізу методів відділення біомаси, центрифугування було визначено як оптимальний вибір. Флотація неефективна через гідрофільність бактерій. Фільтрування, хоч і ефективне, є дорогим та схильним до зниження швидкості через осад, часто потребуючи попередньої обробки. Сепаратори ж мають обмеження для рідин низької в'язкості та дрібних частинок.

Як приклад обладнання, можна навести центрифугу Sedicanter S3E-3 (рис. 8.1), виробництва німецької компанії Flottweg, що характеризується наступними технічними параметрами: діаметр барабану - 304.8 мм; максимальна швидкість обертання ротора - 7750 об/хв, максимальна гідравлічна продуктивність - 1 м<sup>3</sup>/год, встановлена потужність приводного двигуна - 7,5 кВт, а габаритні розміри становлять 2286 × 711.2 × 762 мм [142].



Рис. 8.1. Центрифуга Sedicanter S3E-3

Центрифугували продуцент *Escherichia coli* xllp21 протягом 20 хв при швидкості 3500 хв<sup>-1</sup> [143].

Беручи до уваги концентрацію амінокислоти в культуральній рідині, що становить 72,9 г/л [143], подальше концентрування не є доцільним з огляду на вже високий вміст цільового продукту.

## 8.2. Обґрунтування вибору методу виділення фенілаланіну

Серед спектру методів виділення L-фенілаланіну з культуральної рідини найбільш поширеними є іонообмінна хроматографія [144], електродіаліз [145], субляція [146] та екстракція розчинником [147].

Принцип електродіалізу для виділення речовини із рідини полягає у використанні іонообмінних мембран та електричного потенціалу, під дією якого іонізовані форми амінокислоти мігрують крізь відповідні мембрани, що забезпечує їх ефективне розділення та концентрування. До переваг цього методу належать екологічна безпечність, зручність експлуатації та відносно низьке енергоспоживання. Однак, слід зазначити і певні обмеження, зокрема лімітування граничного струму під

час електродіалізу для запобігання явищу поляризації мембран, залежність ефективності вилучення цільової амінокислоти від рН оброблюваного розчину та концентрації глюкози, а також висока вартість обладнання [145].

Екстракційна сублація розчинником, що є різновидом флотаційного процесу, являє собою альтернативний підхід до традиційної рідинно-рідинної екстракції. Метод ґрунтується на барботуванні повітря крізь водний розчин, що містить цільову розчинену речовину. Внаслідок цього утворюються бульбашки, на поверхні яких адсорбується розчинена речовина або її комплекс із поверхнево-активною речовиною. Піднімаючись, ці бульбашки транспортують адсорбований компонент у тонкий шар органічного розчинника, розташований на поверхні водного розчину, де відбувається його концентрування [148].

Зазначена методика демонструє значний потенціал при інтеграції з реакційною екстракцією, характеризуючись низкою переваг, серед яких знижене споживання органічного розчинника та низькі енергетичні витрати. Унікальність адсорбційного механізму екстракційної сублації забезпечує: зменшену потребу в об'ємі органічної фази; підвищення коефіцієнта розподілу та селективності процесу розділення; можливість безперервної обробки значних об'ємів рідини; а також запобігання інгібуванню цільового продукту.

Незважаючи на окреслені переваги, слід констатувати наявність певних обмежень, зокрема відсутність комерційно доступного обладнання, спеціалізованого для промислової реалізації даної методики, та потенційно невисоку ефективність процесу, що потребує подальших досліджень та інженерних розробок для масштабування та оптимізації [148].

Рідинно-рідинна екстракція ґрунтується на принципі диференційного розподілу розчинених речовин між двома незмішувальними рідкими фазами, зазвичай водною та органічною. При контакті цих фаз розчинені речовини мігрують між ними відповідно до своїх коефіцієнтів розподілу, які визначаються їхньою відносною розчинністю в кожному розчиннику. Після досягнення рівноваги фази розділяються, дозволяючи вилучити цільову речовину з фази, в якій вона сконцентрувалася. Ефективність розділення залежить від селективності процесу, яка визначається

різницею в коефіцієнтах розподілу різних компонентів суміші. Застосування реакційної рідинно-рідинної екстракції у процесі виділення фенілаланіну передбачає використання екстрагентів, таких як Aliquat 336 або ди-2-етилгексилфосфатної кислоти (D2EHPA), з метою підвищення селективності процесу розділення, враховуючи гідрофобну природу цільової амінокислоти. До недоліків застосування цього методу можна віднести відносно невисоку ефективність методу, залежність екстракції від рН розчину, що впливає на заряд молекул фенілаланіну та інших присутніх сполук. Крім того, можливість коекстракції значної кількості інших компонентів культуральної рідини, включаючи такі аніони, як фосфат та сульфат, може призводити до зниження чистоти цільового продукту та ускладнювати подальші стадії його виділення та очищення [149].

Іонообмінна хроматографія (ІОХ) є популярним методом у виділенні фенілаланіну з культуральної рідини, демонструючи високу роздільну здатність та значну продуктивність у відокремленні цільової амінокислоти від різноманітних супутніх сполук. Селективність методу, що базується на електростатичних взаємодіях між зарядженими молекулами та іонізованою стаціонарною фазою, забезпечує отримання препарату високої чистоти [150, 151].

Однак застосування хроматографії може обмежуватись високою вартістю обладнання. Крім того, результативність методу суттєво залежить від заряду або полярності цільових сполук, що знижує його універсальність при виділенні нейтральних речовин, бо вимагає додаткових стадій підготовки вихідної культуральної рідини. Важливим аспектом є також екологічна складова процесу, оскільки ІОХ супроводжується утворенням значних об'ємів рідких відходів, що потребують належної утилізації [150, 151].

Незважаючи на негативні сторони методу, ІОХ залишається поширеним варіантом для очищення фенілаланіну, особливо коли пріоритетними є чистота та робота в промислових масштабах, тому оберемо саме цей метод.

Оптимальне значення рН робочого розчину, при якому здійснюється зв'язування L-фенілаланіну, відіграє важливу роль у виділенні та очищенні цільового продукту [144]. У цьому методі розділення заряд цільової амінокислоти, який

безпосередньо залежить від рН середовища відносно його ізоелектричної точки ( $pI \approx 5.49$ ), є визначальним фактором його взаємодії з іонообмінною смолою. Для максимального поглинання L-фенілаланіну на катіоніті необхідно підтримувати рН нижче за  $pI$ , щоб амінокислота мала позитивний заряд і ефективно зв'язувалася з негативно зарядженою смолою.

Собрція L-фенілаланіну здійснюватиметься в системі іонообмінних смол з множини послідовно з'єднаних колонок, заповнених сильнокислотою катіонообмінною смолою, що має стирольну матрицю [152]. Такі смоли відзначаються високою хімічною та механічною стабільністю, що забезпечує їх ефективне функціонування в широкому діапазоні значень рН без зниження обмінної здатності [153].

Як приклад придатного катіонообмінника можна навести іоніт Purolite C100. Його фізико-хімічні властивості наведені нижче [154].

- Хімічна будова - полістирол, зшитий дивінілбензолом;
- Фізична форма - кулясті жовто-коричневі гранули;
- Середній розмір гранул - 0,3 – 1,2 мм;
- Коефіцієнт однорідності - 1.7 max;
- Обмінна ємність – 2,0 екв/л;
- Вміст вологи - 44 - 48%

З метою підвищення ефективності адсорбції, рН розчину L-фенілаланіну слід знизити нижче його ізоелектричної точки (до рН  $2 \pm 1$ ) шляхом додавання концентрованої сульфатної кислоти [152].

Також, перед використанням смоли Purolite C100 необхідно регенерувати [154].

На першому етапі здійснюється зворотна промивка шляхом подачі води знизу колонки для розпушення іонітного шару, що сприяє покращенню контакту з регенераційним розчином та видаленню завислих частинок. Зазвичай достатньо одного об'єму (BV) води; після цього смоли дають осісти протягом 3–8 хв.

Наступним етапом є регенерація за допомогою 10% розчину NaCl, який подається зі швидкістю 2–4 BV/год, у кількості 80–160 г солі на літр смоли. Далі

проводиться повільне промивання (1–3 BV) з тією ж швидкістю, що й під час регенерації, для ефективного видалення залишків розчину.

Завершальний етап – кінцеве промивання зі швидкістю робочого потоку 3–6 BV, яке забезпечує остаточне очищення смоли та перевірку якості підготовки перед введенням у робочий режим [155].

Після закінчення хроматографії, для видалення адсорбованих домішок з іонообмінної колонки, насиченої фенілаланіном, перед елююванням застосовують промивання. Як промивну рідину використовують воду, проте більш ефективним є використання органічного розчинника, наприклад, етилацетату. Застосування органічного розчинника сприяє більш повному витісненню забруднювачів, які можуть затримуватися у порах смоли, на відміну від промивання лише водою. Після обробки органічним розчинником рекомендується проведення додаткового промивання водою [156].

Для ефективного елюювання фенілаланіну з катіонообмінної смоли необхідно застосовувати елюент, здатний руйнувати іонні зв'язки між молекулами аналіту та функціональними групами іоніту. Враховуючи природу катіонообмінного носія, оптимальним підходом для десорбції адсорбованого фенілаланіну є підвищення рН розчину. Таким чином, елюент, що проявляє виражені основні властивості, забезпечить ефективне руйнування утвореного адсорбційного комплексу та сприятиме вивільненню фенілаланіну з іонообмінної колонки.

З огляду на високу леткість, доцільним є застосування водного розчину аміаку. Концентрація аміачного елюенту може варіюватися залежно від умов процесу. Зокрема, використання концентрованого розчину гідроксиду амонію забезпечує ефективне витіснення фенілаланіну з іоніту. Водночас, така стратегія може ускладнити подальше видалення аміаку з одержаного продукту, що створює труднощі під час очистки. У зв'язку з цим, більш прийнятним варіантом є використання 0,5 М розчину аміачної води, яка характеризується легшою десорбцією з цільової речовини. Дослідження показали, що при підвищенні температури елюенту до 30–60 °C ефективність розведеного гідроксиду амонію як елюючого агента порівнюється до дії концентрованого розчину [156].

### 8.3. Обґрунтування стадії концентрування елюенту

Вихідний потік елюенту після іонообмінної хроматографії містить очищений фенілаланін, однак його концентрація зазвичай є невисокою. Подальша кристалізація, як метод очищення, ефективно відбувається за умов перенасичення розчину цільовою амінокислотою. З метою підвищення ефективності кристалізації, етап концентрування елюенту є критично важливим, оскільки він значно збільшує концентрацію цільового продукту. Досягнення концентрації, близької до або вищої за межу його розчинності за заданих умов кристалізації, оптимізує процеси зародження та росту кристалів, що, в свою чергу, сприяє збільшенню виходу та покращенню чистоти фенілаланіну [156].

Також, робота з великими об'ємами розведеного розчину є неефективною та збільшує експлуатаційні витрати, пов'язані з процесом кристалізації (наприклад, більші посудини для кристалізації, збільшене споживання енергії для перемішування та контролю температури). Концентрація елюенту зменшує загальний об'єм, роблячи подальшу стадію кристалізації економічно ефективною та легшою для контролю.

В патенті вказано, що для концентрування елюату використовується вакуум-випарний апарат плівкового типу [152]. Як приклад такого апарату можна навести тонкоплівковий вакуум-випарний апарат моделі RFE-500 (рис. 8.2). Технічна характеристика апарату включає [157]:

Продуктивність - 300 кг/год

Об'єм обладнання – 1000 л

Температура - +55 °С

Робочий тиск у сорочці -  $\leq 0.1$  МПа

Розрахунковий тиск в резервуарі – до - 0.08 МПа



*Рис. 8.2.* Тонкоплівковий вакуум-випарний апарат LNC1000

Концентрування проводять при температурі 60–70 °С та ступені вакууму 0,096–0,098 МПа, до досягнення концентрації розчину 90–100 г/л [152].

#### **8.4. Обґрунтування методу кристалізації фенілаланіну**

L-фенілаланін - поліморфна речовина, яка має дві кристалічні форми –  $\alpha$ - і  $\beta$ -типу. Кристали  $\alpha$ -типу в основному мають форму кубиків або пластівців, їхня кристалічна форма є правильною. Кристал  $\beta$ -типу має переважно голкоподібну форму, форма кристала неправильна, вміст води високий, через що він нестабільний при кімнатній температурі. Тому таких кристалів слід уникати в процесі кристалізації [158].

На даний момент відомі методи кристалізації L-фенілаланіну включають процеси охолодження, додавання органічних розчинників, кристалізації в ізоелектричній точці, додавання затравки кристалів тощо.

Як приклад, в патенті [159] запропоновано спосіб кристалізації L-фенілаланіну, що передбачає його первинне розчинення у диметилформаміді з подальшим додаванням одного або комбінації таких розчинників, як етанол, ефір, толуол, гексанафтен, етилацетат, та наступним охолодженням розчину нижче кімнатної температури для отримання кристалів L-фенілаланіну з різною кристалічною структурою. Однак, слід зазначити, що використання в даному методі органічних розчинників, зокрема диметилформаміду, етанолу, ефіру та толуолу, може становити екологічну загрозу через потенційне забруднення навколишнього середовища.

У статті [160] описано метод кристалізації L-фенілаланіну, що включає охолодження розчину до 40°C з подальшим додаванням 95% етанолу та коригуванням рН до 5,5 за допомогою соляної кислоти, з наступною кристалізацією при 0°C протягом ночі та фільтрацією для виділення кристалів L-фенілаланіну. Незважаючи на простоту реалізації, даний метод характеризується відносно низьким виходом цільового продукту (75%), а також утворенням кристалів  $\beta$ -типу, які є небажаною кристалічною формою. Таким чином, цей підхід не може бути визнаний оптимальним методом кристалізації L-фенілаланіну.

В іншій статті [161] було запропоновано метод кристалізації L-фенілаланіну в ізоелектричній точці, що передбачає розчинення сполуки в розчині хлоридної кислоти з подальшим додаванням висолювачів (хлориду натрію або етанолу) та одночасним введенням частинок гідроксиду натрію (NaOH). Контроль температури кристалізації та швидкості перемішування спрямований на отримання кристалів  $\alpha$ -типу L-фенілаланіну. Проте, встановлено, що внаслідок часткового покриття L-фенілаланіну висолювачами, отримані кристали характеризуються недостатньою чистотою, а максимальний вихід продукту не перевищує 78%, що є неприйнятним для промислового застосування.

Патент США [162] описує метод отримання високочистих  $\alpha$ -кристалів L-фенілаланіну безпосередньо під час культивування продуцента шляхом додавання зародкових кристалів після досягнення розчином перенасиченого стану. Цей прийом штучно індукує осадження стабільної  $\alpha$ -форми, запобігаючи спонтанному утворенню менш бажаних  $\beta$ -кристалів, що полегшує подальше культивування. Застосування цього методу є ефективним підходом для контролю поліморфізму, спрямовуючи кристалізацію до утворення термодинамічно стабільної  $\alpha$ -форми та запобігаючи спонтанній появі менш бажаної  $\beta$ -модифікації.

Обраний нами метод кристалізації, описаний в патенті [168], поєднує 2 методи кристалізації (в ізоелектричній точці та з додаванням затравних кристалів) для оптимізації процесу та можливості його використання в промисловому середовищі

Процес проводять при температурі 37-45°C та інтенсивному перемішуванні в діапазоні 100-150 об/хв. Швидкість подачі 14%-ого розчину хлоридної кислоти

контролюється таким чином, щоб об'єм доданої кислоти за годину становив 5-10% від початкового об'єму розчину L-фенілаланіну. На початковій стадії кристалізації, при появі перших ознак утворення твердої фази у вигляді білих пластівців, подачу кислоти тимчасово припиняють та вводять затравку в кількості 1-3% від маси початкового розчину з подальшим перемішуванням протягом 1-2 годин для ініціювання кристалізації. Після цього відновлюють подачу 14%-ого розчину хлоридної кислоти до досягнення рН розчину 5,0-6,0. Завершальним етапом є охолодження кристалізаційної системи до кімнатної температури шляхом природного зниження температури. З метою підвищення економічної ефективності процесу передбачено можливість регенерації маточного розчину шляхом його концентрування для подальших циклів кристалізації [168].

Запропонований метод є технологічно простим, не потребує високих температур, що дозволяє скоротити час охолодження та зменшити енергетичні витрати. Крім того, процес характеризується високою керованістю та відтворюваністю. Важливою перевагою є відсутність необхідності використання органічних розчинників, що робить метод більш екологічно безпечним. Отримані кристали L-фенілаланіну мають  $\alpha$ -модифікацію, характеризуються однорідністю розміру частинок, що уможлиблює виключення стадії механічного подрібнення з технологічного процесу.

Завершальним етапом є відділення кристалів фенілаланіну методом вакуумної фільтрації, промивання їх етанолом та сушіння під вакуумом [168].

Використання вакуумної фільтрації підвищує ефективність розділення, забезпечуючи швидкий і ефективний збір твердих кристалів, що є важливим при роботі з великим об'ємом рідини.

Після відділення кристалів, на їхній поверхні та в міжкристалічних порожнинах залишається тонкий шар маточного розчину. Для мінімізації вмісту домішок у кінцевому продукті застосовується етап промивання кристалічного осаду. Використання етанолу як промивної рідини зумовлено його здатністю ефективно розчиняти забруднення, одночасно демонструючи обмежену розчинність щодо

цільової амінокислоти, що сприяє збереженню виходу кінцевого продукту [168]. Наступним етапом технологічного процесу є сушіння отриманих кристалів.

### **8.5. Обґрунтування вибору методу сушіння кристалів фенілаланіну**

Для видалення вологи з цільових продуктів застосовують різні методи та установки, які класифікують за станом вологи, що видаляється (рідка або тверда фаза), і способом передачі тепла (контактний, конвекційний, радіаційний). Оптимальний вибір способу сушіння залежить від властивостей вихідної речовини, таких як її консистенція, вміст вологи та чутливість до нагрівання [82].

У сучасній практиці для сушіння кристалів найбільш поширеними є конвективні сушарки різної конструкції та вакуумні сушарки.

Пневматичні сушильні установки знаходять застосування для сушіння дрібнодисперсних матеріалів з однорідним гранулометричним складом. Принцип їх функціонування полягає у введенні попередньо підігрітого в калорифері повітряного потоку в сушильну трубу одночасно з вологим матеріалом, що подається живильником. В процесі транспортування у висхідному повітряному потоці відбувається інтенсивне висушування матеріалу. Сепарація сухих часток препарату від повітря здійснюється за допомогою циклонів, а відпрацьоване повітря піддається додатковому очищенню на фільтрах. Однією з ключових характеристик пневматичних сушарок є висока швидкість процесу дегідратації, що є суттєвою перевагою при роботі з термолабільними сполуками, оскільки мінімізує час їх перебування під впливом підвищених температур, запобігаючи термічному руйнуванню. Але суттєвим недоліком є значні габаритні розміри. Крім того, економічна ефективність їх застосування найбільш повною мірою проявляється у великомасштабних виробничих процесах, що може обмежувати їх доцільність для малих об'ємів виробництва [163, 164].

Сушіння під вакуумом являє собою високоефективний метод видалення розчинників із твердих кристалічних матеріалів, який набув широкого застосування в промисловості. Зниження тиску у вакуумних сушарках забезпечує ефективне видалення розчинника з кристалічних матеріалів за рахунок значного зменшення температури кипіння. Такий підхід є особливо цінним для сушіння термочутливих

сполук, оскільки мінімізує ризик термічного руйнування або небажаних структурних змін. Крім того, контрольовані умови вакуумного сушіння сприяють збереженню цілісності кристалічної ґратки та зовнішньої форми кристалів. Завдяки м'яким умовам процесу, вакуумні сушарки можуть застосовуватися для обробки делікатних кристалічних речовин без їхнього механічного пошкодження [165].

Аналіз патентної та наукової літератури, присвяченої процесам виділення та сушіння амінокислот, зокрема L-фенілаланіну та L-треоніну, дозволяє окреслити типові підходи до вибору сушильного обладнання. Так, у патенті [166] для висушування кристалів L-фенілаланіну моногідрату після кристалізації та промивання ацетоном застосовували вакуумну сушку, процес здійснювали при 30°C і тиску 50 мбар протягом 24 годин. Вибір вакуумної сушарки в даному випадку обґрунтовано необхідністю збереження кристалічної структури термочутливого моногідрату L-фенілаланіну шляхом мінімізації ризику термічної деградації або фазових перетворень за рахунок низької температури процесу. Аналогічний підхід спостерігається і в науковій статті [167], де висушування кристалів моногідрату L-фенілаланіну після перекристалізації також здійснювалося за аналогічних умов.

На противагу цьому, у патенті [168], присвяченому отриманню триптофану, на етапі висушування кристалів амінокислоти використовували пневматичну сушарку. Цей тип обладнання забезпечує швидке видалення вологи з твердої фази за допомогою потоку гарячого повітря, що є ефективним для обробки значних об'ємів кристалічного продукту.

Оскільки в патенті [152] не вказано, яка саме сушильна установка використовується, на основі аналізу основних типів сушарок для сушіння кристалів було обрано вакуум сушильну шафу.

Як приклад можна навести вакуум сушильну шафу СВ-80 (рис. 8.3), від українського виробника UOSLab. З технічною характеристикою обладнання можна ознайомитись нижче [169]:

- Максимальне завантаження камери – 56 кг,
- Діапазон вакуумметра - 0,06 - 100 МПа
- Діапазон робочої температури – (+5) – (+ 200) °С
- Кількість полиць - 4 шт;
- Розміри камери - 420×420×470 мм.



Рис. 8.3. Вакуум сушильна шафа СВ-80

Згідно патенту [152], процес сушіння являє собою двоетапну процедуру, розроблену для ефективного видалення залишкової вологи з кристалів L-фенілаланіну, забезпечуючи при цьому збереження їхньої якості та структурної цілісності. Перший етап передбачає витримування кристалів при температурі 40–60 °С протягом 6–8 год. Другий етап - підвищення температури до 75–80 °С і триває 2–4 год. Після завершення процесу сушіння проводиться охолодження продукту до кімнатної температури.

Отже, процес виділення та очищення фенілаланіну здійснюється поетапно та охоплює низку послідовних стадій (рис. 8.4.):

- **Відділення біомаси *Escherichia coli* xllp21** центрифугуванням культуральної рідини (20 хв, 3500 хв<sup>-1</sup>);
- **Попередня обробка супернатанту** (підкислення до рН 2±1 концентрованою сульфатною кислотою);
- **Сорбція фенілаланіну** на катіоніті Purolite C100;
- **Елюція фенілаланіну** з катіонообмінної смоли Purolite C100 0,5 М розчином аміачної води;

- **Концентрування елюенту** вакуум-випарюванням (60–70 °С, 0,096–0,098 МПа) до досягнення вмісту фенілаланіну у концентраті 90–100 г/л;
- **Кристалізація концентрованого розчину фенілаланіну** (37-45°С, 100-150 хв<sup>-1</sup>, **I етап** - подача 5-10 % від початкового об'єму концентрату фенілаланіну 14%-ого розчину хлоридної кислоти, **II етап** - при появі білих пластівців твердої фази введення затравки у кількості 1-3 % і припинення подачі хлоридної кислоти, **III етап** – через 1-2 год кристалізації подача 14%-ого розчину хлоридної кислоти до досягнення рН 5-6, охолодження до кімнатної температури після завершення кристалізації);
  - **Відділення кристалів фенілаланіну** вакуум-фільтрацією;
  - **Промивання кристалів фенілаланіну** 2% етанолом;
  - **Повторне відділення кристалів фенілаланіну** вакуум-фільтрацією;
  - **Сушіння кристалів фенілаланіну** у вакуум-сушильній шафі (**I етап** - 40–60 °С, 6-8 год, **II етап** - 75–80 °С, 2-4 год);

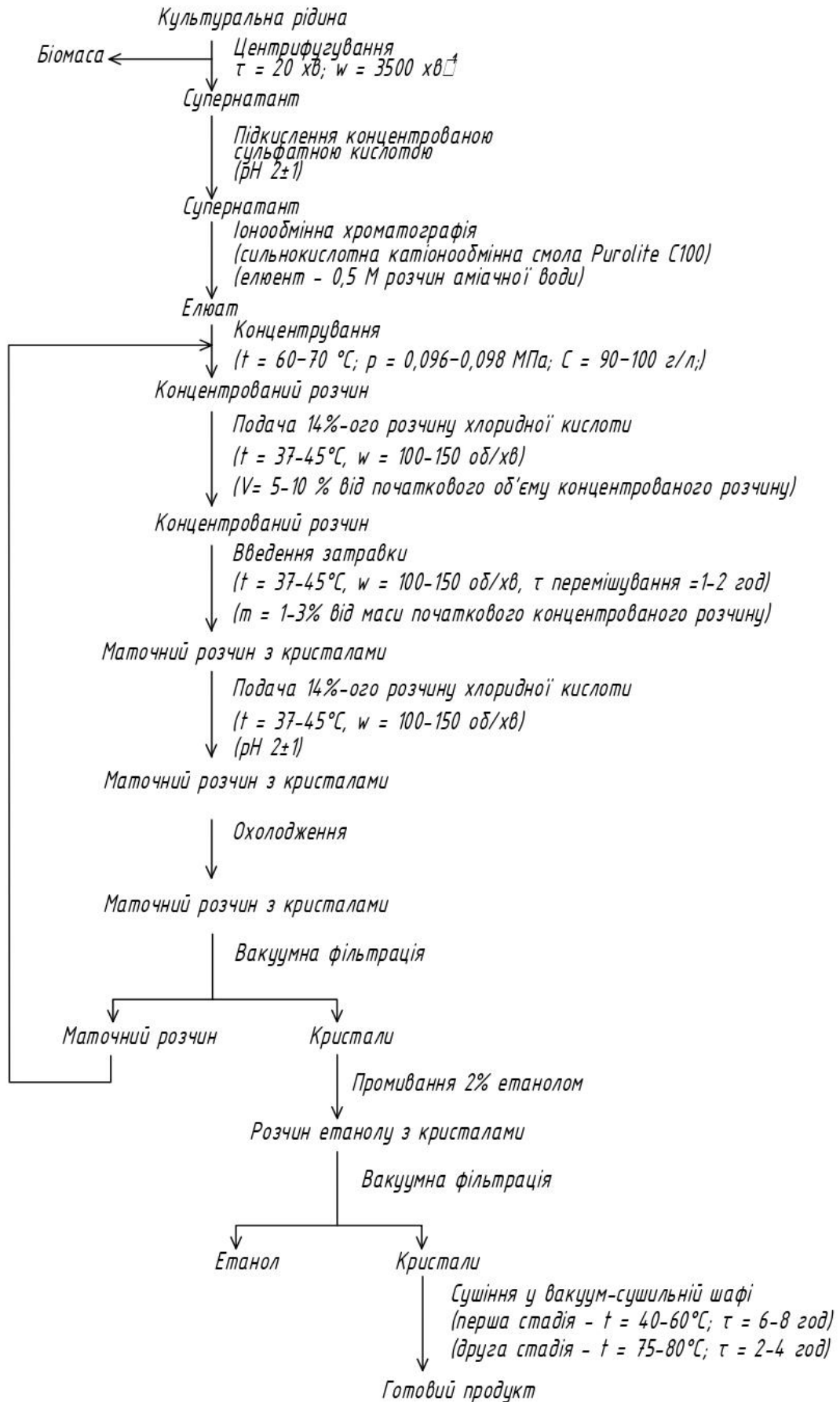


Рис.8.4 Схема очищення та виділення фенілаланіну

## РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ФЕНІЛАЛАНІНУ.

### 9.1. Мікробіологічний контроль

Асептичні умови в процесі культивування бактерій *E. coli* Xlip21 є необхідною умовою для ефективного та якісного біосинтезу фенілаланіну. Для забезпечення відсутності контамінації на всіх етапах промислового виробництва здійснюють мікробіологічний контроль.

Кожні 4 години протягом усього процесу культивування з інокуляторів та ферментера відбирають зразки культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації джерела вуглецю (глюкоза), азоту (сульфат амонію, аміачна вода) та цільового продукту.

Мікробіологічний контроль проводиться трьома методами: висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання [170].

#### Метод прямого висіву

0,1 мл зразку, відібраного стерильною піпеткою від проби, вносять у чашки Петрі з різними видами твердого поживного середовища, в залежності від біологічного виду досліджуваної контамінуючої мікробіоти: на м'ясо-пептонному агарі (МПА) визначають присутність бактерій, на сусло-агарі (СА) – присутність дріжджів та грибів. За допомогою стерильного шпателя Дригальського внесене поживне середовище рівномірно розподіляють по всій площині поверхні агару. Чашки з середовищем МПА інкубують в термостаті при температурі від 30 до 35 °С протягом 48 год; чашки, що містять СА – від 20 до 25 °С упродовж 72 год. Контроль здійснюють безпосередньо після інкубації посівів та візуально визначають відсутність мікробіоти у простерилізованих середовищах [170].

Даним методом можна визначити стерильність титрувального чи запасного розчину та композицій.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>			
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Савчук О.О.			РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ФЕНІЛАЛАНІНУ	Літера	Аркцш	Аркцшів
Консульт.							125	6
Керівник		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Зав. каф.		Стадніков В.П.						

### Метод виснаженого мазка або виснаженого штриха

Здійснивши висів методом виснаженого мазка або виснаженого штриха на чашки Петрі з різними поживними середовищами отримують результати про мікробіологічну чистоту колекційної чи робочої культури та культуральної рідини.

Невелику кількість досліджуваного матеріалу стерильною петлею переносять на поверхню поживного середовища (МПА, СА) в чашці Петрі та послідовно проводять штрихи [171]. Чашки поміщають в термостат при оптимальній для продуцента фенілаланіну температурі ( $37\pm 2^\circ\text{C}$ ) на 24 год. Після інкубації візуально оцінюють відсутність чи наявність контамінації. Єдиними виявленими мікроорганізмами мають бути *E. coli* Хіп21.

Колонії кишкової палички, вирощеної на МПА, мають округлу опуклу форму, розміром 1-3 мм, кремового білого кольору з гладенькою поверхнею [172] (рис. 9.1).



Рис. 9.1. *E. coli* на м'ясо-пептонному агарі [173]

### Мікроскопіювання

Для цього методу використовують світловий мікроскоп з імерсійною системою. Готують препарат: в асептичних умовах на знежирене сухе предметне скло стерильною піпеткою наносять краплину досліджуваного зразку та обережно розмазують по поверхні, аби утворити тонкий шар проби діаметром близько 1 см. Дають йому висохнути на повітрі при кімнатній температурі, без використання термостату. Фіксують препарат, проводячи ним тричі над полум'ям пальника. З використанням скляної палички на сухий препарат наносять 1-2 краплини

імерсійного масла. Після закінчення роботи імерсійний об'єктив необхідно витерти ватою, змоченою етиловим спиртом [170].

За відсутності контамінації у пробі, в окулярі мікроскопа можна побачити клітини *E. coli* X11p21. Розташовуються в середовищі вони поодинокі або парами, паличкоподібні, грамнегативні, рухливі, не утворюють спор, розміром 1-3 мкм × 0,4-0,7 мкм (рис. 9.2) [49].



Рис. 9.2. *E. coli* X11p21 у світловому мікроскопі (100x) [174]

## 9.2. Показники росту і синтезу фенілаланіну

### 9.2.1. Визначення концентрації біомаси

Біомасу *E. coli* X11p21 визначають турбідиметричним методом [175]. Оптичну густину проби культуральної рідини ( $OD_{600}$ ) вимірюють на спектрофотометрі UV-3100 при довжині хвилі 600 нм.

Після вимірювання зразка за побудованою калібрувальною кривою визначають кількісний вміст біомаси.

Для побудови калібрувальної кривої вимірюють коефіцієнт оптичної щільності 4-5 проб з відомою концентрацією біомаси. За одержаними даними будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрацію біомаси, а на осі ординат – відповідні значення оптичної густини.

Сушу масу клітин (СМК) розраховують за рівнянням:

$$\text{СМК (г/л)} = OD_{600} \times 0,31$$

Де коефіцієнт перерахунку визначений експериментально [175].

### 9.2.2. Визначення кількості фенілаланіну

Концентрацію фенілаланіну визначають методом високоефективної рідинної хроматографії з УФ детектором.

Хроматографія проводиться на хроматографі Agilent 1100 HPLC, який оснащений діодною матрицею, насосом, автосамплером, термостатом, колонкою Zorbax Eclipse-AAA розміром 4.6 x 150 мм, дегазатором та необхідним програмним забезпеченням.

Перед початком визначення концентрації фенілаланіну зразки, відібрані з ферментера, центрифугують, надосадову рідину пропускають через бактеріальний фільтр, діаметр пор якого не перевищує 0,45 мкм, і розбавляють бідистилятом до необхідної концентрації.

Здійснюють градієнтне елюювання: рухома фаза А (40 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 7,8) і фаза В (ацетонітрил (ACN): MeOH: H<sub>2</sub>O = 45:45:10), швидкість потоку 2 мл/хв, робоча температура 40 °С. Детектування проводять за довжини хвилі 338 нм [17].

### 9.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону та Нітрогену

Головним джерелом Карбону при культивуванні *E. coli* Xllp21 є глюкоза, концентрацію якої визначають за допомогою біосенсора.

Біосенсор складається з біосенсорного чіпа B.LV5, потенціостата зі спеціальним з'єднанням для встановлення біосенсорного чіпа (передавач SIX), а також програмного забезпечення bioMON, яке використовується для роботи з біосенсорною платформою. Біосенсорний елемент виконано у вигляді проточної камери об'ємом 1 мкл з трубками (внутрішній діаметр 0,5 мм) для входу і виходу, що закінчуються різьбовими з'єднаннями типу Луер (рис. 9.3) [176].

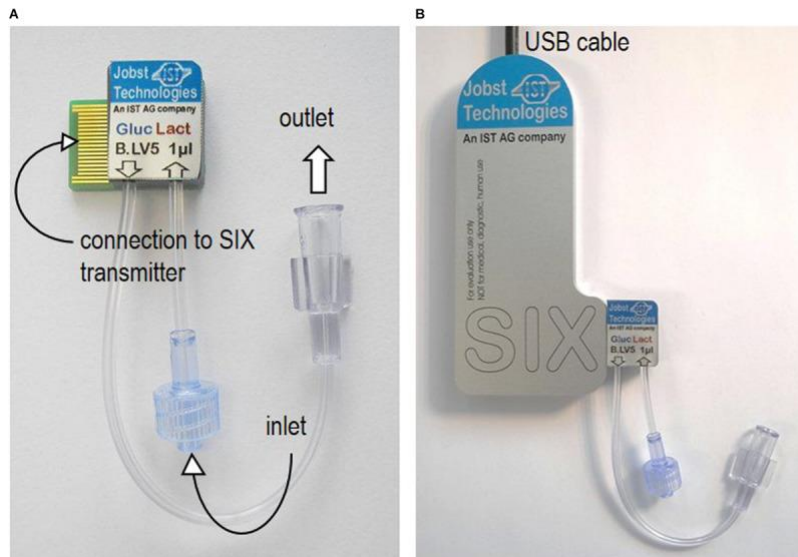


Рис. 9.3. Біосенсорний чіп B.LV5, виконаний у вигляді проточної камери з підключенням до передавача SIX і фітингами типу Луер в якості входних і вихідних з'єднань (ліворуч); біосенсор, підключений до потенціометра (праворуч)

Принцип дії біосенсора заснований на ферментативному окисленні глюкози до глюконової кислоти з подальшим повторним окисленням її флавінових груп у присутності кисню до  $H_2O_2$ , після чого здійснюється окиснення утвореного пероксиду водню на поверхні робочого електрода з подальшим вимірюванням сили струму на ньому. Віднімання сили струму, отриманого з відповідного холостого електрода від струму, отриманого з відповідного робочого електрода з ферментним покриттям дає значення струму, яке співвідноситься з наявною концентрацією глюкози. Кількість  $H_2O_2$ , окисненої на робочому електроді, пропорційна концентрації глюкози, присутньої в зразку [176].

Перед початком визначення концентрації глюкози зразки, відібрані з ферментера, центрифугують, а надосадову рідину пропускають крізь бактеріальний фільтр, діаметр пор якого не перевищує 0,45 мкм.

У біосенсорний чіп насосом закачують зразок культуральної рідини. Програмне забезпечення в режимі онлайн відображає залежність сили струму від часу. Визначають найбільше значення сили струму і за калібрувальною кривою дізнаються кількісний вміст глюкози згідно з даною вимірною величиною.

Калібрувальний графік роблять в діапазоні кількості джерела глюкози від 1 до 27 г/л, відкладаючи на осі абсцис концентрацію глюкози, а на осі ординат – силу струму в залежності від її концентрації в пробі (в нА).

Головним джерелом Азоту при культивуванні *E. coli* Х11р21 є  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та  $\text{NH}_4\text{OH}$ , в яких концентрацію йонів амонію визначають методом Несслера.

Іони амонію реагують з реактивом Несслера з утворенням сполуки жовто-коричневого кольору, величину світлопоглинання якого вимірюють спектрофотометром при 420 нм. Концентрацію амонію визначають за калібрувальною кривою [177,178].

Спершу необхідно процентрифугувати зразки, відібрані з ферментера, пропустити їх через бактеріальний фільтр, діаметр пор якого не перевищує 0,45 мкм та відібрати супернатант.

Перед аналізом зразок розбавляють дистильованою водою до концентрації іонів амонію не більше 0,4 г/л [179].

Після аналізу досліджуваного розчину за побудованою калібрувальною кривою визначають кількісний вміст амонію.

Для побудови калібрувальної кривої вимірюють коефіцієнт поглинання стандартних розчинів джерела амонію ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  або  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) відомої концентрації в діапазоні від 0,1 до 0,4 г/л. За одержаними даними будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис кількість амонію, а на осі ординат – відповідні значення коефіцієнта поглинання.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Akram M., Daniyal M., Ali A., Zainab R., Shah S. M. A., Munir N., Tahir I. M. Role of phenylalanine and its metabolites in health and neurological disorders. *IntechOpen*. 2020. doi: 10.5772/intechopen.83648
2. Hoffer L. J. Human protein and amino acid requirements. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 2016, 40(4): 460-474. doi:10.1177/0148607115624084
3. L-Фенілаланін Bekandze. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/Bekandze-L-Фенилаланин/1076705/>
4. Державний реєстр лікарських засобів України. Лікарський засіб «Алкеран». [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=17836>
5. Державний реєстр лікарських засобів України. Лікарський засіб «Амінол». [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=5953>
6. Shafer S., Mihailescu, D., Amuzescu, B. Aspartame Safety as a Food Sweetener and Related Health Hazards. *Nutrients*. 2023, 15(16), 3627. doi:10.3390/nu15163627
7. Phenylalanine in skincare, What is? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.lesielle.com/int/en/phenylalanine-in-skincare-what-is-inci-1275>
8. Dai J., Xia H., Yang C., Chen X. Sensing, uptake and catabolism of L-phenylalanine during 2-phenylethanol biosynthesis via the Ehrlich pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 601963. doi:10.3389/fmicb.2021.601963
9. Awad L. F., Ayoup M. S. Fluorinated phenylalanines: synthesis and pharmaceutical applications. *Beilstein J. Org. Chem.* 2020, 16(1): 1022-1050. doi: 10.3762/bjoc.16.91
10. Liu X, Niu H, Li Q, Gu P. Metabolic engineering for the production of l-phenylalanine in *Escherichia coli*. *3 Biotech*. 2019, 9(3). doi:10.1007/s13205-019-1619-6
11. Nie M., Wang J., Chen Z., Cao C., Zhang K. Systematic engineering enables efficient biosynthesis of L-phenylalanine in *E.coli* from inexpensive aromatic precursors. *Microb Cell Fact*. 2024, 23(12). doi:10.1186/s12934-023-02282-0
12. Gu P., Zhao S., Li C., Jiang S., Zhou H., Li Q. Construction of Recombinant *Escherichia coli* with a High L-Phenylalanine Production Yield from Glucose. *Microbiol. Res.* 2023, 14, p. 1185-1198. doi:10.3390/microbiolres14030079

13. Berlana D. Parenteral Nutrition Overview. *Nutrients*. 2022, 14(21): 4480. doi.org/10.3390/nu14214480.
14. Галушко О. А., Недашківський С. М., Дзюба Д. О. Класифікація розчинів для інфузійної терапії: традиційні погляди та сучасні тенденції. *Гострі та невідкладні стани в практиці лікаря*. 2015, 5: 49-52.
15. Chyniak, O., Dubenko, O., Potapov, O., Shulga, A., & Kotsyuba, A. Parkinson's disease — overview of modern treatment methods. *East. Ukr. Med. J.* 2023, 11(1): 1-13. doi.org/10.21272/eumj.2023;11(1):1-13.
16. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник – К.: Видавництво Ліра-К, 2020. – 258 с.
17. Liu, Y., Xu, Y., Ding, D., Wen, J., Zhu, B., & Zhang, D. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production *BMC biotechnol.* 2018, 18(1): 1-12. doi: 10.1186/s12896-018-0418-1.
18. Zhang, C., Zhang, J., Kang, Z., Du, G., & Chen, J. Rational engineering of multiple module pathways for the production of L-phenylalanine in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 42(5): 787-797. doi: 10.1007/s10295-015-1593-x
19. Chen, M., Liang, H., Han, C., Zhou, P., Xing, Z., Chen, Q., & Xie, R. Engineering of global transcription factor FruR to redirect the carbon flow in *Escherichia coli* for enhancing L-phenylalanine biosynthesis. *Microb. Cell Fact.* 2022, 21(1), 222. doi: 10.1186/s12934-022-01954-7
20. Wu, J., Liu, Y., Zhao, S., Sun, J., Jin, Z., & Zhang, D. Application of dynamic regulation to increase L-phenylalanine production in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 29: 923-932. doi: 10.4014/jmb.1901.01058
21. Ding, D., Liu, Y., Xu, Y., Zheng, P., Li, H., Zhang, D., & Sun, J. Improving the production of L-phenylalanine by identifying key enzymes through multi-enzyme reaction system in vitro. *Sci. Rep.* 2016, 6(1), 32208. doi: 10.1038/srep32208
22. Phenylalanine. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylalanine>
23. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків:

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. — Т. 2. — 724 с.

24. Fernandez V. G., Rajamannan B., Periandy S., Soundhariya S. DFT and spectroscopic analysis of p-bromo-dl-phenylalanine. *Int. J. Emerg. Technol. Innov. Res.* 2021, 8(8): 838-862. ISSN:2349-5162
25. The experiment that helped crack the code of life. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://oligofastx.com/the-experiment-that-cracked-the-code-of-life/>
26. Інструкція АЛКЕРАН. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://likicontrol.com.ua/інструкція/?\[24137\]](https://likicontrol.com.ua/інструкція/?[24137])
27. Melphalan [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/melphalan>
28. Van Spronsen F. J., van Wegberg A. M., Ahring K., Bélanger-Quintana A., Blau N., Bosch A. M., MacDonald A. Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. *Lan. Diab. Endocr.* 2017, 5(9):743-756. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30320-5
29. Інструкція КУВАН. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://likicontrol.com.ua/інструкція/?\[25294\]](https://likicontrol.com.ua/інструкція/?[25294])
30. Aspartame hazard and risk assessment results released. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.iarc.who.int/featured-news/aspartame-hazard-and-risk-assessment-results-released>
31. Di Lorenzo, R., Bernardi, A., Grumetto, L., Sacchi, A., Avagliano, C., Coppola, S., de Giovanni di Santa Severina, A. F., Bruno, C., Paparo, L., Laneri, S., Dini, I. Phenylalanine Butyramide Is a New Cosmetic Ingredient with Soothing and Anti-Reddening Potential. *Molecules.* 2021, 26(21), 6611. doi:10.3390/molecules26216611
32. Di Lorenzo, R., Di Lorenzo, V., Di Serio, T., Marzocchi, A., Ricci, L., Vardaro, E., Greco, G., Maisto, M., Grumetto, L., Piccolo, V., Morelli, E., & Laneri, S. Phenylalanine Butyramide: A Butyrate Derivative as a Novel Inhibitor of Tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25(13), 7310. doi:10.3390/ijms25137310
33. Li H., Kang Z. Zhang K., Gong S., Zhao X., Yan Z., Song C. Enhanced inhibition of HEDP on SRB-mediated corrosion with D-phenylalanine. *Environ. Res.* 2023, 227, 115754. doi:

10.1016/j.envres.2023.115754

34. Hagino H., Nakayama K. L-Phenylalanine production by analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* 1974, 38(1): 157-161. doi:10.1080/00021369.1974.10861130.
35. Tsuchida T., Kubota K., Morinaga Y., Matsui H., Enei H., Yoshinaga F. Production of l-phenylalanine by a mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256. *Agric. Biol. Chem.* 1987, 51(8): 2095-2101. doi: 10.1271/bbb1961.51.2095.
36. Shio I., Sugimoto S. I., Kawamura K. Breeding of phenylalanine-producing *Brevibacterium flavum* strains by removing feedback regulation of both the two key enzymes in its biosynthesis. *Agric. Biol. Chem.* 1988, 52(9): 2247-2253. doi: 10.1271/bbb1961.52.2247.
37. Choi Y. J., Tribe D. E. Continuous production of phenylalanine using an *Escherichia coli* regulatory mutant. *Biotechnol. Lett.* 1982, 4: 223-228. doi: 10.1007/BF00132390.
38. Hwang S. O., Gil G. H., Cho Y. J., Kang K. R., Lee J. H., Bae J. C. The fermentation process for L-phenylalanine production using an auxotrophic regulatory mutant of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1985, 22: 108-113. doi: 10.1007/BF00250029.
39. McEvoy J. J., Joyce A. Production of L-phenylalanine by DL-phenylalanine hydroxamate-resistant tyr<sup>-</sup> mutants of *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell. Biochem.* 1974, 4: 191-195. doi: 10.1007/BF01731480.
40. Katsumata R., Ozaki A., Oka T., Furuya A. Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 1984, 159(1): 306-311. doi: 10.1128/jb.159.1.306-311.1984.
41. Yoshihama M., Higashiro K., Rao E. A., Akedo M., Shanabruch W. G., Follettie M. T., Sinskey A. Cloning vector system for *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 1985, 162(2): 591-597. doi: 10.1128/jb.162.2.591-597.1985.
42. Ozaki A., Katsumata R., Oka T., Furuya A. Cloning of the genes concerned in phenylalanine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* and its application to breeding of a phenylalanine producing strain. *Agric Biol Chem.* 1985, 49: 2925-2930. doi: 10.1080/00021369.1985.10867205.

43. Ito H., Sato K., Matsui K., Sano K., Enei H., Hirose Y. Molecular breeding of a *Brevibacterium lactofermentum* L-phenylalanine producer using a cloned prephenate dehydratase gene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1990, 33: 190-195. doi: 10.1007/BF00176523.
44. Kataoka N., Matsutani M., Matsushita K., Yakushi T. Stepwise metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of phenylalanine. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2023, 69(1): 11-23. doi: 10.2323/jgam.2022.08.002.
45. Zhang C., Zhang J., Kang Z., Du G., Yu X., Wang T., Chen J. Enhanced production of L-phenylalanine in *Corynebacterium glutamicum* due to the introduction of *Escherichia coli* wild-type gene *aroH*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 40(6): 643-651. doi: 10.1007/s10295-013-1262-x.
46. Escalante A., Calderón R., Valdivia A., de Anda R., Hernández G., Ramírez O. T., Bolívar, F. Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb. Cell Fact.* 2010, 9: 1-12. doi: 10.1186/1475-2859-9-21.
47. Ikeda M., Katsumata, R. Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58(3): 781-785. doi: 10.1128/aem.58.3.781-785.1992.
48. Nie, M., Wang, J., Chen, Z. et al. Systematic engineering enables efficient biosynthesis of L-phenylalanine in *E. coli* from inexpensive aromatic precursors. *Microbial Cell Factories.* 2024, 23(12), doi.org/10.1186/s12934-023-02282-0
49. Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. *Escherichia coli*: an overview of main characteristics. *IntechOpen.* 2022. doi: 10.5772/intechopen.95203
50. LM of the Gram-negative bacteria *E. Coli* [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://www.sciencephoto.com/media/12441/view/lm-of-the-gram-negative-bacteria-e-coli>
51. Biochemical Test of *Escherichia coli* (*E. coli*). [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://microbenotes.com/biochemical-test-of-escherichia-coli-e-coli/>
52. K12 *E Coli* colonies on a plate [Электронный ресурс] / Режим доступа: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ecoli\\_colonies.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ecoli_colonies.png)

53. MacConkey Medium. NCBI Bookshelf. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>
54. Wibisono, F. J., Sumiarto, B., Untari, T., Effendi, M. H., Permatasari, D. A., & Witaningrum, A. M. The presence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* on layer chicken farms in Blitar Area, Indonesia. *Biodiversitas*. 2020, 21(6), 2667-2671. doi:10.13057/biodiv/d210638
55. Hossain, M. S., Rahman, W., Ali, M. S., Sultana, T., Hossain, K. M. M. Identification and antibiogram assay of *Escherichia coli* isolated from chicken eggs. *Journal of Bio-Science*. 2021, 123-133. doi:10.3329/jbs.v29i0.54828
56. Taxonomy browser (*Escherichia coli* str. K-12 substr. W3110). *National Center for Biotechnology Information*. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
57. What is Parkinson's? [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.parkinson.org/understanding-parkinsons/what-is-parkinsons>
58. Parkinson disease. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>
59. Всесвітній день боротьби з хворобою Паркінсона: які медичні послуги може отримати пацієнт безоплатно? [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://moz.gov.ua/uk/vsesvitnij-den-borotbi-z-hvoroboju-parkinsona-jaki-medichni-poslugi-mozhe-otrimati-pacient-bezoplatno>
60. Міщенко В. М., Дмитрієва О. В., Здесенко І. В., Легка М. О. Когнітивні розлади у пацієнтів з цереброваскулярними порушеннями, які перенесли COVID-19. *Психіатрія, неврологія та медична психологія*. 2023. 22: 21-29. doi: 10.26565/2312-5675-2023-22-03.
61. Premraj, L., Kannapadi, N. V., Briggs, J., Seal, S. M., Battaglini, D., Fanning, J., Cho, S. M. Mid and long-term neurological and neuropsychiatric manifestations of post-COVID-19 syndrome: A meta-analysis. *J Neurol Sci*. 2022, 434: 120162. doi: 10.1016/j.jns.2022.120162
62. Ukraine COVID - Coronavirus Statistics - Worldometer. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.worldometers.info/coronavirus/country/ukraine/#google\\_vignette](https://www.worldometers.info/coronavirus/country/ukraine/#google_vignette)

63. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: home parenteral nutrition (HPN) in adult patients. PubMed. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19464089/>
64. Iacone, R., Scanzano, C., Santarpia, L., Cioffi, I., Contaldo, F., Pisanisi, F. Macronutrients in parenteral nutrition: amino acids. *Nutrients*. 2020, 12(3): 772. doi: 10.3390/nu12030772
65. Wu, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*. 2009, 37: 1-17. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0
66. «Незламні»: Як працює опікове відділення під час великої війни. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kunsht.com.ua/articles/nezlamni-ia-k-pratsiuje-opikove-viddillennia-pid-chas-velykoyi-viyny>
67. 11. Anesthesiologist volunteers with group that treats Ukrainian pediatric burn patients. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://medicine.wustl.edu/news/anesthesiologist-volunteers-with-group-that-treats-ukrainian-pediatric-burn-patients>
68. Уряд Тайваню інвестує майже 2 000 000 доларів у лікування опіків в Україні. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://city-adm.lviv.ua/news/science-and-health/medicine/301387-uriad-taivaniu-investuie-maizhe-2-000-000-dolariv-u-likuvannia-opikiv-v-ukraini-video>
69. Березницький Я.С, Бойко В.В, Велигоцький М.М, Дубров С.О, Каніковський О.Є, Клігуненко О.М. Невідкладна хірургія органів черевної порожнини (стандарти організації та професійно орієнтовані алгоритми надання медичної допомоги). Київ: Бібліотека “Здоров’я України”, 2018. – 282 с.
70. Рак в Україні, 2021-2022. Бюлетень Національного канцер-реєстру України. [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL\\_24/PDF/BULL\\_24.pdf](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/PDF/BULL_24.pdf)
71. Melphalan: Uses, Interactions, Mechanism of Action. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01042>
72. Ghirardi, V., Fagotti, A., Ansaloni, L., Valle, M., Roviello, F., Sorrentino, L., Marrelli, D. Diagnostic and therapeutic pathway of advanced ovarian cancer with peritoneal metastases. *Cancers*. 2023, 15(2): 407. doi: 10.3390/cancers15020407

73. Breast Cancer Facts and Statistics. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.breastcancer.org/facts-statistics>
74. Glycolysis. *GenomeNet*: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/ecj00010>
75. Citrate cycle (TCA cycle). *GenomeNet*: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/ecj00020>
76. Pyruvate metabolism. *GenomeNet*: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/ecj00620>
77. Pentose phosphate pathway. *GenomeNet*: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/ecj00030>
78. Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis. *GenomeNet*: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/ecj00400>
79. Bayramoglu B., Toubiana D., Gillor O. Genome-wide transcription profiling of aerobic and anaerobic *Escherichia coli* biofilm and planktonic cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* 2017, 364(3), fnx006. doi: 10.1093/femsle/fnx006
80. Wang J., Liu L., Zhou H., Li J., Du G., Chen, J. Comparative study of L-phenylalanine production in the growing and stationary phases during high cell density cultivation of an auxotrophic *Escherichia coli*. *Biotechnol. and Bioproc. Eng.*, 2011, 16: 916-922. doi:10.1007/s12257-011-0135-2
81. Hoang M. D., Polte I., Frantzmann L., von den Eichen N., Heins A. L., Weuster-Botz D. Impact of mixing insufficiencies on L-phenylalanine production with an *Escherichia coli* reporter strain in a novel two-compartment bioreactor. *Microb. cell fact.* 2023, 22(1), 153. doi:10.1186/s12934-023-02165-4
82. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. К.НУХТ. 2022. 373 с
83. Laminar flow cabinet: an important piece of equipment for a lab. *Lab Associates*: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://labassociates.com/laminar-flow-cabinet>
84. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 «Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр.

- «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т. П. Пирог, Ю. В. Карлаш, В. О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79.
85. Асептика біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освітньо-проф. програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навч. / уклад. О.П. Головей, В.М. Гуляєв. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. - 140.
86. Загальна біотехнологія [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. рівня «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-проф. прог. «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Ю.М. Пенчук. – К.: НУХТ, 2019. – 80
87. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. - К.: НУХТ, 2009. – 336.
88. Грегірчак Н.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Н.М.Грегірчак – К.: НУХТ, 2020. – 177 с.
89. Державний реєстр дезінфекційних засобів [Електронний ресурс] / Режим доступу: [https://data.gov.ua/dataset/reestr\\_dezzasobiv\\_moz](https://data.gov.ua/dataset/reestr_dezzasobiv_moz)
90. ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування засобу для зовнішнього застосування «Ультра Дез» («Ultra Dez»). ТМ «Helper Professional» з метою дезінфекції поверхонь та передстерилізаційного очищення виробів медичного призначення за ТУ У 20.2-34553358-001:2020 «Засоби дезінфікуючі ТМ «Helper Professional» [Електронний ресурс] / Режим доступу: [https://omega-b.com.ua/wp-content/uploads/2023/04/instrukcziya\\_dezzasib\\_ultra-dez.pdf](https://omega-b.com.ua/wp-content/uploads/2023/04/instrukcziya_dezzasib_ultra-dez.pdf)
91. ІНСТРУКЦІЯ щодо використання Засіб дезінфікуючий «ONclean Оху (ОНклін Оксі)» [Електронний ресурс] / Режим доступу: [https://lysoform.in.ua/content/files/nstrukcja\\_on\\_kln\\_oks\\_peroksid\\_35\\_2-17816546.pdf](https://lysoform.in.ua/content/files/nstrukcja_on_kln_oks_peroksid_35_2-17816546.pdf)
92. Засіб дезінфікуючий «Vasept Glutar» / «Васепт Глутар» (концентрат) [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://vladasept.com.ua/ua/p1747150234-zasib->

[dezinfikuyuchij-vasept.html](http://dezinfikuyuchij-vasept.html)

93. ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування засобу «АМІНОРМ» з метою дезінфекції, дезінфекції високого рівня, передстерилізаційного очищення та хімічної стерилізації [Електронний ресурс] / Режим доступу: [https://storage.ua.prom.st/2853645\\_nstruktsiya\\_onklin.pdf](https://storage.ua.prom.st/2853645_nstruktsiya_onklin.pdf)
94. Мийний засіб з дезінфекційною дією PUR-272) [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://coagulant.com.ua/catalog/pur-272/>
95. Efir C-12 [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://pro-formula.com.ua/efir-c-12-ua.html>
96. Санітайзер Antivirax. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://reformacosmetics.com/product/sanitayzer-antivirax-250-ml/>
97. Засіб для дезінфекції шкіри рук ANTIVIRAX санітайзер. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://zakupka.com/uk/p/1180513239-zasib-dezinfekcii-shkiri-ruk-antivirax-polshcha-standart-es-vmist-spirtu-80-flakon-11-z-pompoyu/>
98. ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування засобу «Гронтанол Е» серія Алое вера «Аллосепт» з метою дезінфекції шкіри рук та шкірних покривів, екстреної дезінфекції [Електронний ресурс] / Режим доступу: [http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin\\_upload/dana/grontanol-alosept.pdf](http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/dana/grontanol-alosept.pdf)
99. Budavari S., O'Neil M., Smith A., Heckelman P., Obenchain J. The Merck Index (ed. Budavari S.). CRC Press. 1996. 364 p.
100. L-Tyrosine. ChemSrc: [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.chemsrc.com/en/cas/60-18-4\\_956550.html](https://www.chemsrc.com/en/cas/60-18-4_956550.html)
101. Yeast extract. Merck: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/mm/103753?srsId=AfmBOooUsPpobmqveyX1sTz4FfId3rDzv4ksS3Mab7jV7khgfIwQDTK>
102. Fermentation tank. Ruian Global Machinery: [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.chinamachinerygroup.com/en/productsinfo\\_1068.html](http://www.chinamachinerygroup.com/en/productsinfo_1068.html)
103. Filtered Roof Supply Fan 9 inch 775 CFM 3 Phase Belt Drive KSFV09ML3S: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://industrialfansdirect.com/supply->

[fans/roof/filtered-intake/ item/filtered-roof-supply-fan-9-inch-775-cfm-3-phase-belt-drive-ksfv09ml3s](https://www.technofilter.com.ua/types/panel/fans/roof/filtered-intake/item/filtered-roof-supply-fan-9-inch-775-cfm-3-phase-belt-drive-ksfv09ml3s)

104. Фільтри панельного типу: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.technofilter.com.ua/types/panel/>
105. F-Drive screw compressor: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.almig.de/en/products/compressed-air-generation/screw-compressors/screw-compressor-f-drive>
106. Осушувач рефрижераторного типу ATS DSI 60 (023145): [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tusk.ua/ua/product/osushitel-refrizheratornogo-tipa-dsi-60-230/1/50/>
107. COMPRESSED AIR RECEIVERS): [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://airpol.com.pl/en/products/compressed-air-receivers/>
108. Водяний нагрівач НКВ 100-4. Вентс: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vents-shop.com.ua/vodyanoy-nagrevatel-nkv-100-4/>
109. F9 Bag Filter. Filson Filter: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.filsonfilters.com/f9-bag-filter/>
110. COREVITAL APB SERIES FILTERS: [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://shop.bannerindustries.com/Customer/bainne/specpages/Cobetter\\_CorevitalAPB\\_PVDF\\_Pharma\\_Datasheet.pdf](https://shop.bannerindustries.com/Customer/bainne/specpages/Cobetter_CorevitalAPB_PVDF_Pharma_Datasheet.pdf)
111. Multipurpose pressure reactor system. Buchiglas: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.buchiglas.com/en/pressure-reactors-stirred-autoclaves/polyclave.html>
112. High-performance magnetic stirrer drives. Buchiglas: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.buchiglas.com/en/pressure-reactors-stirred-autoclaves/magnetic-stirrer-drives.html>
113. Buchi pressure reactors 0.25 – 20 liters. Buchiglas: [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://backend.lpp-group.com/sites/lpp\\_group\\_com/files/2024-07/A\\_Buchi\\_midscale\\_pressure\\_reactors\\_0.pdf](https://backend.lpp-group.com/sites/lpp_group_com/files/2024-07/A_Buchi_midscale_pressure_reactors_0.pdf)
114. Ваговий дозатор сипких продуктів великими дозами ВЛД-1. ТОВ «Пакувальні технології»: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pack->

[tech.com.ua/ua/p953830992-vesovoj-doзатор-sypuchih.html?srsId=AfmBOoppNngOpbx-Y1JddBO2-YqdwJG5bwr1UuSjxgGTA3y-WQINGltj](http://tech.com.ua/ua/p953830992-vesovoj-doзатор-sypuchih.html?srsId=AfmBOoppNngOpbx-Y1JddBO2-YqdwJG5bwr1UuSjxgGTA3y-WQINGltj)

115. Лічильник води Gross MTK-UA 15. Goodmax: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://goodmax.com.ua/uk/ru/product/1050-schetchik-vody-gross-mtk-ua-15-mnogostrujnyj>.
116. Bioreactor System. Innova: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>
117. Перистальтичний насос SEKO PR-1. Engineering Systems: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dosingtech.com.ua/uk/product/peristaltichnij-nasos-seko-pr-1-proporsijna-vitrata-0-15-1-1-god-3-bar-sekobril/>
118. Desktop in-Situ Sterilized Glass Fermenter. Laboao: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://laboao.en.made-in-china.com/product/hOwtmulUZcrZ/China-Laboao-Desktop-in-Situ-Sterilized-Glass-Fermenter.html>
119. Перистальтичний насос SEKO PR-18. Engineering Systems. URL: [https://dosingtech.com.ua/uk/product/peristalticheskij-nasos-seko-pr-18-proporsijni-vitrata-3-18-1-god-0-1-bar-santoprene-ppr0018a1000\\_a/](https://dosingtech.com.ua/uk/product/peristalticheskij-nasos-seko-pr-18-proporsijni-vitrata-3-18-1-god-0-1-bar-santoprene-ppr0018a1000_a/).
120. Лабораторний реактор РП-5 для МЛФ 5 л. Промвіт: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/laboratornyj-reaktor-rp-5-dlya-mlf-kremy-mazi-geli-5-1/>
121. Biostat® Cplus The Stainless Steel Fermenter. Sartorius Stedim Biotech: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sartorius.com/download/9612/10/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf>
122. Лічильник холодної води Baylan KK-15 Dn25: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://elmisto.com.ua/ua/p1205980753-schetchik-holodnoj-vody.html>.
123. Биореактор ферментер РФ-60. Промвіт: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-fermenter-rf-60/>
124. Перистальтичний насос SEKO NPG 1.5. Engineering Systems: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dosingtech.com.ua/uk/product/peristaltichnij-nasos-seko-npg-1-5-fiksovana-vitrata-1-5-1-rik-0-1-bar-santoprene-oem/>

125. Лічильник води промисловий. Склоприлад: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://steklopribor.com/catalog/measuring-instruments/water-meter/5ff55f32a50345425e7fd3c9>
126. Апарати з механічним змішуючим пристроєм. ООО ГК ЕВРОХИММАШ К.О.: [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://euromash.kiev.ua/ua/aparati\\_emal\\_mehanicheskim\\_perem\\_ustroystvom\\_ua.php](http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php)
127. Мембранний насос для рідин 1,5 л/хв. Агротех: <https://agro-teh.com.ua/ua/p860452263-membrannyj-nasos-dlya.html>.
128. Pilot and small industrial production sip bioreactors/fermentors. Bionet Engineering: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://optimus.be/uploads/sync/brochure/F3-ENG.pdf>
129. Ваговий дозатор ФС-75. ТехноМашСтрой: [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://tehnomashstroy.com.ua/ua/p1252568887-vesovoj-dozator.html?source=merchant\\_center&gad\\_source=1&gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUmTTGCJy86vIVNm37UTewYh0zFlq0mZWYlXy0hsPy3WICxyFntBtU4aAmCvEALw\\_wcB](https://tehnomashstroy.com.ua/ua/p1252568887-vesovoj-dozator.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUmTTGCJy86vIVNm37UTewYh0zFlq0mZWYlXy0hsPy3WICxyFntBtU4aAmCvEALw_wcB)
130. Електронний лічильник К24. Prom.ua: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1196933273-elektronnyj-schetchik-k24.html>.
131. Peristaltic pumps PT. Tapflo: [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://tapflo.ua/images/pt\\_tapflo\\_2015\\_web.pdf](https://tapflo.ua/images/pt_tapflo_2015_web.pdf)
132. Пневматичний мембранний насос SEKO DUOTEK. Engineering Systems: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dosingtech.com.ua/uk/product/pnevmatichnij-membrannij-nasos-seko-duotek-af000007pnttpt1-pp-nbr-ptfe-ptfe-8-l-hv/>
133. Збірники сталі емальовані. ООО ГК ЕВРОХИММАШ К.О.: [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://euromash.kiev.ua/ua/sborniki\\_emal\\_ua.php](http://euromash.kiev.ua/ua/sborniki_emal_ua.php).
134. Gulden, S. J., Riedele, C., Kopf, M. H., & Nirschl, H. Potential of flotation as alternative separation process in biotechnology with focus on cost and energy efficiency. *Chem. Eng. Sci.* 2020, 218, 115117. doi:10.1016/j.ces.2019.07.035

135. Kyzas G.Z, Matis K.A. Flotation of Biological Materials. *Processes*. 2014; 2(1):293-310. doi:10.3390/pr2010293
136. Filter-Press - Use in Bioprocess Development [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://www.celignis.com/bioprocess-filter-press.php>
137. Hadpe, S. R., Mohite, V., Alva, S., Rathore, A. S. Pretreatments for enhancing clarification efficiency of depth filtration during production of monoclonal antibody therapeutics. *Biotechnol. Prog.* 2020, 36(5), e2996. doi:10.1002/btpr.2996
138. Li, G., Liu, J., Chen, N., Xu, Q. A new method to recover L-tyrosine from *E. coli* fermentation broth. *Bioengineered*. 2020, 11(1), 1080-1083. doi:10.1080/21655979.2020.1827893
139. Strandberg, L., Köhler, K., Enfors, S. O. Large-scale fermentation and purification of a recombinant protein from *Escherichia coli*. *Process biochemistry*. 1991, 26(4), 225-234. doi:10.1016/0032-9592(91)85004-8
140. Blaesen, M., Friehs, K., Flaschel, E. Recycling of bacterial biomass in a process of L-threonine production by means of a recombinant strain of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 2007, 132(4), 431-437. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.08.011
141. Esmaeilnejad-Ahramjani, P., Hajimoradi, M. Optimization of industrial-scale centrifugal separation of biological products: Comparing the performance of tubular and disc stack centrifuges. *Biochem. Eng. J.* 2022, 178, 108281. doi:10.1016/j.bej.2021.108281
142. Flottweg sedicanter [Электронный ресурс] / Режим доступа: [https://www.flottweg.com/fileadmin/user\\_upload/data/pdf-downloads/Sedicanter-EN.pdf](https://www.flottweg.com/fileadmin/user_upload/data/pdf-downloads/Sedicanter-EN.pdf)
143. Liu, Y., Xu, Y., Ding, D., Wen, J., Zhu, B., Zhang, D. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production. *BMC Biotechnol.* 2018, 18(1): 1-12. doi.org/10.1186/s12896-018-0418-1.
144. Wu, J., Jiao, P., Zhuang, W., Zhou, J., Ying, H. Modified DIX model for ion-exchange equilibrium of l-phenylalanine on a strong cation-exchange resin *Chin. J. Chem. Eng.* 2016, 24(10): 1386-1391. doi:10.1016/j.cjche.2016.07.009
145. Sun, Z., Gao, X., Zhang, Y., Gao, C. Separation and purification of L-phenylalanine from the fermentation broth by electrodialysis. *Desalin. Water Treat.* 2016, 57(47): 22304-22310. Doi:10.1080/19443994.2015.1137082

146. Bi, P. Y., Dong, H. R., Yu, H. B., Chang, L. A new technique for separation and purification of l-phenylalanine from fermentation liquid: flotation complexation extraction. *Sep. Purif. Technol.* 2008, 63(2):487-491. Doi: 10.1016/j.seppur.2008.06.016
147. Mukhopadhyay, G., Molla, T. A. Separation of L-Phenylalanine by Solvent Sublation and Solvent Extraction Method. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* 2018, 9(3):186-194.
148. Poddar S., Khanam J., Pradhan P. Adsorptive bubble separation method in the recovery of a biomolecule. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2023, 98(4), 898-909. doi:10.1002/jctb.7295
149. Pursell, M. R., Mendes-Tatsis, M. A., Stuckey, D. C. Coextraction during reactive extraction of phenylalanine using Aliquat 336: modeling extraction equilibrium. *Biotechnol. Bioeng.* 2003, 82(5), 533-542. doi:10.1002/bit.10602
150. Exploring the Principle of Ion Exchange Chromatography and Its Applications [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/exploring-the-principle-of-ion-exchange-chromatography-and-its-applications-357491>
151. Mastering Ion Exchange Chromatography: Essential Guide [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://chromtech.com/blog/mastering-ion-exchange-chromatography-essential-guide/>
152. Pat. 101709038 China. Method for extracting L-phenylalanine from fermentation broth / Chen J. Publ. 19.05.2010.
153. Styrene Series Strong Acid Cation Resins [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://www.snowate.com/parts/ion-exchange-resin/category/strong-acid-cation-resins.html>
154. Purolite C100 [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://www.purolite.com/product-pdf/C100.pdf>
155. Purolite C100 Sodium Cycle [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://www.purolite.com/dam/jcr:c3ab3898-f067-474c-9e45-03c53324ec6d/C100-sodium-cycle.pdf>
156. Pat. 4584399 USA. Purification of L-phenylalanine / Portal C., Walter J. F. Publ. 22.04.1986.

157. Sanitary Stainless Steel Falling Film Spherical Vacuum Evaporator Concentrator [Електронний ресурс] / Режим доступу: [https://www.alibaba.com/product-detail/Sanitary-Stainless-Steel-Falling-Film-Spherical\\_62022269135.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Sanitary-Stainless-Steel-Falling-Film-Spherical_62022269135.html)
158. Pat. 102093238 China. Novel method for crystallizing L-phenylalanine / Ying H., Zhang J., Zhou X., Wu J., Xiong J., Xie J., Chen Y., Chen X., Bai J. Publ. 15.06.2011.
159. Pat. 1886385 China. Crystals of phenylalanine derivatives and production methods thereof / Shinichiro T., Noriyasu K., Akinori T., Toshihiro M. Publ. 27.02.2013.
160. Li, L.Z.; Li, L.Y. Key Technologies of Modern Biochemical Drug Production; Chemical Industry Press: Beijing, China, 2006; pp. 145–150.
161. Wei H., Xiu D., Xinsheng M., Gance D., Yajun S. Liquid membrane method extracts the phenylalanine in the fermented liquid, *East China Univ. Sci. Technol. J.*, 997,23 (12), 669-673
162. Pat. 5518904 USA. Method of producing alpha crystals of L-phenylalanine / Igarashi K., Kishino M., Seki M., Takenouchi T., Kureyama T.. Publ. 21.05.1996.
163. Малезик І.Ф., Шевченко О.Ю., Зав'ялов В.Л., Мирончук В.Г., Змієвський Ю.Г., Мисюра Т.Г., Запорожець Ю.В., Попова Н.В., Зоткіна Л.В., Мельник Н.А., Карлаш Ю.В., Бурлака Т.В. Інжиніринг біопроцесів. Модуль 1. Процеси та апарати біотехнологічних виробництв: Підручник [Електронний ресурс]. / За ред. проф. В.Л. Зав'ялова. — К.: НУХТ, 2024. — 588 с.
164. Levy, A., Borde, I. Pneumatic and Flash Drying Boca Raton, FL: Mujumdar, AS, Ed.; CRC Press. 2006, pp. 397.
165. Kohout, M., Collier, A. P., Stepanek, F. Vacuum contact drying of crystals: Multi-scale modelling and experiments. *Comput. Aided Chem. Eng.* 2004, 18, pp. 1075-1080. doi:10.1016/S1570-7946(04)80245-1
166. Pat. 102432484 China. Method of producing alpha crystals of L-phenylalanine / Lu J., Li Z., Li Y., Wang J. Publ. 21.05.2014.
167. Lu, J., Wang, J., Li, Z., & Rohani, S. Characterization and pseudopolymorphism of L-phenylalanine anhydrous and monohydrate forms. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2012, 6, 269-277. doi:10.5897/AJPP11.842

168. Pat. 101812009 China. Novel technique for extracting L-tryptophan from fermentation broth / Zhao C., Deng L., Zuo S., Meng Z. Publ. 14.12.2011.
169. Шафа сушильна вакуумна СВ-80 [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://medservice.net.ua/ua/p1368929583-shkaf-sushilnyj-vakuumnyj.html>
170. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с
171. Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лаб. практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч. / уклад. Т. П. Пирог, Л. В. Ключка. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.
172. *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics®: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.intechopen.com/chapters/84764>.
173. Isolation and identification of *Escherichia coli* (*E. coli*): [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://microbialnotes.com/isolation-and-identification-of-escherichia-coli-e-coli>
174. Hossain M.S., Rahman W., Ali M.S., Sultana T., Hossain K.M.M. Identification and Antibiogram Assay of *Escherichia Coli* Isolated From Chicken Eggs. *J. Bio-Sci.* 2021, 29(1): 123–133. doi: 10.3329/jbs.v29i0.54828.
175. Zhang C., Zhang J., Kang Z., Du G., Chen J. Rational engineering of multiple module pathways for the production of L-phenylalanine in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 42(5): 787-797. doi: 10.1007/s10295-015-1593-x.
176. Pontius K., Semenova D., Silina Y.E., Gernaey K.V., Junicke H. Automated Electrochemical Glucose Biosensor Platform as an Efficient Tool Toward On-Line Fermentation Monitoring: Novel Application Approaches and Insights. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020, 8(436). doi: 10.3389/fbioe.2020.00436

177. Ammonium Test MQuant®: [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Ammonium-Test,MDA\\_CHEM-110024](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Ammonium-Test,MDA_CHEM-110024)
178. Faizal A., Sembada A. A., Priharto N. Production of bioethanol from four species of duckweeds (*Landoltia punctata*, *Lemna aequinoctialis*, *Spirodela polyrrhiza*, and *Wolffia arrhiza*) through optimization of saccharification process and fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Saudi J. Biol. Sci.* 2021, 28(1): p. 294–301. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.002.
179. Ginésy M., Rusanova-Naydenova D., Rova U. Tuning of the Carbon-to-Nitrogen Ratio for the Production of l-Arginine by *Escherichia coli*. *Fermentation*. 2017, 3(4): p.60. doi: 10.3390/fermentation3040060.

Особливості одержання фенілаланіну у *Escherichia coli* Xllp21

Liu et al. BMC Biotechnology (2018) 18:5

Page 2 of 12

AroG, AroH, and AroF, which are subject to transcriptional and allosteric feedback-regulation by L-Phe, L-tryptophan (L-Trp), and L-tyrosine (L-Tyr), respectively. Another bottleneck in the L-Phe synthetic pathway appears in the formation of phenylpyruvate, catalyzed by the bifunctional enzyme chorismate mutase/prephenate dehydratase (PheA). PheA plays a significant role in phenylpyruvate production and this enzyme is feedback inhibited via allosteric binding of L-Phe. To improve the production of L-Phe in *E. coli*, much work has been devoted to deregulating the feedback inhibition of DAHP synthase and PheA to channel the carbon influx from the central metabolism towards L-Phe [3]. Ray et al. [11] found AroH to be insensitive to Trp by replacing Val<sup>147</sup> to Gly<sup>149</sup>. Tyr-insensitive AroF mutants were obtained by replacing Pro<sup>148</sup> or Gln<sup>152</sup> or deletion of Ile<sup>11</sup>. Zhou et al. [12] selected a L-Phe producer with PheA<sub>mut</sub>(T326P) from the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) mutation library and reported that PheA (T326P) exerted a maximum L-Phe titer of 57.63 g/L with high L-Phe productivity (1.5 g/L/h), which was the highest level reported so far. Zhou et al. [8] overexpressed *pheA*<sup>6x</sup> as well as wild-type *aroF*<sup>WT</sup> in the *E. coli* strain WSH-Z06 and the L-Phe titer of the recombinant strain reached 35.38 g/L in a 3 L fermenter, which was 2.81-times higher than the original strain and the L-Phe yield on glucose (0.26 mol/mol) was two-times higher than that of the initial strain.

The TyrR regulator of *E. coli* is a class I transcription factor. This regulator constitutes more than nine transcription units, each of which is regulated in a distinctive manner by TyrR [13]. TyrR has three functional domains: the N-terminal domain, the central domain, and the C-terminal domain [14]. The N-terminal domain is able to bind aromatic amino acid ligands and interact with the  $\alpha$ -subunit of RNA polymerase to activate the transcription of specific genes. The central domain contains an ATP binding domain, which is able to strengthen the affinity between the TyrR protein and the DNA recognition site in the C-terminal domain by nearly 4-times. The C-terminal domain contains  $\alpha$  helix-turn-helix (HTH) motif and is responsible for binding to the TyrR box sequence of controlled genes.

The TyrR regulon consists of more than nine transcription units and the regulation mechanisms vary between each individual unit [14, 15]. Up to now, 13 TyrR regulons (including TyrR itself) have been identified by using the method of genomic SELEX (9). These regulons include: AroF, AroL, TyrP, Mtr, TyrB, AroP, AroG, CusC, CyaA, ProP, FolaA, and HolE [15]. These mechanisms were discovered by observing changes of the transcription level of particular genes in either presence or absence of aromatic amino acids and were further validated by observing the results of activation or

repression after introducing site mutations into the TyrR [16]. Mutations in the ATP-binding domain affect the Phe-mediated and Tyr-mediated repression of the *aroG* gene [16].

In light of the discussion above, system level engineering was conducted in the L-Phe producer Xllp01. Firstly, we inactivated the PTS system and then co-overexpressed *galP* and *glk* genes to decrease consumption of PEP. In addition, due to the lack of relevant research on the engineering transcription factor TyrR in the industrial *E. coli* strains, we attempted to engineer the HTH domain of the TyrR to investigate the effects of the TyrR mutants on the transcription level of genes involved in the L-Phe biosynthetic pathway. Furthermore, proteomics technology was applied to provide a global protein expression profile of strains by comparing the quantities of proteins between the *E. coli* wild type and the engineered L-Phe producer.

## Methods

### Bacterial strains and cultivation conditions

All strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. The xllp01 strain was renamed in this experiment and the genome background of the strain was the same as the HD-1 strain in the publication [17].

The culture media used in this study included Luria-Bertani (LB) liquid culture medium (10 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract, and 10 g/L Tryptone), M9 media broth (1 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 6.5 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 g/L glucose, 0.24 g/L MgSO<sub>4</sub>, and 0.01 g/L CaCl<sub>2</sub>), and recovery broth (20 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast Extract, 0.5 g/L NaCl, 0.19 g/L KCl, 0.95 g/L MgCl<sub>2</sub>, and 3.6 g/L glucose).

For shake flask fermentation, a single colony was inoculated into 5 mL of LB medium with appropriate antibiotics and cultured overnight at 37 °C. The strains were then inoculated into a 500 mL shake flask containing 20 mL of seed culture medium (8 g/L yeast extract, 14 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g/L sodium citrate, 4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 g/L glucose, 8 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 40 mg/L thiamine, and 2 g/L MgSO<sub>4</sub>) at a ratio of 1:100 and incubated at 37 °C, 220 rpm for 8 h. After this, the seed culture was transferred into the fermentation medium (20 g/L glucose, 10 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g/L MgSO<sub>4</sub>, 4 g/L yeast extract, 0.015 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.015 g/L MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 3 g/L betaine, 10  $\mu$ g/L biotin, and 250 mg/L Tyr) at a ratio of 1:30. The corresponding antibiotics were added into the culture medium. The cultivation was performed in triplicate for each strain.

To cultivate strains in a 5 L fermenter, strains that were cultivated in LB overnight were inoculated into the seed culture for 7 h at 37 °C and then inoculated into a 5 L fermenter containing 3.5 L seed culture medium (1:10, v/v). The pH was controlled at 7.0  $\pm$  0.1 via

**Table 1** Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmid	Genotype	Source or reference
<i>E. coli</i> W3110	Wild type W3110 derived mutant L-tyrosineauxotrophic	Our lab
Xlp01	p15A:pheA-Thr326Pro p15A:aroF carried by PL promoter kan <sup>r</sup>	Our lab
Xlp02	Xlp01 $\Delta$ ptsH	This work
Xlp03	Xlp02 Pm37-galp Pm37-glk	This work
Xlp04	Xlp02 Pm37-galp Pm93-glk	This work
Xlp05	Xlp02 Pm93-galp Pm37-glk	This work
Xlp06	Xlp02 Pm93-galp Pm93-glk	This work
Xlp07	Xlp04 <i>tyrR</i> S493 T	This work
Xlp08	Xlp04 <i>tyrR</i> T495I	This work
Xlp09	Xlp04 <i>tyrR</i> N499D	This work
Xlp10	Xlp04 <i>tyrR</i> A498V	This work
Xlp11	Xlp04 <i>tyrR</i> S482 N	This work
Xlp12	Xlp08 pBR322: <i>tktA</i> carried by <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp13	Xlp08 pBR322: <i>ppsA</i> carried by <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp14	Xlp08 pBR322: <i>pckA</i> carried by <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp15	Xlp08 pBR322: <i>talB</i> carried by <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp16	Xlp08 pBR322: <i>aroD</i> carried by <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp17	Xlp08 pBR322: <i>ydjB</i> carried by <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp18	Xlp08 pBR322: <i>aroC</i> carried by <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp19	Xlp08 pBR322: <i>aroD</i> carried by BBa_j23109 promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp20	Xlp08 pBR322: <i>aroD</i> carried by BBa_j23105 promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp21	Xlp08 pBR322: <i>aroD</i> carried by BBa_j23106 promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp22	Xlp08 pBR322: <i>aroD</i> carried by BBa_j23101 promoter Amp <sup>r</sup>	This work
Xlp23	Xlp08 pBR322: <i>aroD</i> carried by BBa_j23100 promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p- <i>tktA</i>	pBR322: <i>tktA</i> <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p- <i>ppsA</i>	pBR322: <i>ppsA</i> <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p- <i>talB</i>	pBR322: <i>talB</i> <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p- <i>pckA</i>	pBR322: <i>pckA</i> <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p- <i>aroD</i>	pBR322: <i>aroD</i> <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p- <i>ydjB</i>	pBR322: <i>ydjB</i> <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p- <i>aroC</i>	pBR322: <i>aroC</i> <i>trc</i> promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p-j23100- <i>aroD</i>	pBR322: <i>aroD</i> BBa_j23100 promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p-j23101- <i>aroD</i>	pBR322: <i>aroD</i> BBa_j23101 promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p-j23106- <i>aroD</i>	pBR322: <i>aroD</i> BBa_j23106 promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p-j23105- <i>aroD</i>	pBR322: <i>aroD</i> BBa_j23105 promoter Amp <sup>r</sup>	This work
p-j23109- <i>aroD</i>	pBR322: <i>aroD</i> BBa_j23109 promoter Amp <sup>r</sup>	This work
pKD46	applied for gene knocking-out	[18]
pDS132	applied for gene knocking-out	[19]
P15A	applied for gene overexpression	[26]

automatic addition of a 25% ammonia water, and the dissolved oxygen (DO) was constantly retained at 40% saturation by cascading the agitation speed (400–1000 rpm) and aeration rate (2–5 vvm). Glucose feeding

was performed with a peristaltic pump when the initial glucose in the medium was exhausted and the concentration of glucose maintained below 5 g/L. Samples were collected every 2 h to determine cell density (OD<sub>600</sub>),

## Особливості одержання фенілаланіну у *Escherichia coli* PHE07

Chen et al. *Microbial Cell Factories* (2022) 21:222

Page 12 of 14

### Method for measurement of fluorescent intensities

The mutants containing  $\lambda$ -PHE biosensor with reporter RFP protein cultured in the LB medium were harvested by centrifugation and individually washed three times with the M9 medium to remove LB medium. Afterward, each mutant was inoculated with the same amount of cells into 10 mL fresh M9 medium in 50 mL conical tubes, and after cultivation of 10 h cells were subjected to fluorescence analysis using a multifunctional microplate reader. To this end, each culture was first washed three times using PBS buffer and diluted 100-fold and then RFP fluorescence was monitored using a microplate reader (Tecan M200 PRO) at an excitation wavelength of 540 nm. For fluorescent intensities, medium fluorescence unit (MFU) was calculated for each culture.

### Fermentation

The fermentation medium with 1.5 g/L tyrosine was prepared as a previous report [28]. The condition for batch fermentation in shake flask was carried out in 500 mL conical flasks containing 50 mL fermentation medium inoculated with 5% (v/v) seed culture. All the batch fermentations were carried out at 37 °C and 250 rpm for 45 h. For fed-batch fermentation in the bioreactor, it was performed in a 50-L jar fermenter (BLBIO-10SJ-10SJ-50SJ-50SJ) with an initial broth volume of 20 L. The initial glucose concentration is 10 g/L, and it was maintained at 1–5 g/L by supplementing 700 g/L glucose in the fermentation process. Ammonia was used to maintain the pH at 6.8–7.0. The dissolved oxygen (DO) level was maintained at 25–30% saturation.

### Metabolite Analysis

#### Sampling and LC-MS/MS analysis

Referring to the growth curve of PHE01 and PHE03 during the whole fermentation process (Fig. 3a), the samples in the time point of 10, 20, and 40 h were sampled and prepared for metabolites extraction (sextuplicate for each time point). Metabolite and transcript samples were taken simultaneously. The whole process took  $\leq 5$  s (metabolites) or 10 s (transcripts) per sample from sampling to flash freezing in liquid nitrogen [35]. Metabolite extraction for liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) analysis was performed by resuspending the cell pellet with 500  $\mu$ L ice-cold acetonitrile:methanol. The cell suspension was shock-frozen again in liquid nitrogen, and 500  $\mu$ L of deionized water was added. Further metabolite extraction with repeating freeze–thaw-sonification cycles followed, as described previously [36].

LC-MS/MS analyses were performed using a UHPLC system (Vanquish, Thermo Fisher Scientific) with a UPLC

BEH Amide column (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu$ m) coupled to QExactive HFX mass spectrometer (Orbitrap MS, Thermo). The mobile phase consisted of 25 mmol/L ammonium acetate and 25 mmol/L ammonia hydroxide in water (pH=9.75) (A) and acetonitrile (B). The QE HFX mass spectrometer was used for its ability to acquire MS/MS spectra on information-dependent acquisition mode in the control of the acquisition software (Xcalibur, Thermo). The ESI source conditions were set as following: sheath gas flow rate as 30 Arb, Aux gas flow rate as 25 Arb, capillary temperature 350 °C, full MS resolution as 60,000, MS/MS resolution as 7500, collision energy as 10/30/60 in NCE mode, spray Voltage as 3.6 kV (positive) or –3.2 kV (negative), respectively [37].

### Data preprocessing and annotation

The raw data were converted to the mzXML format using ProteoWizard and processed with an in-house program, which was developed using R and based on XCMS, for peak detection, extraction, alignment, and integration [38, 39]. Then an in-house MS2 database (BiotreeDB) was applied in metabolite annotation. The cutoff for annotation was set at 0.3.

### Transcript analysis

#### RNA isolation, strand-specific library preparation, and Illumina sequencing

As mentioned previously, the samples in the time point of 10, 20, and 40 h were selected and prepared for RNA isolation (triplicate for each time point). Extraction of total RNA was carried out by the Invitrogen™ TRIzol™ Reagent Kit (15596018). RNA degradation and contamination were monitored on 1% agarose gels. Total amounts and integrity of RNA were assessed using the RNA Nano 6000 Assay Kit of the Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies, CA, USA). Total RNA was used as input material for the RNA sample preparations. For our samples, mRNA was purified from total RNA by using probes to remove rRNA. Strand-specific RNA-seq cDNA library preparation of the total RNA of the different samples was based on RNA adapter ligation as described previously [40]. Afterward, the quality of the library was subsequently quantified by Qubit2.0 Fluorometer, Agilent 2100 bioanalyzer, and qRT-PCR. After the library is qualified, the different libraries are pooled according to the effective concentration and the target amount of data off the machine, then being sequenced by the Illumina NovaSeq 6000. The basic principle of sequencing is to synthesize and sequence at the same time (Sequencing by Synthesis). The fluorescent images measured by the high-throughput sequencer are converted into sequence data (reads) by CASAVA base recognition. Raw data (raw

Особливості одержання фенілаланіну у *Corynebacterium glutamicum*

790

J Ind Microbiol Biotechnol (2015) 42:787–797

and plasmids construction. *C. glutamicum* ATCC13032 and recombinant *C. glutamicum* were used for L-Phe fermentation and analysis. Plasmids pXMJ19 and pEC-XK99E, the *E. coli* and *C. glutamicum* shuttle vectors, were used for genes expression. Plasmid pk18mobSacB [38, 43] was used for genes deletion and integration in *C. glutamicum* as well as *Brevibacterium flavum* by single crossover. The oligonucleotide primers used for genes amplification in this study are listed in Supplementary Table S1.

## Media and culture condition

*Escherichia coli* was cultured in LB medium (tryptone 10.0 g l<sup>-1</sup>, yeast extract 5.0 g l<sup>-1</sup>, NaCl 10.0 g l<sup>-1</sup>) at 37 °C. During transformation, all the *C. glutamicum* strains were grown in Luria–Bertani (LB) medium with addition of 5 g l<sup>-1</sup> glucose at 30 °C. For fermentation, a 10 % (v/v) inoculum of an overnight culture (18 h) was used. Isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside was initially added to the medium with a final concentration of 1.0 mM to induce genes expression in recombinant *C. glutamicum*. Antibiotics like ampicillin (100 μg ml<sup>-1</sup>), kanamycin (50 μg ml<sup>-1</sup>), or chloramphenicol (34 μg ml<sup>-1</sup>) was supplemented to provide selective pressure for maintaining plasmids. Flask cultivations were performed in 250-ml shake flask with 20 ml medium at 30 °C at an agitation of 200 rpm. The seed medium of *C. glutamicum* was composed of (g l<sup>-1</sup>): glucose 25.0, corn steep liquor 25.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15.0, urea 2.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0, and MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, pH 6.8–7.0. The fermentation medium was composed of (g l<sup>-1</sup>): glucose 110.0, corn steep liquor 7.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, sodium citrate 2.0, glutamic acid 1.0, CaCO<sub>3</sub> 25.0, and pH 6.8–7.0.

Preparation for competent cells and transformation of *C. glutamicum*

*Corynebacterium glutamicum* competent cells for electroporation were prepared according to previously reported method [43]. *C. glutamicum* strains were inoculated in 25 ml of LB medium (containing 5 g l<sup>-1</sup> glucose) and cultured for 16 h at 30 °C with the agitation of 200 rpm. Then 10 % of the overnight cell culture was inoculated into 50-ml medium (tryptone 10.0 g l<sup>-1</sup>, yeast extract 5.0 g l<sup>-1</sup>, NaCl 10.0 g l<sup>-1</sup>, isonicotinic acid hydrazide 4.0 g l<sup>-1</sup>, glycine 25.0 g l<sup>-1</sup>, and Tween 80 0.1 %) and cultured until OD<sub>600 nm</sub> reached 0.9. The chilled cells were centrifuged (4,000 rpm, 4 °C) for 10 min and washed four times with 15 ml ice-cold 10 % (v/v) glycerol. Cells were re-suspended in 0.5 ml 10 % (v/v) glycerol and 100 μl of aliquots stored at -70 °C before application.

For electro-transformation, the competent cells were thawed on ice and mixed with 1–5 μl DNA (about 1 μg) and transferred into a 4 °C pre-cooled electroporation

cuvette (gap 0.1 cm). Electroporation was performed at 1.8 kV, 200 Ω, 25 μF and pulsed for twice. Subsequently 1 ml pre-warmed LB with brain heart infusion and sorbitol (LBHIS, tryptone 5.0 g l<sup>-1</sup>, NaCl 5.0 g l<sup>-1</sup>, yeast extract 2.5 g l<sup>-1</sup>, brain heart infusion powder 18.5 g l<sup>-1</sup>, and sorbitol 91.0 g l<sup>-1</sup>) was immediately added into the cuvette, and the contents were mixed and then transferred into a sterile Eppendorf tube. The mixture was heated in a water bath at 46 °C for 6 min. They were allowed to regenerate and segregate for up to 2 h at 30 °C and 100 rpm. Cells were plated on LBHIS agar (LBHIS medium added 1.5 % agar) containing appropriate antibiotics and incubated at 30 °C for 2 days. As a negative control, ddH<sub>2</sub>O was added to one aliquot of electro-competent cells.

## Deletion and integration of target genes in recombinant strains

Plasmid pk18mobSacB was used for inactivation of *ptsI*, *aroP*, *pheP*, *ldh*, and *aceE* and integration of *iolT2-ppgK* in *C. glutamicum* with corresponding primers (Supplementary Table S1). Specifically, two-step homologous recombination was operated for deletion or integration of the above genes [38, 43]. First, the knockout box with *kan<sup>r</sup>* as a selection marker was knocked-in the genome at the specified location. Then, the target recombinants without *kan<sup>r</sup>* resistant were generated after the second exchange. All the recombinant strains constructed were further confirmed by PCR.

## Analytical procedures

Growth of *C. glutamicum* was measured at OD<sub>600 nm</sub> with a UV-1,700 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) after appropriate dilution. Dry cell weight (DCW) was calculated with the following equation: DCW (g l<sup>-1</sup>) = OD<sub>600 nm</sub> × 0.31. Specifically, the conversion factor of 0.31 was experimentally determined in this study using *C. glutamicum* cultures. Residual glucose in the supernatant was detected by a glucose-glutamate analyzer SBA-40C (Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan, China). Intracellular and extracellular amino acids, organic acids, and intermediates were analyzed by Agilent 1200 HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) according to Zhang et al. [47].

## Results

Identification of key genes of the L-Phe biosynthetic pathway in *C. glutamicum*

In order to identify the key genes involved in L-Phe biosynthesis, the native genes that belong to the central carbon

## Особливості одержання фенілаланіну у *Escherichia coli* HD-A2

reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and mammalian diaphorase or bacterial NADH dehydrogenase<sup>26</sup>. Bifunctional chorismate mutase / prephenate dehydratase (PheA) carries out the second step in phenylalanine biosynthesis as well as in the parallel biosynthetic pathways for the production of the aromatic amino acids tyrosine and phenylalanine. The native enzyme is a dimer of identical subunits each containing a dehydratase active site, a mutase active site and a phenylalanine binding site<sup>17,18</sup>. L-Phe was shown to feedback-inhibit both the chorismate mutase and prephenate dehydratase activities of the enzyme by an allosteric mechanism<sup>6</sup>. Finally, a tyrosine-repressible aromatic amino acid aminotransferase (TyrB) catalyzes the transamination of L-Glutamic acid and phenylpyruvate to yield L-Phe<sup>19-21</sup>.

To some extent, it is possible to enhance the specific productivity of L-Phe in *E. coli* by manipulating known catalytic enzymes. Due to the complexity and interconnectivity of metabolic networks, the creation of a highly efficient cell factory for the production of a target protein often requires multiple alterations, including overexpressing key enzymes, deleting genes involved in off-pathway processes or that lead to byproducts, increasing the expression level of efflux proteins for the removal of feedback inhibition, or introducing external enzymes with high activity<sup>22-26</sup>. For instance, Backman *et al.* engineered *E. coli* for L-Phe production, based on overexpressing the *aroF*<sup>SW7</sup> and *pheA*<sup>28</sup> genes and developed an efficient fermentation process within 36 h, with a final L-Phe titer of 50 g/l<sup>27</sup>, and Marjan *et al.* applied direct reduction of the carbon flow to acetate by knocking out *ackA-pta* and *poxB*<sup>28</sup>. Although there are a number of studies on the relationships between the flux of a metabolic system *in vivo* and the absolute concentrations of particular enzymes, the measurement of precise concentrations and activities of the enzymes in the cells are quite challenging. Nevertheless, *in vitro* enzyme reaction system has been well applied in recent years to achieve the guide of engineering the strains<sup>29</sup>. Moreover, label-free proteomics tools will provide an opportunity for the measurement of absolute protein concentrations inside the cells, which will be a new application in the field of metabolic engineering.

Collectively, we took all of these advantages and developed a much easier method to analyze L-phe biosynthesis pathway quantitatively. In this study, the absolute quantities of proteins in the phenylalanine production strain HD-1 were determined using label-free proteomics. In addition, to establish a multi-enzyme reaction system, we expressed and purified six enzymes from the shikimate pathway (AroK, AroL, AroA, AroC, PheA, and TyrB) and verified their activities. We then reconstituted the shikimate pathway reaction system *in vitro* base on the absolute concentrations of shikimate enzymes obtained from the proteomics data. We found that AroL and AroA were bottlenecks for increasing phenylalanine synthesis flux. We tested overexpression of the *aroL* and *aroA* genes in the production strain and found that overexpression of *aroA* improved the yield of L-Phe by 45.18%. The results showed that the *in vitro* multi-enzyme system was a rational strategy for reconstitution of the shikimate acid pathway components *in vivo* that regulate the production of L-Phe.

### Materials and Methods

**Plasmid, bacterial strains and medium.** Plasmid pET28a was reserved in our lab. The host bacterial DH5 $\alpha$  and BL21(DE3) were purchased from invitrogen company. The *E. coli* HD-1 strain for phenylalanine production was derived from *E. coli* W3110 strain that initially undergone multiple random mutagenesis for the enhanced production of L-phenylalanine and then stepwise rational metabolic engineering. The genome sequences of the HD-1 strain were determined and compared (Table 1 and Supplementary Tables 2-3) with our knowledge. All the bacteria are kept in 30% of the glycerin and stored in -80 °C before used.

LB medium (per liter): tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g. Seed medium (per liter): glucose 20 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, MgSO<sub>4</sub> 5 g, yeast extract 4 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 15 mg, sodium citrate 0.5 g and VB1 100 mg. Fermentation medium (per liter): glucose 20 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g, MgSO<sub>4</sub> 5 g, yeast extract 4 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 15 mg, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 15 mg and Betaine monohydrate 1 g.

**Material, enzymes and chemicals.** The substrates SHIK, phenylpyruvic acid, ATP, KCl, MgCl<sub>2</sub>, PEP, FAD, NADH,  $\beta$ -Mercaptoethanol, L-Glutamic acid, pyridoxal phosphate were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Prime Star Taq polymerase was purchased from Takara and the restriction enzymes and T4 DNA ligase were purchased from NEB. Ni-NTA agarose resin was supplied by GE Healthcare for His-tagged protein purification. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and other organic solvents used for HPLC were purchased from Merck (German). Other chemicals used in this article otherwise demonstrated were purchased from Solarbio (Beijing, China).

All kits and markers used for the construction of clones were from Omega Bio-tek, Inc (USA).

**Plasmid Construction.** The genomic DNA of the phenylalanine producing *E. coli* strain HD-1 was used as the template for amplification of the phenylalanine synthesis genes. All enzymes genes were amplified by PCR using primers as described in the Supplementary Table 1. After amplification, the DNA fragments were purified from agarose gel, and subsequently inserted into the pET28a vector using restriction enzymes and T4 DNA ligase. The plasmids and strains used in this study are shown in Table 1.

**Enzyme expression and purification.** To purify the enzymes, the corresponding plasmids were introduced into *E. coli* BL21 (DE3). The DE3 cells were grown in 100 ml of LB broth at 37 °C and induced by adding 0.4 mM IPTG when the absorbance at 600 nm reached 0.6. The cells were further grown at 16 °C for 12 h before being harvested. The cell pellet was washed three times with enzyme assay buffer (136.8 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1.98 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), and resuspended in binding buffer (26 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, 2 M NaCl, 30 mM imidazole, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10  $\mu$ M Triton-X100) containing 1% cocktail (protease inhibitors), and then it was disrupted by sonication. After sonication, the cell lysate was centrifuged at 10,000  $\times$  g for 30 min at 4 °C and filtered (0.22  $\mu$ m) to remove cell debris. The supernatant fraction was subjected to Ni<sup>2+</sup>-chelating affinity chromatography containing Ni-NTA agarose equilibrated with H<sub>2</sub>O at 4 °C. The column was washed with binding buffer and then with washing buffer (26 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 M NaCl, 100 mM imidazole,

Strains and plasmids	Description	Source
HD-1	L-phenylalanine overproducing strain. It was derived from <i>E. coli</i> W3110 strain, which initially undergone multiple random mutagenesis and then overexpressing <i>aroF<sup>HT</sup></i> and <i>pheA<sup>HT</sup></i> . The genome sequences of the HD-1 strain were determined and compared (Supplementary Tables 2-3). The genome of this strain was used as the template for amplification of phenylalanine synthesis genes	This study
DH5a	This strain was used for the clone of the plasmid.	Lab stock
BL21 (DE3)	This strain was used for enzyme protein expression.	Lab stock
HD-C1	HD-1 p15A1- <i>aroC1</i> - <i>aroC</i>	This study
HD-C2	HD-1 p15A1- <i>aroC2</i> - <i>aroC</i>	This study
HD-C3	HD-1 p15A1- <i>aroC3</i> - <i>aroC</i>	This study
HD-L1	HD-1 p15A1- <i>aroL1</i> - <i>aroL</i>	This study
HD-L2	HD-1 p15A1- <i>aroL2</i> - <i>aroL</i>	This study
HD-L3	HD-1 p15A1- <i>aroL3</i> - <i>aroL</i>	This study
HD-A1	HD-1 p15A1- <i>aroA1</i> - <i>aroA</i>	This study
HD-A2	HD-1 p15A1- <i>aroA2</i> - <i>aroA</i>	This study
p15A1	p15A derivative, carrying <i>pheA<sup>HT</sup> aroF<sup>HT</sup></i> gene, Kan <sup>r</sup>	Lab stock
pET28-a(+)	<i>E. coli</i> expression plasmid, T7 promoter, T7 terminator, Kan <sup>r</sup>	Lab stock
pET28a- <i>aroL</i>	N-terminal His-tagged <i>aroL</i> , inserted between <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI sites of pET 28a (+)	This study
pET28a- <i>aroK</i>	N-terminal His-tagged <i>aroK</i> , inserted between <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI sites of pET 28a (+)	This study
pET28a- <i>aroA</i>	N-terminal His-tagged <i>aroA</i> , inserted between <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI sites of pET 28a (+)	This study
pET28a- <i>aroC</i>	N-terminal His-tagged <i>aroC</i> , inserted between <i>Eco</i> RI and <i>Hind</i> III sites of pET 28a (+)	This study
pET28a- <i>pheA</i>	N-terminal His-tagged <i>pheA</i> , inserted between <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI sites of pET 28a (+)	This study
pET28a- <i>tyrB</i>	N-terminal His-tagged <i>tyrB</i> , inserted between <i>Bam</i> HI and, <i>Eco</i> RI sites of pET 28a (+)	This study
p15A1- <i>aroC1</i>	p15A- <i>aroF<sup>HT</sup></i> - <i>pheA<sup>HT</sup></i> derivative, carrying <i>aroC</i> gene, BBa_J23116 promoter, Kan <sup>r</sup>	This study
p15A1- <i>aroC2</i>	p15A- <i>aroF<sup>HT</sup></i> - <i>pheA<sup>HT</sup></i> derivative, carrying <i>aroC</i> gene, BBa_J23107 promoter, Kan <sup>r</sup>	This study
p15A1- <i>aroC3</i>	p15A- <i>aroF<sup>HT</sup></i> - <i>pheA<sup>HT</sup></i> derivative, carrying <i>aroC</i> gene, BBa_J23118 promoter, Kan <sup>r</sup>	This study
p15A1- <i>aroL1</i>	p15A- <i>aroF<sup>HT</sup></i> - <i>pheA<sup>HT</sup></i> derivative, carrying <i>aroL</i> gene, BBa_J23116 promoter, Kan <sup>r</sup>	This study
p15A1- <i>aroL2</i>	p15A- <i>aroF<sup>HT</sup></i> - <i>pheA<sup>HT</sup></i> derivative, carrying <i>aroL</i> gene, BBa_J23107 promoter, Kan <sup>r</sup>	This study
p15A1- <i>aroL3</i>	p15A- <i>aroF<sup>HT</sup></i> - <i>pheA<sup>HT</sup></i> derivative, carrying <i>aroL</i> gene, BBa_J23118 promoter, Kan <sup>r</sup>	This study
p15A1- <i>aroA1</i>	p15A- <i>aroF<sup>HT</sup></i> - <i>pheA<sup>HT</sup></i> derivative, carrying <i>aroA</i> gene, BBa_J23116 promoter, Kan <sup>r</sup>	This study
p15A1- <i>aroA2</i>	p15A- <i>aroF<sup>HT</sup></i> - <i>pheA<sup>HT</sup></i> derivative, carrying <i>aroA</i> gene, BBa_J23107 promoter, Kan <sup>r</sup>	This study
p15A1- <i>aroA3</i>	p15A- <i>aroF<sup>HT</sup></i> - <i>pheA<sup>HT</sup></i> derivative, carrying <i>aroA</i> gene, BBa_J23118 promoter, Kan <sup>r</sup>	This study

**Table 1. Strains and plasmids used in this study.** Kan, kanamycin; r, resistance.

pH 7.4). Bound proteins were then eluted with elution buffer (26 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4). The recombinant protein-containing fractions were dialyzed against storage buffer (100 mM Tris-HCl, 5 mM β-mercaptoethanol) in order to remove the imidazole. After purification, the purified enzymes concentrations were determined using the BCA kit. The purified proteins were stored at -80°C until use.

**Fermentation of phenylalanine production strains in a 5L-bioreactor.** A crude enzyme extraction was prepared from the high phenylalanine-producing strain HD-1. After growing 7 hours in a shaking flask of LB, the cells were then inoculated into a 3.5 L fermentation medium in a 5L bioreactor. During the entire fermentation process, the pH was kept at 7.0 with the addition of 25% ammonia water and the temperature was set at 33°C until the OD<sub>600</sub> reached 35 (mid log phase) and then was up-shifted to 38°C to induce the expression of enzymes responsible for L-Phe production<sup>1</sup>. The dissolved oxygen (DO) level was upheld near 40% by adjusting the agitation speed (300–900 rpm) and the aeration rate (2–3 vvm). The glucose concentration was maintained between 0–5 g/l by feeding 800 g/l glucose. The fermentation broth was sampled every two hours to detect phenylalanine concentrations, cell density analysis, and glucose consumption. A sample collected at 32 h was used for the crude enzyme extraction experiment. The cells were harvested by centrifugation for 15 min at 10,000 g at 4°C. For the crude enzyme extract preparation, the cell pellet was washed three times with enzyme assay buffer. Next, the cells were resuspended in lysis buffer (binding buffer containing 1% cocktail). The crude extracts were obtained by sonication of the cell suspension. Cellular debris was removed by centrifugation (30 min, 10,000 g, 4°C) and the supernatant was dialyzed at 4°C. The final crude enzyme extracts were stored at -80°C.

**Proteomics analysis.** The cells for the proteomics analysis were the same as those used for preparation of the cell crude extract. The cells were harvested by centrifugation at 4000 × g for 10 min at 4°C (Eppendorf 5810R, Germany) and resuspended in lysis buffer (Tris-HCl pH 7.6 0.1 M, DTT 0.1 M, cocktail slice/10 mL, obtained from Calbiochem, Inc, Spring Valley, USA). After the cells were broken by sonication cracking on ice, the supernatant was centrifuged at 4000 × g for 10 min at 4°C. The supernatant was then transferred to a new tube and proteins were quantified using the BCA Kit. For digestion, the protein pellet from previous step was washed with UA buffer [8M Urea dissolved in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)] and dissolved in digestion buffer [100 mM TEAB

## Особливості одержання фенілаланіну у *Escherichia coli* xHP3

up-LR and cas-aroK-down-LF +cas-aroK-down-LR (Table S1), respectively. Then, pCas-aroK was obtained by inserting the homologous arms into the pCas-aroK-N20 by Gibson assembly assay. Subsequently, the pCas-aroK plasmid was transformed into electrocompetent cells and then cultivated overnight on lysogeny broth (LB) plates containing 0.2% arabinose. To improve the efficiency of genome editing, colonies that survived on the agar plates were recultivated in LB plates containing 0.2% arabinose. The surviving colonies were then verified by PCR analysis and DNA sequence.

### Real-Time PCR Analysis

Cells that were inoculated in LB shake flask after 37 h were collected by centrifugation at 13,000 g and resuspended in the lysis buffer (China). RNA extraction and cDNA synthesis were carried out according to the manufacturer's instructions (TAKARA, Japan). Real-time PCR was performed with the ABI Prism7000 Sequence Detection System using the SYBR Green PCR Master Mix. The amplification conditions were as follows: 10 min at 95°C, and a two-step cycle at 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec for a total of 45 cycles. All samples were performed in triplicate. The data were normalized using the *dhfB* gene as an internal control (housekeeping gene). All of the primers used in this study are shown in Table S1.

### Fermentation of Phe-Producing Strains in a 7-L Fermenter

A single colony was cultivated in LB medium overnight and inoculated into the seed culture (8 g/l yeast extract, 14 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g/l sodium citrate, 4 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/l glucose, 8 mg/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg/l VB<sub>1</sub>, and 7 g/l  $\text{MgSO}_4$ ) for 7 h at 37°C. Then the cells were inoculated into a 7-L fermenter containing 3.5 L of fermentation culture (20 g/l glucose, 10 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 4 g/l yeast extract, 0.015 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.015 g/l  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , and 250 mg/l Tyr, 1:10 v/v). During batch-phase fermentation, the pH was maintained at 7.0 with 10%  $\text{NH}_4\text{OH}$  solution. The temperature was initially set at 33°C and then increased to 38°C when the  $\text{OD}_{600}$  reached 30. The dissolved oxygen was constantly kept at 20% saturation by cascading the agitation speed and aeration rate. After initial glucose was exhausted, the residual glucose was maintained at 1–5 g/l by supplementing 600 g/l glucose in the fermentation process. Samples were collected every 2 h to determine the  $\text{OD}_{600}$ , the residual glucose and the concentration of Phe.

### HPLC Analysis of Phe Amount in the Fermentation Broth

Phe titers were measured using HPLC with UV detection (Agilent 1260 Series). Samples collected from the shake flasks were centrifuged and the supernatant was then diluted with ddH<sub>2</sub>O. HPLC analysis of Phe was carried out by using Zorbax Eclipse-AAA columns. Derivatization was performed according to the manufacturer's protocol. The mobile phase consists of phase A (40 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.8) and phase B (ACN: MeOH: H<sub>2</sub>O=45:45:10). The column temperature was set at 40°C and the

flow rate was 2 ml/min. All of the experiments were carried out in triplicate.

## Results and Discussion

### Construction of the *tyrP* Promoter Mutants

The expression of TyrP is activated by TyrR in the presence of Phe. This activation requires that the TyrR binds to the two adjacent TyrR boxes separated by one base in the *tyrP* promoter [23]. In addition, the weak box overlaps with the RNA polymerase (RNAP) binding site in the *tyrP* promoter [24]. The activation function requires binding of the TyrR dimer to the strong box while the repression function requires binding of the TyrR dimer to both boxes. Because of the overlap region of the TyrR and RNAP binding sites in the promoter of *tyrP*, we assumed that by altering the bases in the promoter region may disturb the interaction between RNAP, TyrR and *tyrP* promoter. The three-base insertion between the two TyrR boxes has been reported to eliminate repression and enhance the level of activation by TyrR [25]. In addition, we introduced individual or combined converted bases into the -35 region (-38T-A, -37T-A) or -10 region (-15T-G, -13A-T, -12C-A, -11C-A) to alter the dynamic response of the promoter towards Phe [24]. Finally, Andrews *et al.* showed that because of the higher melting of the *tyrP* promoter on supercoiled DNA, it can form a more stable complex with RNAP than the linear promoter, therefore we attempted to insert three A/T bases into the discriminator box to enhance the stability of the complex [25]. According to the above content, we altered the bases in -35 region, -10 region, the discriminator and the number of bases between the two boxes to create promoters that exhibited the different strengths and dynamic behaviors of Phe. Details on base changes in the promoter mutants are presented in Table S2. The schematic diagram of locations of SNP in the different promoter mutants is shown in Fig. 2A. All promoter mutants were separately ligated into the pUC18 harboring *yfp* as a reporter gene. The plasmids were transformed into the *E. coli* DH5 $\alpha$  strain, and YFP fluorescence was detected in the logarithmic phase. Considering the strict regulation of amino acid transport systems in *E. coli*, we applied the dipeptide feeding assay to artificially alter the intracellular Phe level. When added into the medium, the Phe-Phe dipeptides undergo active uptake by the peptide transport systems and are then hydrolyzed by hydrolases, which can sharply improve the intracellular Phe level.

As shown in Fig. 2B, the strengths of the constructed

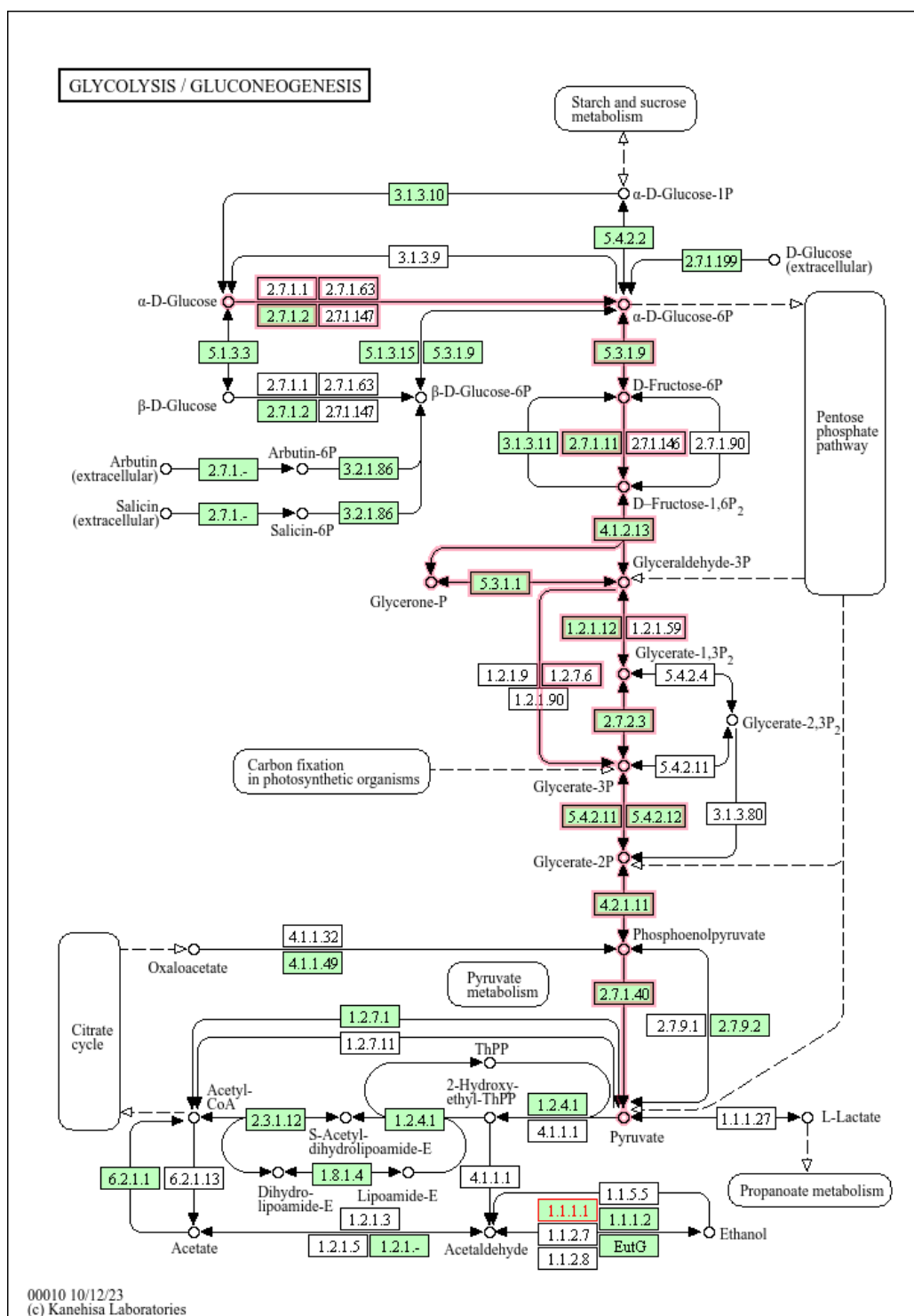
### Гліколіз - *Escherichia coli* K-12 W3110



### Glycolysis / Gluconeogenesis - *Escherichia coli* K-12 W3110

[ [Pathway menu](#) | [Organism menu](#) | [Pathway entry](#) | [Show description](#) | [Download](#) | [Help](#) ]

Change pathway type



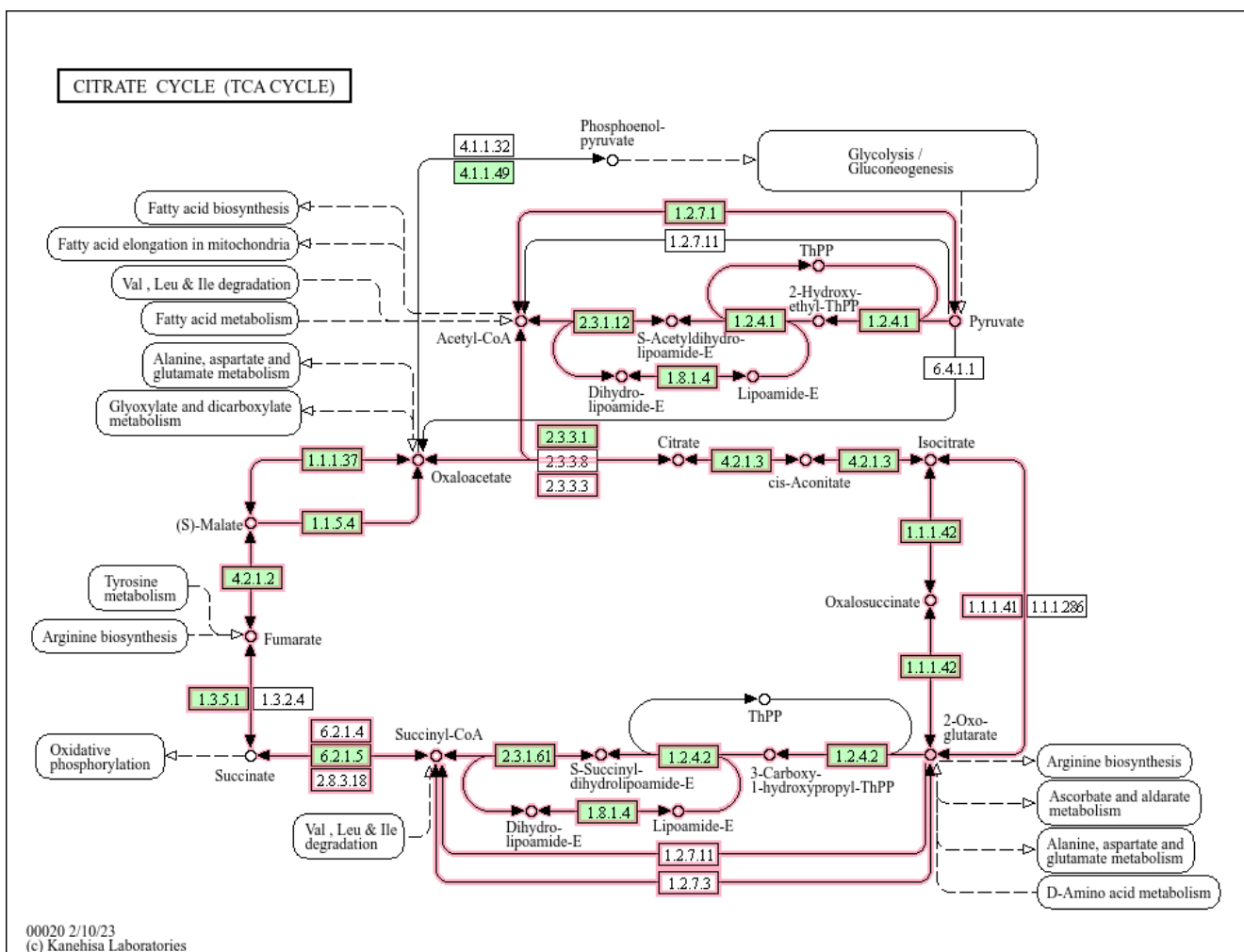
Цикл трикарбонових кислот - *Escherichia coli* K-12 W3110



Citrate cycle (TCA cycle) - *Escherichia coli* K-12 W3110

[ [Pathway menu](#) | [Organism menu](#) | [Pathway entry](#) | [Show description](#) | [Download](#) | [Help](#) ]

Change pathway type



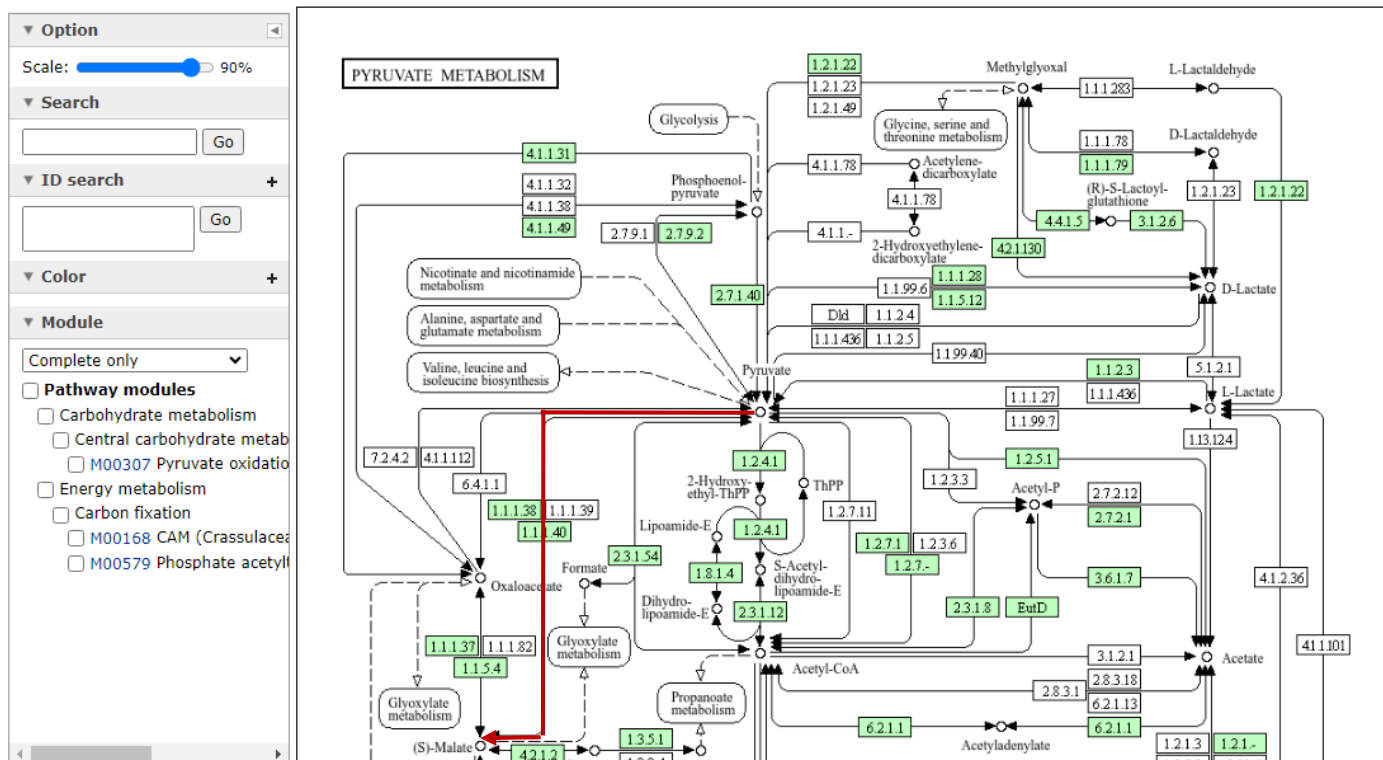
Метаболізм пірувату - *Escherichia coli* K-12 W3110



Pyruvate metabolism - *Escherichia coli* K-12 W3110

[ Pathway menu | Organism menu | Pathway entry | Download | Help ]

Change pathway type



## Біосинтез ароматичних амінокислот - *Escherichia coli* K-12 W3110



Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis - *Escherichia coli* K-12 W3110

[ Pathway menu | Organism menu | Pathway entry | Download | Help ]

Change pathway type

