

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

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

«__» _____ 2020 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2020 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Біосинтез лізину *Brevibacterium flavum*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

Гавриленко Ярослава Володимирівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Слободян Ольга Петрівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

Рецензент Тимчук А.В.
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Гавриленко Ярославів Володимирівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез лізину *Brevibacterium flavum*

керівник роботи Слободян О.П., доцент, к.т.н.

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи $K_i = 1,1$; $K_z = 0,6$; $K_{na} = 0,61$; $K_{zi} = 0,54-0,68$; $K_{z\bar{o}} = 0,8$;
Brevibacterium flavum; лізин

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Обґрунтування вибору біологічного агенту, техніко-економічне обґрунтування, параметри культивування біологічного агенту, обґрунтування способу виділення цільового продукту, точки контролю виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратна схема (2 листа А 1); технологічна схема (2 листа А1); ділянка автоматизації (1 лист А3); схема біосинтезу ростового субстрату (1 лист А3).

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	12.05.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	20.03.2020	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	25.03.2020	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	01.04.2020	
4.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	05.04.2020	
5.	Біосинтез цільового продукту	12.04.2020	
6.	Апаратурна схема	20.04.2020	
7.	Технологічна схема	20.04.2020	
8.	Специфікація обладнання	26.04.2020	
9.	Матеріальний баланс	25.04.2020	
10.	Опис технологічної схеми	10.05.2020	
11.	Контроль виробництва	10.05.2020	
12.	Автоматизація ділянки виробництва	12.05.2020	
13.	Список використаної літератури	20.05.2020	
14.	Вступ. Реферат. Зміст	20.05.2020	

Здобувач

(підпис)

Гавриленко Я.В.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

(підпис)

Слободян О.П.

(прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІЗИНУ.....	6
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	9
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	9
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	18
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	19
РОЗДІЛ 3.ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.	20
3.1. Потреба в цільовому продукті	20
3.2. Розрахунок потужності виробництва	22
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	24
3.4. Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів).....	25
3.5. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	26
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЛІЗИНУ.....	30
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	30
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	32
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	34
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	34
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	43
РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ	59
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	95
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	98
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	120

9.1. Карта контрольних точок виробництва.....	120
9.2. Мікробіологічний контроль.....	126
9.3. Показники росту і синтезу лізину	127
РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	134
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	142
ГРАФІЧНА ЧАСТИНА	
ДОДАТКИ	

РЕФЕРАТ

Проект присвячено вивченню процесу біосинтезу та виробництву сухого кормового концентрату лізину, продуцентом якого є ауксотроф *Brevibacterium flavum* Н 90, який синтезується при рості на середовищі з м'ясою в кількості 102 г/л. Лізин – незамінна амінокислота, яка не синтезується в організмах людини та тварин. Розрахована потужність виробництва складає 411 м³ культуральної рідини за цикл.

Основними положеннями в даній роботі є вибір та характеристика біологічного агента - продуцента лізину, характеристика кінцевої продукції виробництва, процес біосинтезу та виділення, даний етап включає в себе допоміжні роботи (приготування мийних засобів, підготовка повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, піногасника, підживлюючого розчину м'яси та ін.) та основні процеси (виращування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу, стабілізація культуральної рідини, концентрування, сушіння), підбір обладнання для ферментаційних та після ферментаційних процесів.

Складається зі вступу, десяти розділів, графічних матеріалів (апаратурної та технологічної схем формату А1, схема біосинтезу формату А3 та схема автоматизації формату А3) та списку використаної літератури (79 джерел).

Дипломний проект викладений на 150 сторінках друкованого тексту, містить 27 таблиць, 17 рисунків.

Ключові слова: *Brevibacterium flavum* Н 90, лізин, незамінна амінокислота, кормовий концентрат, поживні середовища, біосинтез, культуральна рідина, виділення, концентрування, стабілізація, сушіння.

ВСТУП

Амінокислоти – похідні карбонових кислот, що мають одну чи кілька аміногруп, життєвоважливі азотовмісні речовини в живій клітині. Всі амінокислоти за винятком гліцину, оптично активні та можуть існувати у двох ізомерних формах [1]. Незамінні амінокислоти не синтезуються в організмах людини та вищих тварин і повинні надходити в організм з продуктами харчування. Для організму людини та більшості тварин незамінними є валін, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан і гістидин. Незамінні амінокислоти повинні бути присутніми в їжі для підтримки необхідного азотистого балансу в організмах людини та тварин. Оскільки нестача незамінних амінокислот в організмі призводить до порушень обміну речовин, зупинки росту, зниження маси тіла[2].

Існує декілька способів промислового отримання незамінних амінокислот: хімічний синтез, мікробіологічний синтез, гідроліз білків рослинного і мікробного походження [3]. Понад 70% усіх промислово виготовлених амінокислот отримують шляхом мікробіологічного синтезу. На другому місці за обсягом виробництва знаходиться хімічний синтез. Основним недоліком хімічного синтезу є отримання суміші амінокислот, що складаються з ізомерів D- і L-ряду, тоді як біологічно активні в організмі людини і тварин володіють лише L-ізомери [3]. Технології одержання амінокислот за рахунок гідролізу білків економічно менш вигідні, тому не отримали широкого розповсюдження [4]. При мікробіологічному синтезі утворюються L-форми амінокислот, що є продуктами життєдіяльності спеціально підібраних і відселекціонованих штамів мікроорганізмів, які здатні накопичувати в культуральній рідині необхідну кількість амінокислоти [5]. Звичайні мікроорганізми не здатні синтезувати необхідні амінокислоти в потрібній кількості, тому використовують мутантні штами мікроорганізмів, отримані за допомогою хімічних і фізичних мутагенів [3].

Актуальність роботи. Нині найбільше біотехнологічних розробок присвячено мікробіологічному синтезу лізину [6].

За вартістю продукції мікробіологічне виробництво амінокислот поступається тільки виробництву антибіотиків проте займає перше місце в світі за тоннажем [7]. Амінокислоти забезпечують потреби сільського господарства, харчової промисловості та медицини, зростання виробництва лізину складає близько 10% на рік [8]. В Україні виробництво лізину відсутнє.

Для створення продуктивної промислової технології виробництва лізину з максимальним накопиченням кінцевого продукту потрібно мати високопродуктивні штами-продуценти, знайти оптимальні умови культивування і використовувати дешеві субстрати [3]. Окрім цих чинників, накопичення незамінних амінокислот можна також збільшити, змінивши метаболічні шляхи синтезу [3].

Новизною є використання штаму *Brevibacterium flavum* Н 90, який є продуцентом незамінної амінокислоти лізин. Даний штам за 72 годин ферментації на середовищі з м'ясом накопичує до 102 г/л лізину.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІЗИНУ

Лізин (2,6-діаміногексанова кислота) – аліфатична амінокислота з вираженими властивостями основи [9]. Природний L-лізин ($t_{пл}$ 224-225 ° С, з розкладанням) добре розчинний у воді, кислотах і основах, погано - в спирті. Хімічна формула: $C_6H_{14}N_2O_2$, молекулярна маса – 146,19 г/моль [10].

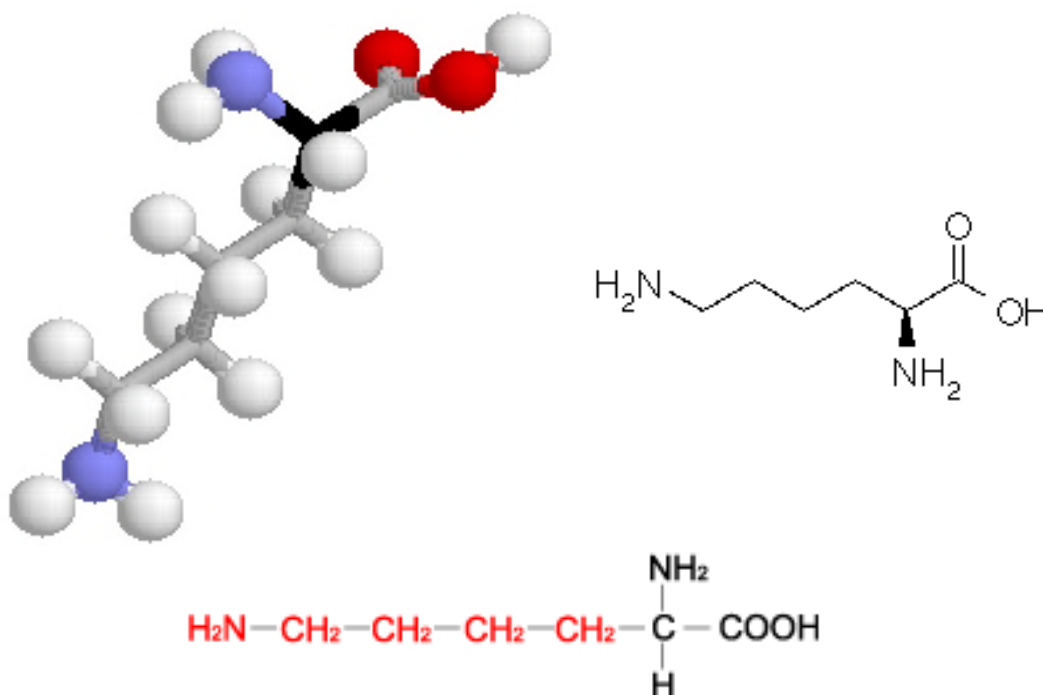


Рис. 1.1 Структурна формула лізину [11]

Біологічну активність в організмі людини і тварин має лише L-форма амінокислот. D-форма біологічно не активна і може бути токсична [12].

Лізин був виділений в 1889 р. з гідролізату казеїну німецьким хіміком та фізіологом Едмундом Дрекелем. Він вважав, що лізин представляє собою діамін; правильна структура лізину була встановлена в 1902 р. німецькими хіміком Германом Емілем Фішером і біохіміком Фріцем Вейгертом, які синтезували лізин та показали, що синтезований продукт ідентичний рацемізованому природному матеріалу [13].

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІЗИНУ 6			Літ.	Арк.	Акрушіє
Розроб.	Гавриленко Я.В.									
Перевір.	Слободян О.П.								6	4
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.	Пирог Т.П.									

Лізин бере участь в утилізації жирних кислот, необхідних для виробництва енергії і каталізує процеси ферментативних перетворень. У процесах ферментації α -аміногрупа радикала лізину здійснює прикріплення субстрату, що піддається ферментативному перетворенню, до ферменту. Лізин входить до складу нуклеопептидів, є проміжним продуктом у синтезі білка. В якості діамінокислоти входить до складу білків рибосом і глюкагону-пептиду – гормону, що синтезується в клітинах островкової частини підшлункової залози. L-форма лізину знижує вміст тригліцеридів у сироватці крові. Лізин сприяє абсорбції кальцію, підтримує баланс азоту в дорослому організмі, сприяє утворенню колагену і відновленню тканин та бере участь в синтезі алкалоїду аналогічного нікотину [14].

Дефіцит лізину викликає у людей різні хворобливі прояви – головний біль, запаморочення, підвищену чутливість до шуму, зниження апетиту, нудоту, блювоту, ферментні порушення, анемію, лейкомію, виснаження, порушення репродуктивної функції. Недостатність лізину може проявлятися в почервонінні очей, випадінні волосся, нездатності до концентрації, дратівливості, нестачі енергії, уповільненні зростання. При спостереженні за особами, які не отримували в раціонах достатньої кількості лізину, відзначались порушення азотистої рівноваги, виснаження м'язів, порушення кальцифікації кісток, а також ряд змін у печінці і легенях. Лізин знижує підвищений рівень тригліцеридів у сироватці крові, підсилює імунітет до вірусних інфекцій. Слід зазначити здатність лізину зменшувати ймовірність і або попереджати герпесну інфекцію. Завдяки вищезазначеному, лізин входить в тріаду амінокислот, які особливо враховуються при визначенні загальної повноцінності харчування (лізин, триптофан, метіонін) [15].

До натуральних продуктів – джерел лізину належить риба, молоко, боби, м'ясо, сир, дріжджі, яйця, соєві продукти, взагалі, всі багаті білком продукти. Лізин міститься також в авокадо, арахісі, креветках, помідорах, картоплі, червоному вині [16].

Незбалансованість харчування (що пояснюється, в першу чергу, економічними проблемами), недостатня кількість лізину в зернових продуктах і порівняно висока потреба організму в ньому вимагають введення лізину до раціону багатьох верств населення.

Лізин зареєстрований як харчова добавка для використання в рецептурах комплексних "здорових" продуктів харчування із збалансованим складом амінокислот та комбінованих харчових продуктів для спортсменів і шахтарів.

В організмі птахів і тварин лізин практично не синтезується. Нестача лізину в організмі птахів і тварин (найбільш дефіцитний у раціонах свиней і птиці) викликає різке падіння приросту ваги, погіршення загального стану тварини на тлі падіння імунітету, проявляються ознаки анемії й загального виснаження (особливо у поросят) [17]. Додавання лізину до норми в раціони дозволяє усунути вищевказані симптоми. Природними джерелами лізину, який надходить в організм птахів і тварин є кормові суміші, в основному, рослинного походження. Синтезований лізин застосовують для збагачення кормів і харчових продуктів [18 – 20]. Добавка лізину в невеликій кількості до кормів значно збільшує продуктивність домашніх тварин [21, 22]. Однією з кормових добавок, яка містить значну кількість лізину є ліпрот (суміш лізину і протеїну), використання якого в складі раціонів дає змогу збільшити приріст маси тварин на 25-30%, а також підвищити стійкість до захворювань та знизити витрати кормів на одиницю продукції [23, 24].

Зазвичай це кристалічний порошок або гранули (*Рис.1.1*) білого, або світлокоричневого кольору.



Рис.1.2 Кінцевий продукт біосинтезу[12]

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Лізин відноситься до групи незамінних амінокислот, які використовуються у харчовій промисловості як підсилювачі смаку і ароматизатори, антиоксиданти і харчові добавки, у сільському господарстві – як кормові добавки, у медицині – для терапії післяопераційних хворих, у хімічній промисловості – як вихідні речовини для синтезу полімерів і виробництва косметичних засобів [12].

Амінокислоти мають велике значення для збалансованого білкового харчування. Деякі харчові та кормові продукти не містять у своєму складі необхідної кількості незамінних амінокислот, зокрема лізину. Для ліквідації такого дисбалансу незамінні амінокислоти використовують у чистому вигляді або в якості кормових добавок [26].

У промисловому масштабі амінокислоти одержують або екстракцією з білкових гідролізатів або хімічним синтезом, або мікробіологічним синтезом.

Найбільш перспективний і економічно вигідний спосіб одержання амінокислот – це мікробіологічний синтез. Обсяги виробництва амінокислот у світі перевищують декілька мільйонів тон на рік [24], при цьому шляхом мікробіологічного синтезу отримують більше 70%. Головна перевага даного способу полягає в можливості отримання амінокислот на основі поновлюваної сировини. Мікробіологічним способом лізин одержують в Японії (Ajinomoto Co, Kyowa Hokko), США (ADM, хіміко-мікробіологічний спосіб), Німеччині (Degussa-Huels, BASF), Нідерландах, Великобританії, Китаї, Індонезії.

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТУ			Літ.	Арк.	Акрушіє	
Розроб.		Гавриленко Я.В.									
Перевір.		Слободян О.П.								9	72
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

Промислове виробництво амінокислот стало можливим після відкриття здатності деяких мікроорганізмів виділяти в культуральне середовище значні кількості даної амінокислоти. Найчастіше для мікробіологічного синтезу амінокислот використовують ауксотрофні мутантні штами, які отримують методами звичайної селекції або генної інженерії. Це штами, що належать до роду *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*.

Для культивування штамів мікроорганізмів при виробництві амінокислот як джерела вуглецю використовують найбільш доступні вуглеводи – глюкозу, сахарозу, рідше – фруктозу і мальтозу. Для зниження вартості поживного середовища в якості джерел вуглецю використовують і вторинну сировину – бурякову мелясу, молочну сироватку, гідролізати крохмалю, сульфідні луги. В якості джерел азоту використовують сечовину, солі амонію (сульфати і фосфати). Для успішного росту мікроорганізми потребують стимуляторів росту, в якості яких виступають кукурудзяні та дріжджові екстракти, солодові паростки, гідролізати висівки і дріжджів, вітаміни групи В. У поживне середовище додають деякі макро- та мікроелементи: Р, Са, Mg, Mn, Fe та ін. На процеси біосинтезу істотно впливає аерація. Мікробіологічний спосіб отримання амінокислот заснований на здатності мікроорганізмів синтезувати всі L-амінокислоти, а в певних умовах – забезпечувати їх «надсинтез» [11, 25].

Отримують лізин мікробіологічним синтезом, оскільки в ньому мало стадій і використовується універсальне обладнання. З іншого боку, мікроорганізми чутливі до найменшої зміни умов культивування і за звичайних умов концентрація цільового продукту не висока, тому необхідно постійно витримувати оптимальні технологічні параметри ферментації і збільшувати робочі об'єми реакторів. Даний спосіб одержання амінокислот, зумовлений перш за все тим, що мікроорганізми утворюють амінокислоти в біологічно активній L-формі [27].

Приклади біологічних агентів лізину наведені в порівняльних *таблицях 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3.*

Порівняльна характеристика продуцентів лізину

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу	Література
<i>Brevibacterium flavum</i> 90 Н (м'яса)	М'яса - 140 Гідролізат кормових дріжджів - 55 Кукурудз.,екстракт - 20 NH_4Cl - 10 $(NH_4)_2HPO_4$ - 1 L-лейцин - 2 Біотин - 0,00025 Тіамін - 0,00025	102	72	перемішування 500 об/хв t=32 pH=7	[29]
<i>Brevibacterium flavum</i> 90 Н (глюкоза)	Глюкоза - 80 Гідролізат соєвого шроту - 60 Кукурудз.,екстракт - 20 KH_2PO_4 - 0,75 $MgSO_4$ - 0,25 K_2HPO_4 - 2,25 L-лейцин - 3 Біотин - 0,00025 Тіамін - 0,00025	120	85	перемішування 500 об/хв t=32 pH=7	[29]

<i>Brevibacterium flavum</i> ВКПМ В-11404	Глюкоза - 310 (NH_4) ₂ SO ₄ - 55 Пшеничний глютен - 45 KH ₂ PO ₄ - 9 MgSO ₄ * 7H ₂ O - 3,2 FeSO ₄ * 7H ₂ O - 0,045 MnSO ₄ * 5H ₂ O - 0,045 Біотин - 0,00045 Тіамін - 0,00045	150	70	перемішування 900 об/хв t=32 pH=7	[30]
<i>Brevibacterium flavum</i> Е-531	М'яса - 125 Кукурудз.,екстракт - 25 NH ₄ Cl - 13 (NH ₄) ₂ HPO ₄ - 1	60	54	перемішування 600 об/хв t=30 pH=7	[28]

За результатами таблиці 2.1.1 можна зробити висновок про те, що штам *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404 має більший потенціал для використання, в порівнянні з іншими штамми. Оскільки має високу здатність до синтезу лізину, а також в складі поживного середовища є достатня кількість вуглецю, чим зумовлений надсинтез лізину. Окрім вуглецю поживне середовище містить також додаткові стимулятори росту (пшеничний глютен та вітаміни групи В) і макро- та мікроелементи: Mg, Mn, Fe.

Також важливе значення при виборі продуцента має склад поживного середовища для його культивування. Саме тому перед початком виробництва будь-яких препаратів (в тому числі й лізину) необхідно проводити оптимізацію поживного середовища, намагатися досягнути найменшої вартості компонентів середовища, тощо. Адже економічний аспект на виробництві має великий вплив як на собівартість продукту, так і на дохід від його реалізації.

Для культивування штамів *Brevibacterium flavum* 90 Н (на мелясі), *Brevibacterium flavum* 90 Н (на глюкозі), *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404 та *Brevibacterium flavum* Е-531 використовують середовища, які містять глюкозу, мелясу та інші вуглецеві субстрати, фосфатні солі, додаткові стимулятори росту (вітаміни групи В, кукурудзяні та дріжджові екстракти, гідролізати висівків і дріжджів). Середовища, що містять такі субстрати зумовлюють надсинтез лізину. Для того щоб впевнитись в економічній доцільності обраного штаму *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404 необхідно знати вартість поживного середовища. Тому в таблиці 2.1.2 наведено вартість всіх поживних середовищ.

Таблиця 2.1.2

Вартість поживного середовища продуцентів лізину

Біологічний агент	Компоненти поживного середовища	Вміст компонентів, г/л	Ціна компонентів, грн/кг	Вартість компонентів (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Brevibacterium flavum</i> 90 Н	Меляса	140	1	0,14	1
	Гідролізат кормових дріжджів	55	15,5	0,85	2
	Кукурудз.,екстракт	20	2,2	0,044	3
	NH_4Cl	10	54	0,54	4
	$(NH_4)_2HPO_4$	1	16	0,016	5
	L-лейцин	0,2	800	0,16	6
	Тіамін	0,00025	1950	0,001	7
	Біотин	0,00025	6352,53	0,002	8
Вартість 1 л середовища – 1,75 грн					
<i>Brevibacterium flavum</i> 90 Н	Глюкоза	80	30	2,4	9
	Гідролізат соєвого шроту	60	8,6	0,52	10
	Кукурудз., екст.	20	2,2	0,044	3
	KH_2PO_4	0,75	50	0,04	11
	$MgSO_4$	0,25	7,5	0,002	12
	K_2HPO_4	2,25	48	0,11	13
	L-лейцин	0,3	800	0,24	6
	Тіамін	0,00025	1950	0,001	8
	Біотин	0,00025	6352,53	0,002	9
Вартість 1 л середовища – 3,36 грн					
<i>Brevibacterium flavum</i> ВКІМ В-11404	Глюкоза	310	30	9,3	9
	$(NH_4)_2SO_4$	55	5,4	0,3	14
	Пшеничний глютен	45	87	3,92	15
	KH_2PO_4	9	50	1,62	11
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,2	8,4	0,45	16
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,045	20	0,001	17
	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0,045	20	0,001	18

	Біотин	0,00045	6352,53	0,003	7
	Тіамін	0,00045	1950	0,001	8
Вартість 1 л середовища – 15,6 грн					
<i>Brevibacterium flavum</i> <i>E-531</i>	Меляса	125	1	0,13	1
	Кукурудз., екст.	25	2,2	0,1	3
	NH_4Cl	13	54	0,7	4
	$(NH_4)_2HPO_4$	1	16	0,02	5
Вартість 1 л середовища – 0,95 грн					

Примітка* Ціни наведено станом на травень 2020 р.

1. <https://zgurovka.flagma.ua/melyasa-o4262345.html>
2. <https://prom.ua/ua/p496263567-drozhzhi-kormovye-protein.html>
3. <https://agroserver.ru/b/ekstrakt-kukuruznyy-1047485.htm>
4. <https://prom.ua/ua/p756844734-ammonij-hloristyj.html>
5. <https://ternopol.flagma.ua/uk/ammofos-o8661831.html>
6. <https://prom.ua/ua/p626808585-lejtsin.html>
7. <https://xn----utbcjbgv0e.com.ua/biotin-vitamin-b7-1-kg.html>
8. <https://kiev.flagma.ua/uk/vitamin-b1-tiamin-o8396224.html>
9. <https://prom.ua/ua/p222558724-glyukoza-farm;wholesale.html>
10. <https://prom.ua/ua/p81941288-soevyj-shrot;wholesale.html>
11. <https://prom.ua/ua/p191061242-monofosfat-kaliya-digidrofosfat;wholesale.html>
12. <https://prom.ua/ua/p97141550-sulfat-magniya;wholesale.html>
13. <https://prom.ua/ua/p1059878726-kaliya-fosfat-odnozameschennyj;wholesale.html>
14. <https://prom.ua/ua/p979935793-sulfat-ammoniya-granulirovannyj;wholesale.html>
15. <https://prom.ua/ua/p272588372-glyuten-pshenichnyj-pshenichnaya.html>
16. <https://prom.ua/ua/p1098933594-sulfat-magniyu-granulovaniy;wholesale.html>
17. <https://prom.ua/ua/p610003424-zhelezo-ternokisloe-zheleznyj.html>
18. <https://prom.ua/ua/p221231380-sulfat-margantsa-pischevoj;wholesale.html>

Згідно даних таблиці 2.1.2 можна зробити висновок, що вартість 1л середовища для культивування штаму *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404 досить сильно відрізняється, від штамів *Brevibacterium flavum* 90 Н (на мелясі), *Brevibacterium flavum* 90 Н (на глюкозі) та *Brevibacterium flavum* Е-531. Оскільки є найдорожчим поживним середовищем, використання штаму *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404 є економічно недоцільним. Тому серед запропонованих біологічних агентів економічно доцільно використовувати штам *Brevibacterium flavum* 90 Н (на мелясі) концентрація лізину складає 102 г/л, що є оптимальним для синтезу лізину.

Для того аби впевнитись у виборі біологічного агенту варто порівняти концентрацію цільового продукту синтезу за 1 год, умовну вартість 1 г цільового продукту та дані які були наведені в таблицях 2.1.1, 2.1.2. Узагальнені дані наведені в таблиці 2.1.3.

Таблиця 2.1.3

Узагальнююча таблиця

Біологічний агент	Вартість 1л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, г/л	Умовна вартість 1г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту синтезу за год, г/л
<i>Brevibacterium flavum</i> 90 Н (м'яса)	1,75	102	0,002	72	0,71
<i>Brevibacterium flavum</i> 90 Н (глюкоза)	3,36	120	0,0034	85	0,71
<i>Brevibacterium flavum</i> ВКІМ В-11404	15,6	150	0,016	70	0,47
<i>Brevibacterium flavum</i> E-531	0,95	60	0,001	54	1,11

Аналізуючи *таблицю 2.1.3*, можна зробити висновок про те, що перспективним штамом для виробництва лізину є штамм *Brevibacterium flavum* 90 Н (на мелясі), за рахунок оптимального синтезу цільового продукту 102 г/л, за короткий проміжок часу 72 год, та за дешеве поживне середовище 1,75 грн за 1 л. Але варто враховувати те, що виробництво потребує значних затрат електроенергії та інших ресурсів.

Загальний висновок такий, необхідно й надалі вдосконалювати технологію лізину, звертаючи увагу на енергетичний та економічний аспект.

2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

Brevibacterium flavum 90 Н (на мелясі)

Морфолого-культуральні ознаки: клітини овальні, часто розташовані під кутом, паличковидні, розміром 0,6-2,0 х 0,2-1,0 мкм (*Рис. 2.2.1*), нерухомі, аспорогенні, грам та каталазо позитивні. Паличковидні клітини з часом можуть вкорочувалися до кокковидних. При фарбуванні клітин метиленовим синім проявляють метахроматичні гранули[31].

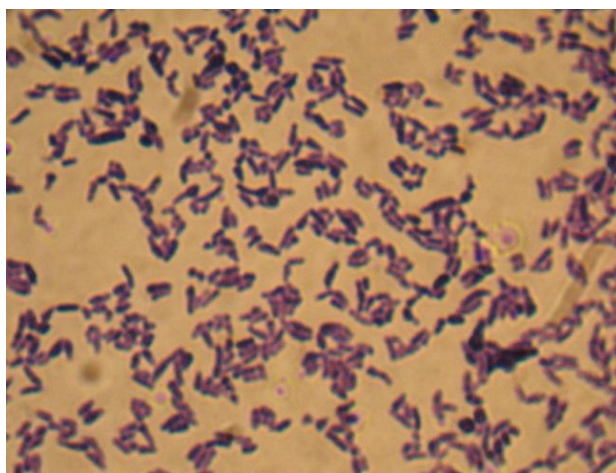


Рис. 2.2.1 Клітини мутантного штаму *Brevibacterium flavum* 90 Н на середовищі МПА (збільшення 90х) [31].

Фізіолого-біохімічні ознаки: мутантний штам *Brevibacterium flavum* 90 Н – аероб, не розріджує желатину, засвоює азот у формі амонійних солей та сечовини і не засвоює нітратний азот. Гетеротроф. Для росту на мінімальному середовищі має потребу у біотині, тіаміні, L – лейцині. Стійкий до аналогу лізину – S-(2-аміноетил)-цистеїну.

Ріст штаму відбувається в діапазоні температур від 24 до 42 С⁰, оптимальна температура 32±1С⁰.

Ріст штаму відбувається на середовищах з рН від 6,0 до 8,0, оптимальним значенням рН 6,8 – 7,2.

Спосіб одержання штаму: мутагенез та ступінчата селекція[31].

Мутантний штам *Brevibacterium flavum* 90 Н (на мелясі) використовують для надсинтезу лізину 100-200 г/л.

2.3 Таксономічний статус біологічного агента за філогенетичною класифікацією

Відділ *Actinobacteria*

Клас *Actinobacteria*

Підклас *Actinobacteridae*

Порядок *Actinomycetales*

Підпорядок *Micrococcales*

Родина *Brevibacteriaceae*

Рід *Brevibacterium*.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Повноцінна протеїнова годівля в організації годівлі молодняку та відтворювального поголів'я всіх видів сільгосптварин відіграє виключно важливу роль. Потреба тварин у білку характеризується кількістю біологічно повноцінного та доступного для засвоєння протеїну, що підтримує на високому рівні відтворювальні функції, синтез білків молока, а також добре здоров'я й високу резистентність організму[32].

Тварини будь-якого віку особливо чутливі до браку протеїну в раціоні. Проте для них важливий не стільки рівень протеїну, скільки його якості, що залежить від амінокислотного складу. Отже, організм тварини потребує не білок як такий, а відповідну кількість амінокислот у збалансованому співвідношенні[33].

Амінокислоти поділяють на дві основні групи — замінні та незамінні (такі, що не синтезуються в організмі). Незамінні амінокислоти мають постачатися з кормом. До незамінних належать 10 амінокислот: лізин, метіонін, треонін, триптофан, валін, аргінін, гістидин, лейцин, ізолейцин, фенілаланін. Проте вкрай дефіцитними серед усіх є лізин і метіонін[34].

Лізин потрібен для синтезу важливих білків (нуклеопротейдів), регулювання азотистого обміну й нормального росту тварини. Характерна особливість лізину — повільне й неповне всмоктування його з кишківника. За браку лізину знижується ріст молодняку, а відповідно, і його продуктивність, зменшується кількість еритроцитів у крові та рівень гемоглобіну, знижується засвоєння кальцію з корму, змінюються пропорції, маса й розміри органів. Надлишок лізину, що пов'язаний із превалюванням у раціоні тваринних кормів, також небажаний, адже він чинить токсичну дію й таким чином подавляє інтенсивність росту.

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ			Літ.	Арк.	Акрушіє	
Розроб.		Гавриленко Я.В.									
Перевір.		Слободян О.П.								20	1200
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

У сучасних умовах, за дефіциту тваринного білка, нестачу лізину компенсують за рахунок добавок синтетичних препаратів (L-лізин монохлорид, L-лізин сульфат, ліпрот), в яких уміст чистого лізину становить 50–78%[35].

Зокрема, L-лізин монохлорид 98,5% (78,8% чистого лізину) сприяє пришвидшенню росту тварин і зміцненню імунітету, покращує якість м'яса та засвоєння протеїну корму[35].

L-лізин сульфат 65% і L-лізин сульфат 53% збільшують утилізацію кормів, економлять ресурси протеїну; як кормові амінокислоти, особливо в комбінації з треоніном, суттєво посилюють властивості корму та забезпечують тваринам більш повноцінну годівлю, підвищує якість м'яса, знижують вміст азоту в екскрементах тварин і концентрацію аміаку в приміщеннях[36].

Ліпрот - є комплексною лізин протеїновою кормовою добавкою, до складу якої входять різні біологічно активні сполуки: амінокислоти, білки корисних мікроорганізмів та рослин, вітаміни групи В, макро- і мікроелементи. Завдяки такому складу ліпрот має 100% перетравлюваність[37].

Відповідно до сучасних підходів у годівлі нові вимоги до поживності раціонів часто змінюються щодо потреби в амінокислотах. Отже, для ефективного використання кормів, які б задовольняли потребу тварин сучасних порід у незамінних амінокислотах, треба знати рівень умісту їх у комбікормах у різні періоди росту[38].

Добова потреба поросят у лізині залежить від живої маси та віку свині вагою до 40-50кг - 13г, 50-60 кг – 14,5г, понад 60-70кг – 15,7г, 70-80кг – 15г, 80-90кг – 16,5г, 90-100кг – 18,1г, 100-120кг – 18,9г. Оскільки вагові категорії свиней значно різняться розрахунок буде здійснений згідно середнім показникам які складають 70кг – 16г лізину [39].

Період відгодівлі свиней становить від 190 до 365 діб в залежності від породи свині та схеми вирощування поросят. Для навчального проекту

розрахуємо кількість лізину, яку будемо виготовляти локально для Київської області. В Київській області утримується близько 527,7 тис. голів свиней (див.табл.3.3.1) [40].

Таблиця 3.3.1

Потреба поголів'я свиней у лізині

Адміністративно-територіальна одиниця (область)	Поголів'я свиней, тис.голів	Потреба в лізині, кг/добу
Київська	527,7	8443,2
Донецька	459,4	7350,4
Львівська	447,2	7155,2
Тернопільська	359,1	5745,6
Дніпропетровська	351,5	5624
Черкаська	350,0	5600
Івано-Франківська	325,0	5200
Полтавська	324,5	5192
Хмельницька	322,9	5166,4
Закарпатська	283,6	4537,7
Волинська	279,9	4478,4
Вінницька	250,5	4008
Рівненська	232,9	3726,4
Запорізька	225,7	3611,2
Кіровоградська	221,2	3539,2
Харківська	191,3	3060,8
Чернігівська	190,2	3043,2
Одеська	177,5	2840
Чернівецька	154,2	2467,2
Житомирська	138,9	2222,4
Сумська	113,8	1820,8
Херсонська	109,7	1755,2
Миколаївська	82,7	1323,2
Луганська	48,6	777,6
Всього	6168	98688

3.2 Розрахунок потужності виробництва

На жаль, в Україні виробництво лізину відсутнє. Особливістю українського ринку амінокислот є його імпортозалежність. Обсяг попиту на лізин в Україні у 2017 становив майже 32,9 млн. кг кормових амінокислот, що на 56,8% менше ніж у 2016. Головним чином, зменшення відбулося за

рахунок спаду імпорту лізину майже втричі. Головним імпортером амінокислот в Україні є Китай (83,0% від загального обсягу) [41].



Рис.3.3.1 Імпорт лізину до України [41].

Серед іноземних компаній найбільша частка імпорту в Україну належить китайським виробникам (рис.1. 2). На сьогодні за обсягом лідирує компанія *Hua Xing Enterprises LTD*, яка обіймає 83% ринку, а також такі провідні компанії, як *Bio-Chem Technology (HK) LTD*; *Langfang Meihua Bio-Technology Co., Ltd*; *Ningxia Eppen Biotech Co., Ltd*. Зокрема, компанія *Ningxia Eppen Biotech Co., Ltd* входить до п'ятірки світових лідерів із виробництва амінокислот і до трійки лідерів у КНР. Як відомо, основним джерелом отримання лізину в Китаї є кукурудзяний білок[41].

Найбільшим постачальником лізину з Індонезії є компанія *Cheil Jedang*, що обіймає частку імпорту в розмірі 0,2%.

Країна-відправник амінокислот у 2017р.		
Продукт	Вага, кг	ПВ, %
Китай	27 275 070	83,0%
Німеччина	2 894 600	8,8%
Польща	798 550	2,4%
Угорщина	518 000	1,6%
РФ	380 000	1,2%
Франція	331 750	1,0%
Нідерланди	309 200	0,9%
Малайзія	106 000	0,3%
Республіка Корея	102 000	0,3%
Бельгія	84 000	0,3%
Індонезія	52 000	0,2%
ВСЬОГО	32 851 170	

Рис.3.3.2 Країна-імпортер лізину до України [41].

Серед європейських виробників лізину лідирують французька компанія *Ajinomoto Eurolysine S.A.S* і голландська *ADM Special Ingredients EUROPE B.V.* Проте за рівнем ціни європейські виробники не можуть конкурувати з китайськими, тоді як останні не поступаються якістю своїм європейським колегам. Для гарантії стабільної якості та подолання стереотипу «китайського виробника» українські компанії — імпортери лізину навіть відряджають своїх представників на виробництво в КНР[41].

Україна повинна розробити своє виробництво лізину для створення дешевих аналогів закордонних амінокислот. Тому потужність виробництва буде дорівнює потребі.

Розраховуємо потужність виробництва:

В Київській області налічується близько 527,7 тис., голів свиней. Добова потреба для однієї свині становить 16 г/добу. Для забезпечення їх лізином потрібно підприємство з виробництва лізину потужністю 8443,2 кг/добу. Відповідно потужність виробництва складає 1605 т/рік.

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення амінокислотного ринку України необхідно отримувати $8443,2 \times 190 = 1605$ т/рік.

Дана амінокислота виробляється за допомогою культивування ауксотрофних мутантів роду *Brevibacterium*, знаючи синтезувальну здатність продуцента, можемо розрахувати кількість культуральної рідини, яку необхідно одержати, щоб забезпечити потребу Київської області амінокислотою.

За умовами замовника цю кількість амінокислоти потрібно виробити за $T_{рд} = 220$ днів. За літературними даними максимальний синтез амінокислоти (102 г/л за 72 год) досягається за умов росту штаму *Brevibacterium flavum* 90 Н на середовищі такого складу (г/л): м'яса — $C_1 = 140,0$; гідролізат кормових дріжджів — $C_2 = 55,0$; NH_4Cl — $C_3 = 10,0$; $(NH_4)_2HPO_4$ —

$C_4 = 1,0$; кукурудзяний екстракт $-C_5 = 20,0$; лейцин $-C_6 = 0,2$; біотин $-C_7 = 0,00025$; тіамін $-C_7 = 0,00025$. Всього $-C_\Sigma = 226,2$ г/л.

Посівний матеріал вирощують на поживному середовищі такого складу (г/л): м'яса $-C_1 = 50,0$; кукурудзяний екстракт $-C_2 = 40,0$; $\text{CaCl}_2 - C_3 = 10,0$; лейцин $-C_4 = 0,2$. Всього $-C_\Sigma = 100,2$ г/л.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 72 + 10 = 82$ год, де $T_{\text{по}}$ – час підготовчих операцій; коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій $1,1 - 1,5$) $K_1 = 1,1$; коефіцієнт заповнення ферментера, частка $(0,5 - 0,7)$; приймаємо $K_3 = 0,6$; коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка $K_{\text{па}} = 0,61$; коефіцієнт заповнення інокулятора 1, частка $K_{\text{зі1}} = 0,54$; інокулятора 2, частка $K_{\text{зі2}} = 0,68$; інокулятора 3, частка $K_{\text{зі3}} = 0,67$; коефіцієнт заповнення колб, частка $K_{\text{кол}} = 0,2$; коефіцієнт заповнення збірника, частка $(0,7 - 0,8)$ $K_{\text{зб}} = 0,8$.

Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{\text{св}} = 0,3$; кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка $(0,05 - 0,1)$ $X_{\text{ф}} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка $(0,02 - 0,1)$ $X_{\text{па}} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для інокуляторів, частка $(0,02 - 0,1)$ $X_{\text{ін}} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка $(0,02 - 0,1)$ $X_{\text{кол}} = 0,05$; втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка $(0,1 - 0,2)$ $E_{\text{ф}} = 0,1$; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в посівних апаратах, частка $(0,1 - 0,2)$ $E_{\text{па}} = 0,1$; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в інокуляторах, частка $(0,05 - 0,1)$ $E_{\text{ін}} = 0,1$; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в колбах відсутні.

3.4 Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

Кількість лізину за цикл,

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 \cdot T_{\text{рд}} = 1605 \cdot 1000 \cdot 82 / 24 \cdot 190 = 28\,661 \text{ кг}$$

Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = T_{\text{рд}}/T_{\text{цф}} = 190 \cdot 24/82 = 55,6 \quad \text{Приймаємо 56 циклів.}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$V_{\text{кр}} = K_1 G_{\text{цк}} C P_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} \cdot (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 28\,661 \cdot 0,93 / 102 \cdot (1 - 0,3) = 411 \text{ м}^3.$$

Оскільки одиничного ферментера такої потужності промисловість не виробляє беремо найбільший з відомих (*табл.11.1* [56]) $V_{\text{гф}} = 100 \text{ м}^3$ при заданому коефіцієнті заповнення $K_3 = 0,6$ робочий об'єм буде становити

$$V_{\text{рф}} = V_{\text{гф}} \times K_3 = 100 \times 0,6 = 60 \text{ м}^3.$$

Кількість таких ферментерів складе $m_{\text{ф}} = V_{\text{кр}}/V_{\text{рф}} = 411/60 = 6,9$.
Приймаємо 7 одиниць. Тоді уточнений коефіцієнт заповнення складе

$$K_{3y} = V_{\text{кр}}/m_{\text{ф}} \times V_{\text{гф}} = 411/(7 \times 100) = 0,59$$

, що лежить в межах прийнятого.

Оскільки маємо 7 ферментерів, то приймаємо до розрахунку 7 ліній, кожна з яких має включати в себе усі апарати супроводу (реактори приготування ПС, інокулятори, посівні апарати). Розрахунок їх кількості будемо вести на 1 лінію.

3.5 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

1) Робочий об'єм одного ферментера становить

$$V_{\text{роб1}} = 60 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Приймаємо $X_{\text{ф}} = 10\%$ або 0,1 частки.

Робочий об'єм ферментера $V_{\text{роб}}$ складається з об'єму поживного середовища $V_{\text{пс1}}$ та об'єму посівного матеріалу $V_{\text{пм1}}$. З врахуванням дози посівного матеріалу $X_{\text{пм1}}$ робочий об'єм ферментера $V_{\text{роб1}}$ складе:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{пс1}} + V_{\text{пс1}} \cdot X_{\text{ф}}$$

Звідси, об'єму поживного середовища $V_{\text{пс}}$ буде

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 60 / (1 + 0,1) = 54,5 \text{ м}^3$$

,а об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм1}}$ складе:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 60 - 54,5 = 5,5 \text{ м}^3$$

2) Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування мікроорганізмів у посівному апараті з робочим об'ємом $V_{\text{роб2}}$ з врахуванням

втрат при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок краплевиносу $E_{па2} = 10\%$.

$$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - E_{па2}) = 5,5 / (1 - 0,1) = 6,1 \text{ м}^3$$

Найближчий за об'ємом ферментер має геометричний об'єм $V_{гпа} = 10 \text{ м}^3$, тоді його коефіцієнт заповнення складе:

$$K_{зап} = V_{роб2} / V_{гпа} = 6,1 / 10 = 0,61$$

,що в межах прийнятого діапазону для ферментерів з барботером ($K_{зап} = 0,5-0,65$).

Для отримання посівного матеріалу в посівному апараті з робочим об'ємом $V_{роб2}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{пс2}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм2} = 10\%$ або 0,1 частки.

$$V_{пс2} = V_{роб2} / (1 + X_{пм2}) = 6,1 / (1 + 0,1) = 5,5 \text{ м}^3,$$

,а об'єм посівного матеріалу $V_{пм2}$ складе:

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 6,1 - 5,5 = 0,6 \text{ м}^3 = 600 \text{ л}$$

3) Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування мікроорганізмів в інокуляторі 1 з робочим об'ємом $V_{роб3}$ з врахуванням втрат при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок краплевиносу $E_{па3} = 10\%$.

$$V_{роб3} = V_{пм2} / (1 - E_{па3}) = 600 / (1 - 0,1) = 667 \text{ л}$$

Найближчий за об'ємом ферментер (інокулятор) має геометричний об'єм $V_{гін1} = 1250 \text{ л}$, тоді його коефіцієнт заповнення складе:

$$K_{зап} = V_{роб3} / V_{гін1} = 667 / 1250 = 0,54$$

що в межах прийнятого діапазону для ферментерів з барботером

$$(K_{зап} = 0,5-0,65).$$

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 1 робочим об'ємом $V_{роб3}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{пс3}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм3} = 10\%$.

$$V_{пс3} = V_{роб3} / (1 + X_{пм3}) = 667 / (1 + 0,1) = 606 \text{ л}$$

, а об'єм посівного матеріалу $V_{пм3}$ складе:

$$V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 667 - 606 = 61 \text{ л}$$

4) Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування мікроорганізмів в інокуляторі 2 з робочим об'ємом $V_{роб4}$ з врахуванням втрат при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок краплевиносу $E_{па4} = 10\%$.

$$V_{роб4} = V_{пм3} / (1 - E_{па4}) = 61 / (1 - 0,1) = 68 \text{ л}$$

Найближчий за об'ємом ферментер (інокулятор) має геометричний об'єм $V_{гін2} = 100$ л, тоді його коефіцієнт заповнення складе

$$K_{зап} = V_{роб4} / V_{гін2} = 68 / 100 = 0,68$$

що в межах прийнятого діапазону для ферментерів з барботером.

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 2 робочим об'ємом $V_{роб4}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{пс4}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм4} = 10\%$.

$$V_{пс4} = V_{роб4} / (1 + X_{пм4}) = 68 / (1 + 0,1) = 62 \text{ л}$$

а об'єм посівного матеріалу $V_{пм4}$ складе

$$V_{пм4} = V_{роб4} - V_{пс4} = 68 - 62 = 6 \text{ л}$$

5) Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування мікроорганізмів в інокуляторі 4 з робочим об'ємом $V_{роб5}$ з врахуванням втрат при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок краплевиносу $E_{па5} = 10\%$.

$$V_{роб5} = V_{пм4} / (1 - E_{па5}) = 6 / (1 - 0,1) = 6,7 \text{ л}$$

Найближчий за об'ємом ферментер (інокулятор) має геометричний об'єм $V_{гін3} = 10$ л, тоді його коефіцієнт заповнення складе

$$K_{зап} = V_{роб5} / V_{гін3} = 6,7 / 10 = 0,67$$

що в межах прийнятого діапазону для ферментерів з барботером

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 3 робочим об'ємом $V_{роб5}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{пс5}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм5} = 10\%$.

$$V_{пс5} = V_{роб5} / (1 + X_{пм5}) = 6,7 / (1 + 0,1) = 6,1 \text{ л}$$

а об'єм посівного матеріалу $V_{пм4}$ складе

$$V_{пм5} = V_{роб5} - V_{пс5} = 6,7 - 6,1 = 0,6 \text{ л}$$

6) Таку кількість інокуляту можна одержати під час вирощування в качалочних колбах геометричним об'ємом $V_{колб} = 750$ мл. Втрати при

вирощуванні посівного матеріалу за рахунок краплиносу відсутні. Коефіцієнт заповнення колб становить $K_{\text{зап}} = 0,2$. Кількість качалочних колб складає

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмс}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зап}}) = 0,6 / (0,75 \times 0,2) = 4.$$

Приймаємо 4 качалочні колби.

Для зручності результати розрахунку представимо у вигляді таблиці

3.5.1.

Таблиця 3.5.1.

Результати розрахунку

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}, \text{м}^3 (\text{л})$	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}, \text{частка}$	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}, \text{м}^3 (\text{л})$	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}, \text{м}^3 (\text{л})$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}, \text{м}^3 (\text{л})$
1	2	3	4	5	6
1.	100	0,6	60	54,5	5,5
2.	10	0,61	6,1	5,5	0,6
3.	1250 (л)	0,54	667 (л)	606 (л)	61 (л)
4.	100 (л)	0,68	68 (л)	62 (л)	6 (л)
5.	10 (л)	0,67	6,7 (л)	6,1 (л)	0,6 (л)
6.	0,75 (л)	0,2	0,6 (л)	0,55 (л)	0,05 (л)

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу лізину у ферментері об'ємом 100 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити в 5 етапів, шостим буде етап виробничого культивування.

Стадії культивування:

- I стадія – вирощування в лабораторії (у колбах на качалці);
- II стадія – вирощування в інокуляторі 3 об'ємом 10 л;
- III стадія – вирощування в інокуляторі 2 об'ємом 100 л;
- IV стадія – вирощування в інокуляторі 1 об'ємом 1250 м^3 ;
- V стадія – культивування у посівному апараті об'ємом 10 м^3 .
- VI стадія – культивування у ферментері об'ємом 100 м^3 .

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Меляса є ключовим компонентом поживного середовища, для вирощування штаму *Brevibacterium flavum* 90 Н. Меляса в результаті гідролізу на глюкозу далі перетворення відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз), про що свідчить наявність ключового ферменту 6-фосфоглюкокінази 1 (КФ.2.7.1.11). Наводимо схему перетворення даного вуглеводу (рис.4. 1).

Гліколізу притаманні певні особливості, пов'язані з ферментами, що функціонують у даному метаболічному шляху. Так, перетворення α -D-глюкозо-1-фосфат на α -D-глюкозо-6-фосфат відбувається під дією ферменту фосфоглюкомутази (КФ.5.4.2.2).

Фермент глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9.) каталізує взаємне перетворення α -D-глюкозо-6-фосфату, β -D-фруктозо-6-фосфату і β -D-глюкозо-6-фосфату. Потім 6-фосфоглюкокіназа 1 (КФ.2.7.1.11) активує перетворення β -D-фруктозо-6-фосфату на β -D-фруктозо-1,6-дифосфат, частина якого за допомогою фруктозо-1,6-біфосфатази I (КФ.3.1.3.11) зворотно перетворюється на β -D-фруктозо-6-фосфат.

На наступному етапі, під дією ферменту фруктозобіфосфаталядолази, клас II (КФ.4.1.2.13) здійснюється перетворення β -D-фруктозо-1,6-дифосфату на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксиацетонфосфат.

Далі фермент гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12) залучається до перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на 1,3-дифосфогліцерат, який під дією фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат.

Фермент фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.12) каталізує перетворення 3-фосфогліцерату до 2-фосфогліцерату, який за допомогою енолази

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.	Гавриленко Я.В.				РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ 30			Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.	Слободян О.П.									30	4
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.	Пирог Т.П.										

(КФ.4.2.1.11) перетворюється на фосфоенолпіруват.

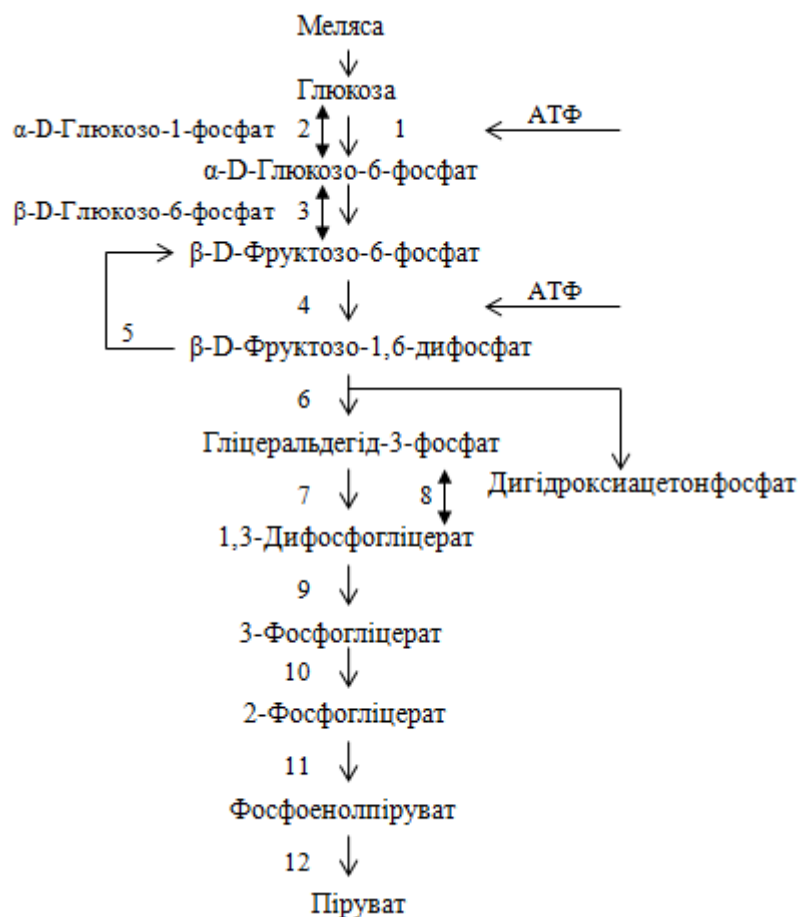


Рис.4.4.1. Катаболізм глюкози у *Brevibacterium flavum* 90 Н

ферменти: 1 – гексокіназа (КФ.2.7.1.1); 2 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 3 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 4 – 6-фосфотриозокиназа 1 (КФ.2.7.1.11); 5 – фруктозо-1,6-біфосфатаза I (КФ.3.1.3.11); 6 – фруктозобі-фосфатальдолаза, клас II (КФ.4.1.2.13); 7 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 8 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 9 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 10 – фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.12); 11 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 12 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

Заключним етапом гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату на піруват за допомогою піруваткінази (КФ.2.7.1.40). Далі піруват залучається до метаболізму за участю специфічної піруватдегідрогенази E1 (КФ.1.2.4.1) та піруватдегідрогенази E2 (КФ.2.3.1.12).

Усі реакції гліколізу, за винятком трьох (гексокіназної, фосфорукокіназної та піруваткіназної), повністю оборотні.

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Лізин входить в трійку незамінних амінокислот і життєво необхідний для повноцінного харчування як людини, так і сільськогосподарських тварин. Отримання амінокислот здійснюється за допомогою гідролізу природних продуктів, що містять білки, а також шляхом хімічного, ферментного і мікробіологічного синтезу. Найбільш поширеним в даний час є мікробіологічний синтез амінокислот.

Після гліколізу йде послідовно ЦТК, в якому присутні анапролетичні реакції. Два основних продукти, які діють в ЦТК: оксалоацетат і 2-оксоглутарат. Оксалоацетат в ході реакцій за допомогою 2 ключових ферментів (КФ 2.7.2.4) та (КФ 1.2.1.11) перетворюється на аспартат. Далі аспартат за допомогою ключового ферменту (КФ 4.3.3.7) перетворюється на аспартил-4-фосфат після чого за допомогою (КФ 1.17.1.8) утворюється аспаргіновий 4-семіальдегід. З аспаргінового-4-семіальдегіду за допомогою ключового ферменту (КФ 2.3.1.117) утворюється 4-гідрокси-2,3,4,5-тетрагідродипіколінат, звідси ж за допомогою (КФ 2.6.1.17) утворюється 2,3,4,5-тетрагідродипіколінат, після цього вступає в реакцію (КФ 3.5.1.18) та утворюється N-сукциніл-2-аміно-6-оксогептандіоат, для того щоб утворився (КФ 5.1.1.7) в реакцію вступає N-сукциніл-2,6-діамінопімелат. А з N-сукциніл-2,6-діамінопімелат за допомогою ключового ферменту (КФ 4.1.1.20) утворюється 2,6-діамінопімелат. Після того як утворився 2,6-діамінопімелат синтезується лізин.

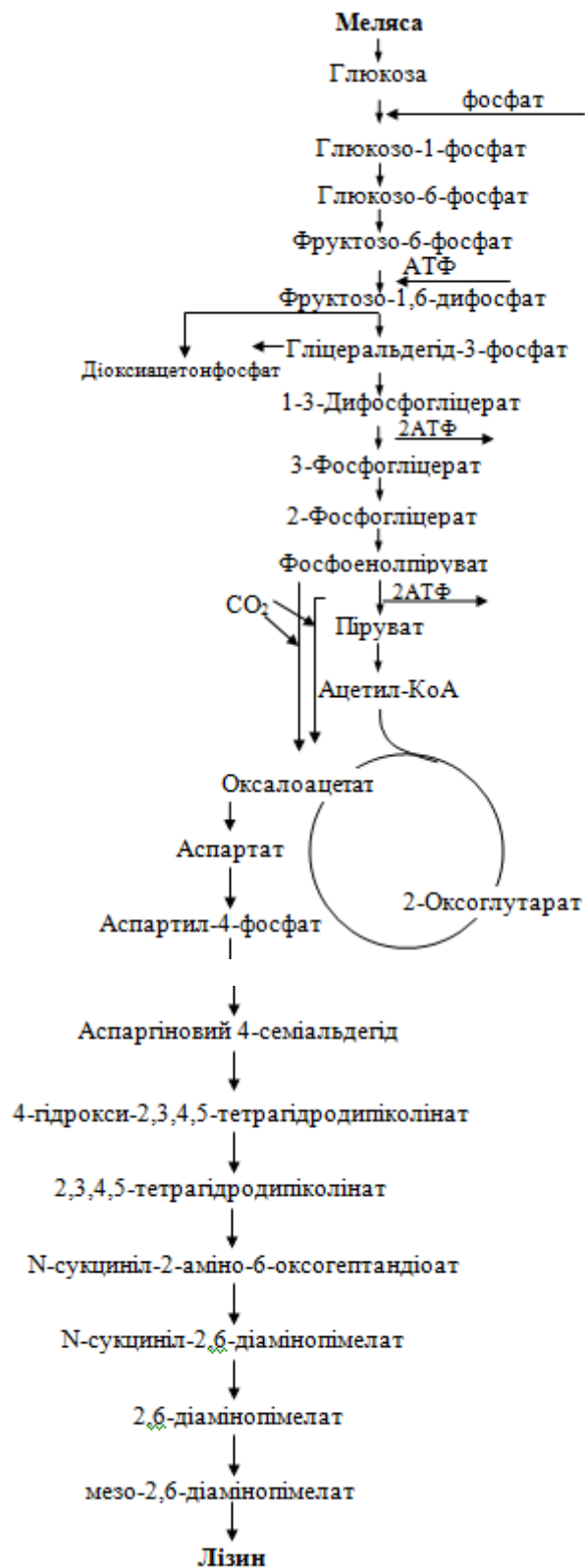


Рис.4.4.2 Схема біосинтезу лізину *Brevibacterium flavum*, починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату глюкози

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування лізину може відбуватися такими способами: глибинним чи поверхневим, періодичним чи безперервним.

Спосіб проведення біосинтезу обирають експериментально. Бактерія *Brevibacterium flavum* – аероб [31]. Відповідно у рідких середовищах з великим об'ємом рідини аеробні бактерії можуть рости тільки на поверхні, оскільки з віддаленням від поверхні умови наближаються до анаеробних. Для нормального росту аеробів у глибоких шарах рідкої культури необхідна аерація. Процес вирощування даної культури проводять з аерацією і перемішуванням, тому її можна вирощувати у глибоких шарах[42].

Обираючи періодичний чи безперервний спосіб культивування, варто звертати увагу на переваги та недоліки цих процесів.

При вирощуванні мікроорганізмів періодичним способом відбувається велика затрата часу. Але варто враховувати той факт, що штам *Brevibacterium flavum* 90H, потребує дробного внесення м'яса для надсинтезу лізину, дана операція проводиться періодичним способом [3]. Метод безперервного культивування полягає в тому, що в ферментер, в якому вирощується бактерія, весь час надходить свіже поживне середовище і одночасно з такою самою швидкістю відводиться культуральна рідина, яка вміщує бактеріальні клітини та продукти метаболізму. За такого культивування можна якоюсь мірою наблизитись до ідеальної ситуації, коли клітини тривалий час перебувають у фазі експоненційного росту за постійної концентрації субстрату та інших незмінних умов. Але даний спосіб не забезпечує асептичних умов культивування [3].

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 34	Літ.	Арк.	Акрушіє	
Розроб.		Гавриленко Я.В.							
Перевір.		Слободян О.П.					34	24	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

Відповідно можна зробити висновок, що культивування штаму *Brevibacterium flavum* 90 H доцільно проводити в умовах періодичного глибинного культивування з аерацією.

Виходячи з способу культивування підберемо ферментер. Вирощування виробничої культури продуцента лізину зазвичай здійснюється періодичним способом в ферментерах, обсяг яких становить 50, 63 або 100 м³ [42]. Процес біосинтезу буде здійснюватись у ферментері з механічним перемішуванням, тому що можна легко змінювати технологічні умови та ефективно доставляти до зростаючих клітин повітря, що визначає характер розвитку мікроорганізмів [43].

Оскільки продуцент лізину є аеробом, а в складі поживного середовища міститься меляса, ферментер потрібно додатково оснастити системою подачі повітря та піногасника в апарат. Окрім цього аеробний ферментер повинен мати підводи для посівного матеріалу, поживних середовищ, пари, води, відводи продуктів ферментації, газів що виділяються тощо [43].

Отже, для культивування *Brevibacterium flavum* 90 H найефективнішим являється ферментер з механічним перемішуванням барботажного типу, оснащений рубашкою, оскільки в ньому легко можна варіювати режими перемішування та масообміну, забезпечувати рівномірний розподіл мікроорганізмів та компонентів поживного середовища.

5.1.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

В умовах глибинного вирощування лізину потрібна безперервна подача стерильного повітря в ферментер, посівний апарат та інокулятори. Повітря, яке надходить в ферментер, не тільки забезпечує культуру киснем, а і відводить газоподібні продукти обміну і фізіологічне тепло, яке виділяється мікроорганізмами в процесі розвитку, дозволяє досягти однорідності мікробної суспензії, збільшує швидкість масопередачі і перемішування рідкого поживного середовища[3].

Підготовка повітря здійснюється різними способами, які передбачають перш за все знищення мікроорганізмів або їх відділення. Популярними є

методи газової очистки або застосування антисептиків, підвищення або пониження температури, ультрафіолетове випромінення, іонізуюче випромінення. Дані методи є дороговартісними, але забезпечують високий ступінь очистки повітря. В технології мікробіологічного синтезу повітря, що подається на аерацію повинно бути очищене на 99,9999 % від домішок і мікроорганізмів розміром до 1 мкм. Ця вимога змушує ставити більш дороговартісні системи, які забезпечують високий ступінь очистки, оскільки дешеві методи (газової очистки) є неефективними тому, що забезпечують виділення лише великих часточок [3].

Найрозповсюдженішим методом фільтрації повітря є через волокнисті, пористі або зернисті матеріали. Такі матеріали недорогі і мають високу ефективність стерилізації [3].

Для очистки повітря в даній роботі застосовується ячеєвий фільтр з пінополіуретаном, який є відносно стійким. Даний тип фільтру зберігає свої технічні характеристики при зміні температурі повітря, та очищається, від - 40 °C до +70 °C. Згідно наведених вище вимог повітря не повинне містити агресивних газів і пари, а даний тип фільтру забезпечує ці вимоги [43].

Наступна фаза очистки повітря відбувається в фільтрі грубої очистки суть якого полягає в уловлюванні основної маси часточок, які потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки і компресора. Зазвичай це фільтри великої ємкості і є головними. Головний фільтр повторює роботу індивідуальних фільтрів і збільшує ступінь очистки та стерилізації повітря. В представленій технології грубої очистки застосовують рулонний фільтр з волокнами полімеру [43].

Ще однією важливою фазою очистки є фаза тонкої очистки суть якої полягає в уловлюванні часточок пропущених іншими фільтрами, а також всіх інших можливих забруднень, що потрапили в систему випадково. Схематично даний тип фільтрів дуже схожий на фільтри грубої очистки, різняться вони лише розмірами та фільтруючими матеріалами. В даному проекті застосовується бактеріальний фільтр з фторопластовою мембраною

або тканиною Петрянова, встановлюється біля кожного ферментера чи реактора окремо [3].

Ключовим моментом підготовки повітря є стерилізація фільтрів для цього найчастіше використовують гостру пару. Даний метод завдає жорсткі умови для вибору фільтруючих матеріалів, оскільки через фільтр під тиском пропускається велика кількість гострої пари, часто забрудненої і з великим вмістом конденсату. Тому раціонально застосовувати двосторонню стерилізацію фільтрів парою. Пара повинна поступати чиста і суха температурою 120 °C при стабілізованому тиску. Час стерилізації коливається від 30 до 60 хв в залежності від типу фільтруючого матеріалу [3].

5.1.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виходячи з попередніх даних, можна сказати, що створення кормового концентрату біотехнологічним способом є набагато перспективнішим варіантом, ніж виготовлення лізину хімічним способом.

Перед тим як розпочати процес виготовлення кормового концентрату лізину потрібно провести санітарну обробку обладнання і приміщень, підготовки одягу персоналу та ряд інших вимог, для забезпечення необхідного рівня асептики на стадії біосинтезу.

Найчастіше в біотехнологічній промисловості використовуються хімічні методи, оскільки мають ряд переваг: добра розчинність у воді, швидкість дії, нетоксичність, нешкідливість для знезаражуваних предметів, економічний аспект.

Каустична сода (NaOH) розчиняється у воді. Водні розчини утворюють лужну реакцію. Гарячі розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зниженні температури розчину якість миючого засобу знижується.

В якості миючого засобу використовують 0,5% розчини каустичної соди із температурою (45 ± 5) °C для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю, а також 1 та 2 % розчини із температурою (55 ± 5) °C для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій [44].

Ціна каустичної соди – 60 грн/кг [45].

Кальциновану соду використовують в якості мийного засобу оскільки має такі характеристики : гарячі (55 ± 5) °C розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. Але є й недолік у кальцинованої соди так само як і, у каустичної соди знижуються миючі властивості [44].

Ціна кальцинованої соди – 10.5 грн/кг [46].

Гембар – гуанідинова полімерна сполука, що є синтетичним аналогом природних гуанідинових сполук. Не містить лугу, альдегіду, фенолу, окислювальних і хлорпохідних сполук. Препарат являє собою прозору безбарвну рідину та не має запаху. Препарат має пролонговану бактерицидну, фунгицидну, віруліцидну дію. Інактивує мікроби, у тому числі туберкульозу, грибки, віруси, у тому числі повно-, адено-, гепатиту Б, герпеса, енцефалітний, грипу, ВІЛ. Використовують для поточної, заключної і профілактичної, дезінфекції поверхонь, інвентарю і посуду[47].

Препарат не токсичний, має широкий спектр дії та високу біологічну активність. Активність препарату мало змінюється під впливом різних умов зовнішнього середовища. Гембар не леткий, що дозволяє проводити дезінфекцію в присутності людей, а обслуговуючому персоналу при роботі з робочими розчинами не застосовувати традиційних засобів індивідуального захисту очей і слизових оболонок[47].

Розчин гембару готують 0,25 % концентрації, для цього 2,5 г концентрату гембару розбавляють 1 л води.

Ціна гембару – 160 грн/кг[47].

“Дезактин” – дезінфекційний засіб з мийним ефектом виробництва ТОВ “ДЕЛАНА”. Не кородують об'єкти, котрі виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, деревини, кахлю, порцеляни, фаянсу, а також поверхні технологічного обладнання та устаткування з лакофарбовим, полімерним та гальванічним покриттям, не фіксують білкові та жирові забруднення на оброблених поверхнях, виявляють змочувальні та мийні

властивості, добре змиваються. Дезактин виявляє бактерицидні, туберкулоцидні та фунгіцидні властивості.

Рекомендується використовувати: 0,2 % розчини дезактину для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю, технологічного та санітарно-технічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари[57].

Спирт етиловий - це засіб, протимікробна дія якого полягає в здатності забирати воду і викликати денатурацію білків протоплазми мікроорганізмів. На спорові форми не впливає. Бактерицидна дія починає проявлятися вже в розчині з концентрацією 20 %. Із її збільшенням цей ефект зростає. Але в білковому середовищі високі концентрації спирту утворюють щільні білкові конгломерати, в середині яких можуть знаходитись живі мікроорганізми. Тому на практиці, наприклад, для знезаражування шкіри, доцільніше використовувати 70 % спирт, тому що в такій концентрації він добре проникає в глибину шкіри, в протоки сальних і потових залоз, забезпечує високий антисептичний ефект в найближчі хвилини. За силою протимікробної дії 70 % спирт етиловий прирівнюється до 3 % розчину фенолу або 0,1 % розчину ртуті дихлориду.

Як протимікробний засіб спирт етиловий застосовується для обробки рук персоналу і робочої зони в лабораторії (70 %), стерилізації інструментів (90-95 %) тощо. Нерідко він використовується в поєднанні з іншими протимікробними засобами у вигляді розчинів.

Розчин перекису водню - прозора безбарвна рідина. Швидко розкладається на світлі, при нагріванні, під впливом різних сполук. Отримують його шляхом розбавлення водою концентрованого розчину перекису водню (пергідролу). Для дезінфекції використовуються 3 % та 6 % розчини перекису водню.

Приготування дезінфікуючих розчинів забезпечує відповідну якість дезінфікуючих розчинів для дотримання потрібного рівня асептики. Дана операція являється підготовчою для наступних операцій санітарної

підготовки, які, в свою чергу, включені в технологічну схему для попередження контамінації. Допускається використовувати мийні, дезінфекційні, мийно-дезінфекційні засоби та антисептики, які в установленому порядку зареєстровані в Україні і дозволені до використання на підприємствах хіміко-фармацевтичної та біотехнологічної промисловості.

При використанні мийно-дезінфекційних засобів поєднують стадії миття та дезінфекції об'єктів в одній операції (виключають використання розчинів мийних засобів). Рекомендується чергувати дезінфекційні та антисептичні засоби кожні 1-3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких варіантів мікроорганізмів.

Готують дезрозчини в спеціальному посуді, зберігають обмежений час щоб уникнути зростання мікроорганізмів. Розчини використовують тільки свіжоприготованими. Розчини мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів використовують одноразово (вони не підлягають повторному використанню).

В залежності від концентрації перекис водню проявляє бактерицидну, спороцидну дію, в більшій концентрації (6 %) застосовують для позбавлення від цвілі, тобто є універсальним. На відміну від альдегідів не проявляє подразнюючої дії, не накопичується в організмі людини, як сполуки металів, малотоксичний. Саме тому перекис водню доцільно використовувати в технології такого типу.

Отже, серед запропонованих засобів вибираємо каустичну та кальциновану соду, гембар та дезактин.

5.1.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез лізину (102 г/л за 72 год) досягається за умов росту штаму *Brevibacterium flavum* 90 Н на середовищі такого складу (г/л): м'яса-140; гідролізат кормових дріжджів-55; кукурудз.,екст.-20; NH_4Cl -10; $(NH_4)_2HPO_4$ -1; культуральна рідина L-лейцину-0,2; біотин-0,00025; тіамін-0,00025 .

Згідно з розрахунками, які наведені у розділі 3, виробничий біосинтез лізину здійснюється у ферментері об'ємом 100 м^3 , який містить $54,5 \text{ м}^3$ середовища.

Таблиця 5.1.4.1.

Результати розрахунку

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}, \text{м}^3$ (л)	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}, \text{частка}$	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}, \text{м}^3$ (л)	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}, \text{м}^3$ (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}, \text{м}^3$ (л)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
1.	100	0,6	60	54,5	5,5
2.	10	0,61	6,1	5,5	0,6
3.	1250 (л)	0,54	667 (л)	606 (л)	61 (л)
4.	100 (л)	0,68	68 (л)	62 (л)	6 (л)
5.	10 (л)	0,67	6,7 (л)	6,1 (л)	0,6 (л)
6.	0,75 (л)	0,2	0,6 (л)	0,55 (л)	0,05 (л)

Процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу лізину у ферментері об'ємом 100 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити в 5 етапів, шостим буде етап виробничого культивування.

Стадії культивування:

- I стадія – вирощування в лабораторії (у колбах на качалці);
- II стадія – вирощування в інокуляторі 3 об'ємом 10 л;
- III стадія – вирощування в інокуляторі 2 об'ємом 100 л;
- IV стадія – вирощування в інокуляторі 1 об'ємом 1250 м^3 ;
- V стадія – культивування у посівному апараті об'ємом 10 м^3 .
- VI стадія – культивування у ферментері об'ємом 100 м^3 .

Середовище для вирощування посівного матеріалу у колбах.

Насамперед для вирощування посівного матеріалу в колбах потрібно $0,55 \text{ л}$ поживного середовища.

Враховуючи невеликий об'єм середовища потрібного для вирощування інокуляту в колбах, його стерилізація проводиться в автоклаві. Проаналізувавши склад поживного середовища для культивування

Brevibacterium flavum 90 Н можна поділити його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації певних компонентів):

Композиція А: м'яса; кукурудзяний екстракт(112 °С, 20-30 хв., 0,5 атм)

Композиція Б: Лейцин (131 °С ,40-60 хв., 1,5 атм).

Композиція В: $CaCl_2$ (131 °С ,40-60 хв., 1,5 атм).

Композиції поділені так, оскільки мають характерні особливості зокрема м'яса; гідролізат кормових дріжджів; кукурудзяний екстракт (композиція А) є невідомим джерелом вуглецю, і вони потребують м'яких умов стерилізації оскільки мають здатність карамелізуватися.

Амінокислоту лейцин (композицію Б) стерилізують при стандартній для амінокислот температурі.

Крейд (композиції В) готують окремо оскільки вводиться у середовище в малих дозах.

Середовище для виробничого біосинтезу в ферментері

Об'єм середовища, яке необхідно простерилізувати становить 54,5 м³.

З економічної точки зору доцільніше для стерилізації такої кількості поживного середовища застосовувати установку безперервної стерилізації. Її використання дозволяє зменшити витрати води, пари, теплової енергії і скоротити час обробки поживного середовища. Таку кількість поживного середовища можна простерилізувати в УБС-20, потужністю 20 м³/год. Загальний час стерилізації поживного середовища становить $\tau = 54,5/20 = 2,7$ годин.

Піногасник

До складу поживного середовища входить м'яса, яка при перемішуванні у ферментері і інокуляторах буде інтенсивно пінитись. Для зменшення рівня піни використовуємо піногасник *Пропінол Б-400*. Піногасник буде вноситися автоматично (доза одного внесення – 0,04% від робочого об'єму ферментера або інокулятора) при спрацьовуванні датчика

рівня піни. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

Підживлюючий розчин

В якості вуглецевого живлення виступає меляса, якщо підживлювати поживне середовище мелясою можна отримати від 100-120 г/л лізину. Підживлюючий розчин буде вноситися поступово у ферментер (доза внесення – 90 г/л). стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 30 хв.

5.2 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

5.2.1 Обґрунтування форми готового продукту лізину

Лізін - це незамінна амінокислота, що входить до складу практично будь-яких білків, необхідна для росту, відновлення тканин, виробництва антитіл, гормонів, ферментів, альбумінів[48].

В основному лізін використовується в якості кормової добавки, що пов'язано з низькою кількістю цієї амінокислоти в рослинних кормах.

Нестача лізину в організмі у тварин і птиці викликає зниження апетиту, продуктивності дорослих особин і міцності шкаралупи, уповільнення росту молодняка, порушення кальцифікації кісткової тканини, розвиток анемії, виснаження м'язів, депігментацію опірення у птахів. Для заповнення цієї амінокислоти використовується кормовий лізін [49-50].

Дефіцит лізину в кормах може досягати 15 - 20%, особливо в раціонах, що складаються переважно зі злакових компонентів, соняшникового шроту і незначної кількості (1 - 2%) тваринних кормів. Це пов'язано з тим, що в рослинних білках лізін міститься в незначних кількостях. Для збагачення кормів, приготування комбикормів і преміксів застосовують кормовий лізін, отриманий методом глибинного культивування мікроорганізмів, які синтезують цю амінокислоту. Для виробництва лізину використовуються меляса, кукурудзяний екстракт, висівки, соняшниковий шрот, рибне та м'ясо-кісткове борошно, рапс, а також вітаміни, соляна кислота, аміачна вода[42].

В даний час Україна має значний попит на амінокислоти, зокрема на лізин кормовий. Нажаль в Україні немає біотехнологічних підприємств які б виготовляли лізин. Для імпортозаміщення вже наявних на ринку кормових препаратів лізину, для України залишається актуальним питання побудови вітчизняних потужностей для виробництва лізину.

Для кормових цілей отримують три основні форми лізину – це рідкий концентрат (РКЛ), кристалічний концентрат (ККЛ) та у формі гранул. Різняться вони ступенем очистки для РКЛ 30-40%; ККЛ 85-98%; гранул 50-85% , вмістом лізину РКЛ 10-15%; ККЛ 50-80%; гранули 20-45% , терміном зберігання РКЛ 3-4 місяці; ККЛ 6 місяців; гранули 12 місяців.

Фермери зазвичай користуються ККЛ та гранулами, оскільки змішуються з кормом доволі легко та мають значний термін зберігання. Але ККЛ має недолік - він дуже гігроскопічний і при зберіганні злежується. Утворені при цьому великі грудки ускладнюють його подальше продуктивне використання як при приготуванні комбікормів, так і безпосередньо на тваринницьких фермах [42].

Є кілька способів ліквідації цього недоліку. Мабуть, велика гігроскопічність сухого препарату пов'язана з високим вмістом цукрів та органічних кислот, яке можна знизити введенням в культуральну рідину наповнювачів (кісткового борошна, оксиду кальцію, бентоніту, пшеничних висівок) і наступним сушінням. В результаті виходить менш сипучий гігроскопічний продукт [42].

Зазвичай це кристалічний порошок або гранули (*Рис.5.2.1.1*) білого, або світлокоричневого кольору.



Рис.5.2.1.1 Кінцевий продукт біосинтезу[12]

З вище перерахованих варіацій форм лізину доцільніше використовувати ККЛ, оскільки в формі концентрату, окрім лізину містяться і побічні продукти такі як вітаміни, мінерали та решта. Власне побічні речовини ККЛ регулюють повноцінний раціон тварин. Окрім цього в процесі виділення лізину не залишається на стінках апаратів, що дозволяє отримувати його без значних втрат.

5.2.2 Обґрунтування стадій виділення та очищення лізину

Після стадії культивування мікроорганізму продуценту лізину наступним технологічним етапом є виділення та очистка кінцевого продукту з культуральної рідини. Зокрема лізин можна виділити кількома способами схеми наведені нижче.

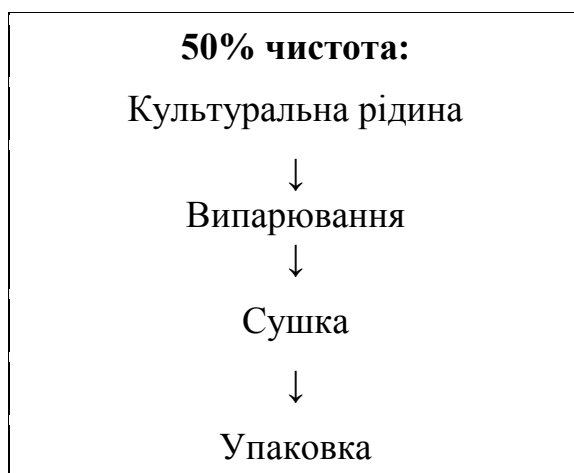


Схема №1 Отримання сухого концентрату лізину[51]

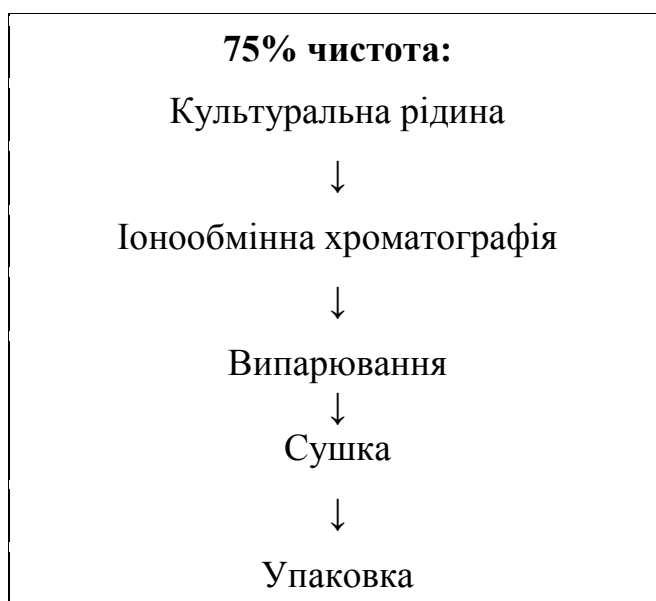


Схема № 2 Отримання кристалічного концентрату лізину[51]

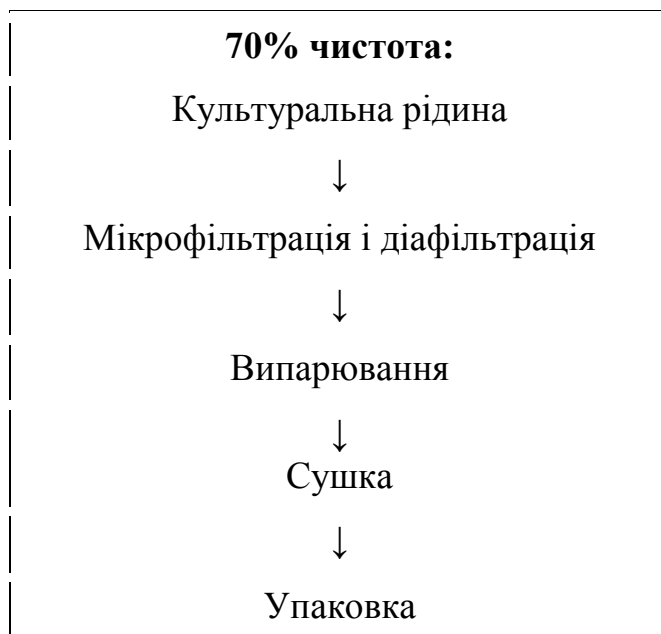


Схема № 3 Отримання кристалічного концентрату лізину [51]

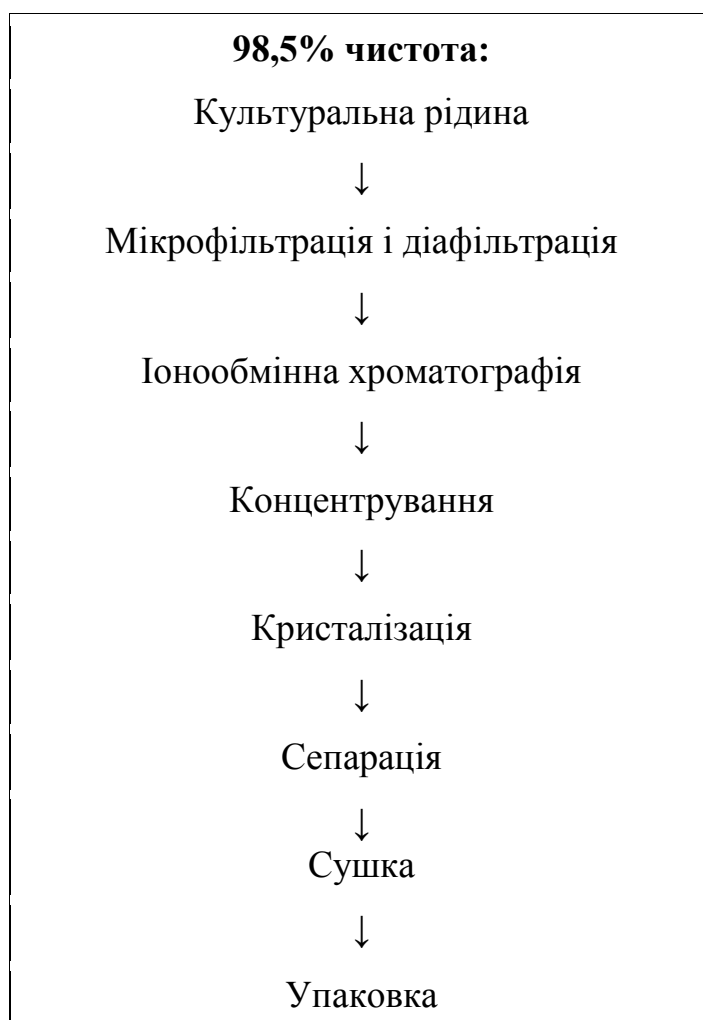


Схема № 4 Отримання кристалічного концентрату лізину[51]

Як видно з наведених схем вони різняться чистотою продукту, стадіями, методами та тривалістю відділення їх від культуральної рідини. Окрім цих факторів варто також враховувати і економічний фактор, адже біотехнологічний процес повинен відповідати таким вимогам: простота та недороговартість процесу. Порівняння даних схем наведено в *таблиці 5.2.2.1*.

Таблиця 5.2.2.1

Порівняння технологій виділення лізину

	<i>Схема №1</i>	<i>Схема №2</i>	<i>Схема №3</i>	<i>Схема №4</i>
Простота процесу	+	+	+	-
Тривалість процесу	+	-	-	-
Відсоток вмісту лізину	25%	20%	15%	10%

Отже, за порівняльною таблицею видно, що доречно використовувати технологію виділення та очищення лізину шляхом випарювання та сушіння. Оскільки дана технологія має мінімальні втрати лізину під час його виділення окрім цього даний процес є не складним у реалізації процесом, який включає можливість стабілізації під час його виділення та дозволяє отримувати лізин середнього ступеня очищення з біомасою продуценту, розчинних білків, бетаїну, мікроелементів та інших компонентів.

5.2.3 Обґрунтування підкислення лізину

Після культивування культуральну рідину перекачують до збірної ємності, об'єм збірника залежить від кількості культуральної рідини та кількості використовуваної кислоти (HCl), необхідно обрати збірник з запасом – об'ємом 100 м³.

Для ефективнішого перебігу процесу концентрування лізину проводять підкислення середовища до значення рН 5-6. Підкислення розчину краще проводити 2 N соляною кислотою (HCl). Соляна кислота має широкий спектр застосування та виробляється у великих об'ємах в світі, що робить її однією з

найдешевших неорганічних кислот. Також, кількість 2N HCl необхідна для доведення значення pH 5-6 є невелика, що значно економить кошти при закупівлі реагентів.

Окрім підкислення соляною кислотою до значення pH 5-6, додатково вводять стабілізатор NaHSO_3 – 0,15%, після чого культуральна рідина подається на концентрування. Бісульфіт натрію є також дешевою речовиною, як і соляна кислота.

5.2.4 Обґрунтування вибору способу концентрування

Після процесу біосинтезу культуральна рідина містить цільовий продукт незамінну амінокислоту лізин, залишки поживного середовища, а також продукти метаболізму продуцента та решта домішок. При виділенні біомаси однією з найважливіших вимог є збереження кількості живих клітин. Простий спосіб – концентрування при упарюванні або сушінні – придатний тільки в окремих випадках, там, де міститься багато домішок. Методи виділення залежать від того, в якій фазі кінцевий продукт – в розчині чи в твердій фазі. Відділити лізин від культуральної рідини можна багатьма способами але найпоширенішим є концентрування (вакуум-випарювання) [42].

Але лізин при 60 °C вступає у хімічну взаємодію з моносахаридами, і його активність втрачається. Тому для концентрування лізину необхідно підтримувати більш низьку температуру за більш короткий час. Звідси – високі вимоги до обладнання. Процес випарювання вакуумом є найбільш економічним способом попереднього концентрування культуральної рідини лізину. В залежності від процесу вакуум-випарні установки поділяються на трубчасті плівкові, роторні плівкові, відцентрові плівкові, вільною та примусовою циркуляцією. Для того щоб обрати відповідний апарат необхідно порівняти їх між собою [52].

Випарні трубчасті плівкові апарати призначені для інтенсифікації процесів тепло- та масообміну за допомогою тонких плівок.

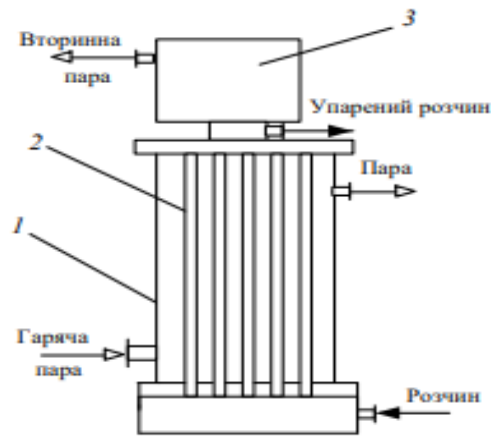


Рис.5.2.4.1. Випарний трубчастий плівковий апарат [52]

1-нагрівна камера; 2- трубки; 3- сепаратор.

Перевагою є простота процесу.

Недоліками утворення бульбашок, тривалий час контакту з температурою, значні втрати лізину, низький коефіцієнт тепловіддачі.

Роторні плівкові випарні апарати процес упарювання відбувається в шарі рідини, що створюється на внутрішній поверхні вертикального корпуса (рис.5.2.4.1). Зовні корпуса розміщена секційна сорочка, в яку подається теплоносії (насичена пара, вода, органічний теплоносії тощо) [52].

Перевагою роторних плівкових випарних установок є те, що їх можна застосовувати як останній ступінь концентрування розчину.

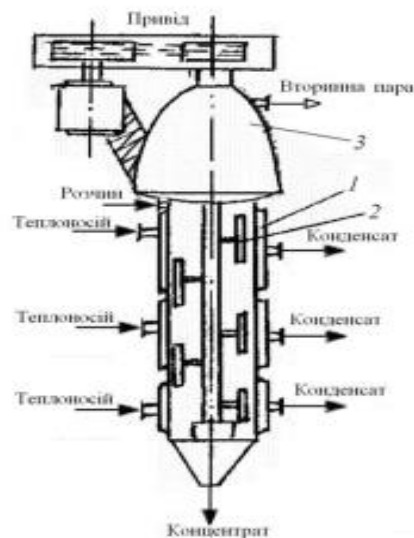


Рис.5.2.4.2 Роторний плівковий випарний апарат [52]

1-сорочка; 2- лопатки; 3- сепаратор.

Недоліки: незначна поверхня нагріву, наявність обертання ротора (зниження економічності), нерівномірність зазору між лопатками та корпусом.

Відцентрові плівкові вакуум-випарні установки використовують для концентрування розчинів амінокислот. Продуктивність відцентрових плівкових вакуум-випарних апаратів з площею нагріву $7 - 15 \text{ м}^2$ становить $2400-5000 \text{ дм}^3/\text{год}$ при температурі випаровування 50°C . Питома витрата пари – $1,1 \text{ кг}$ на 1 кг випареної води. Споживана потужність відповідно $20,6 - 27 \text{ кВт}$, а витрати води $41-68 \text{ т/год}$. Максимальна концентрація сухих речовин в упареному розчині – 85% .

У випарному апараті (рис.5.2.4.2) на порожнистому валу (1) закріплено порожнистий шпіндель (3), усередині якого змонтовано дев'ять порожнистих нагрівальних конусів (2). У нижню частину конусів надходить пара та відводиться конденсат. Крізь сопла (4) на поверхню конусів подається рідина. Привід обертання порожнистого вала та шпінделя встановлено в нижній частині апарата.

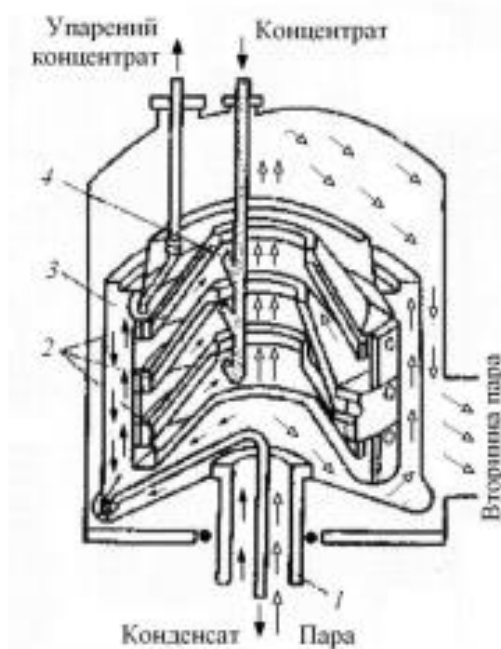


Рис.5.2.4.3. Відцентрова плівкова вакуум-випарна установка [52]

Переваги: незначний час контакту з температурою (1-2 с), високий коефіцієнт тепловіддачі (до $10 \text{ кВт}/(\text{м}^2 \times \text{К})$), мінімальні втрати лізину.

Випарні апарати трубчастого типу з вільною та примусовою циркуляцією використовують для концентрування амінокислот.

Циркуляція розчину проходить по циклу: сепаратор – циркуляційна труба – камера для нагрівання – сепаратор. Тривалість перебування розчину на упарюванні до 1 год, циркуляція розчину проходить вільно тому, що в камері для нагрівання він закипає [52].

Апарат з вільною циркуляцією застосовують для концентрування середовищ, що не піняться та з невисокою в'язкістю (до $0,6 \text{ Па}\cdot\text{с}$).



Рис.5.2.4.4. Випарний апарат трубчастого типу з вільною та примусовою циркуляцією [52]

1-сепаратор; 2- нагрівальна камера; 3- циркуляційна труба.

Примусова циркуляція розчину проходить по циклу: сепаратор – циркуляційна труба – насос – нагрівальна камера – сепаратор.

Недоліки: тривалий час перебування, утворення накипу на поверхні нагріву, невисокі коефіцієнти тепло- та масообміну через незначні швидкості циркуляції розчину.

Отже серед запропонованих вакуум-випарних апаратів найбільш доцільним буде використання відцентрового плівкового вакуум-випарного апарату. Оскільки він не піниться в процесі випарювання, швидко концентрує продукт біосинтезу при цьому лізин не втрачає своєї активності, не утворює накипу на поверхні нагріву та простий у використанні.

5.2.5 Вибір способу сушіння та сушарки

Після упарювання культуральна рідина передається на стадію сушіння. В літературних джерелах наведені такі сушильні установки: стрічкова, розпилювальна, у «киплячому шарі», у «віброкиплячому шарі».

Стрічкові сушарки використовують для сушіння крупногрудкових, волокнистих і пастоподібних матеріалів, зокрема амінокислот.

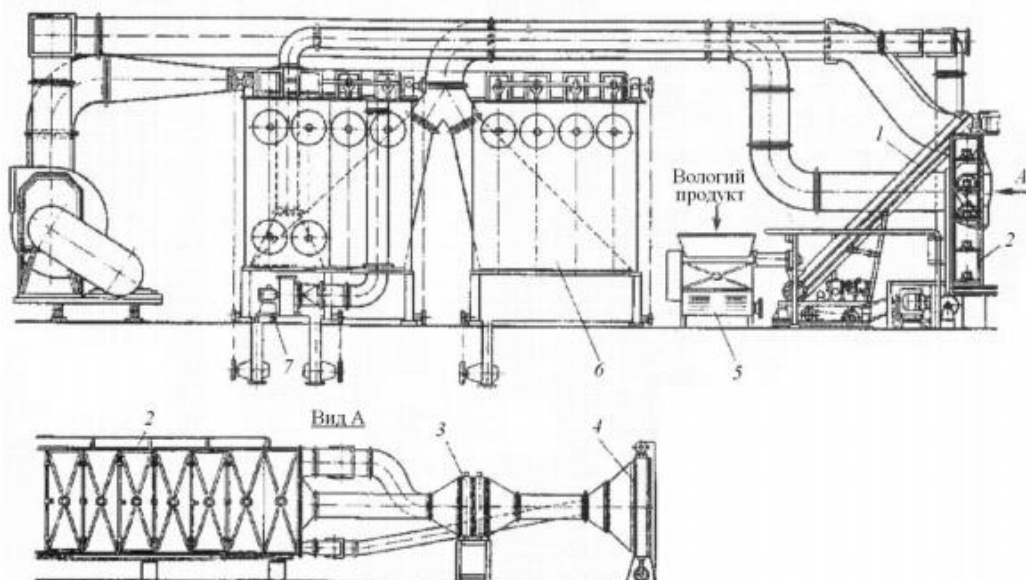


Рис.5.2.5.1 Стрічкова сушарка [52]

Складається вона з дробарки – гранулятора (5), живильника (1), стрічкової сушарки (2), та системи підігрітого повітря, що містить фільтри (4,6), вентилятора – калорифера (3), вузла подачі, розподілення повітря та вібратора (7).

Переваги: містить прилади контролю температури повітря та культури, має систему автоматичного регулювання та запису температури в процесі сушіння.

Недоліки: висока вологість висушеного продукту, це може викликати перегрівання продукту при сушінні.

Сушарки киплячого шару використовують для сушіння кормових антибіотиків, амінокислот, ферментів тощо. Сутність цього способу сушки полягає у тому, що вихідний матеріал на розподільній решітці потоками газу приводиться у псевдозріджений стан. Швидкість потоку газу крізь решітку підбирається такою, щоб матеріал на решітці перебував у завислому «киплячому» стані.

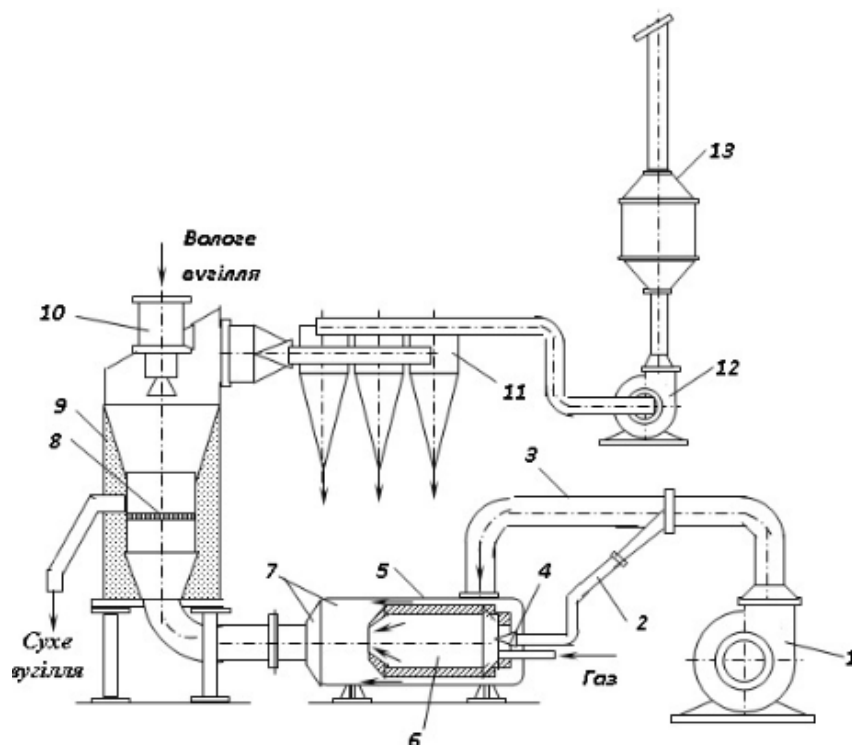


Рис.5.2.5.2. Сушарка киплячого шару [52]

1-дуттєвий вентилятор; 2,3- повітропроводи; 3- циклон; 4- пальник; 5- топка; 6- камера згоряння; 7- камера змішування; 8- решітка; 9- камера сушки; 10- живильник; 11- циклон; 12- димосос; 13- скруббер.

Переваги: досягається значна інтенсивність сушки і створюється можливість регулювання часу перебування матеріалу на ґратах. Тривалість сушки більша, ніж в трубах-сушарках, що дає можливість здійснити глибшу і рівномірну сушку матеріалу.

Недоліки: є значна витрата електроенергії, необхідної для створення високого тиску сушильного агента (2000–6000 Па).

Сушарки з віброкиплячим шаром матеріалу. Застосування даного типу сушарок дозволяє інтенсифікувати тепло- та масообмін між частинками і газом в результаті турбулізації пограничного шару та забезпечити стійкий гідродинамічний режим. Цей спосіб ідентичний сушці в киплячому шарі і може застосовуватися в комбінації з аеродинамічним впливом.

Розпилювальні сушарки застосовують для висушування ферментів, амінокислот тощо. Концентрація сухих речовин у розчині повинна бути не менше 10%. Розпилювальні сушарки дають м'які режими сушіння, що запобігають втратам БАР. У розпилювальних сушарках можливе суміщення процесів висушування та мікрокапсулювання. Відцентровий розпил продукту дозволяє рівномірно розпилювати рідину та інтенсифікувати процес випарювання. В розпилювальній сушарці рідина перетворюється в туман. Камери для висушування виготовляють з нержавіючої сталі.

У мікробіологічній промисловості в основному експлуатуються сушарки з дисковим розпилом розчином. Сушарка (рис.5.2.5.2) являє собою циліндричний корпус (9) з конічним днищем для виведення сухого продукту.

Розчин, що подається на сушіння, розпилюється відцентровим пристроєм (13) за допомогою диска (10). Сушильний агент подається у верхню частину установки по трубопроводу (7), на кінці якого встановлено розподільний конусний пристрій (8). За допомогою пристрою відбувається закруглення потоку газу, що надходить. Розпилені диском краплі продукту підхоплюються потоком повітря та рухаються до низу. Волога випаровується, а дрібні висушені частинки продукту, що залишилися, осаджуються в конусному днищі та опускаються по його стінках до пристрою для розвантаження (1). Для струшування частинок продукту, що осіли на стінках, встановлені вібратори (17). Відпрацьований сушильний агент з частинками продукту, що частково виносяться з сушарки, видаляється по трубопроводу (2) в циклони для відділення порошку. Для огляду корпус забезпечено підйомником (4), світильником (6) та дверима (5).

Перекрыття сушарки (11) має запобіжні клапани у вигляді дисків та патрубків (12) для виходу сушильних газів при різкому підвищенні тиску.

Розпилювальний диск (10) обертається з частотою 10000 хв^{-1} від електродвигуна за допомогою редуктора. Для змащування розпилювального пристрою у верхній частині встановлено механізм та масляний фільтр (14). Підіймання розпилювального пристрою здійснюється електроталем (15).

При встановленні в закритому приміщенні не передбачено пристрій (16), що закриває механізми дискового розпилювача. Для запобігання підгоряння продукту в сушарці встановлені запобіжні щитки (3,18). Сушарка може бути встановлена як в закритому приміщенні, так і на відкритому місці.

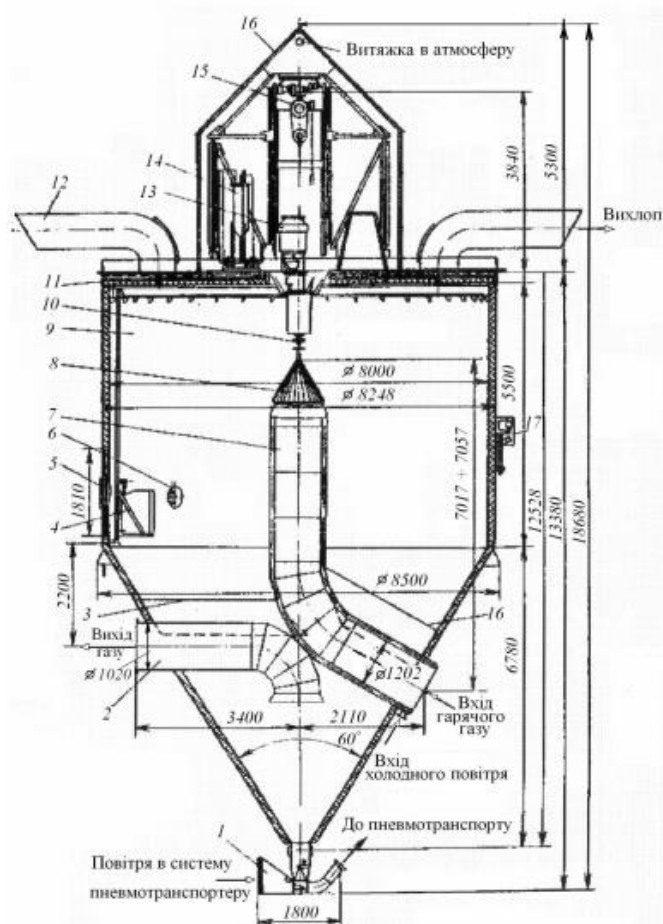


Рис.5.2.5.3. Розпилююча сушарка з конічним дном [52]

Переваги: тривалість сушіння 15-20 с; мінімальна температура частинок в зоні сушіння; можна легко змінювати умови сушіння (вологість, температуру, розмір частинок); готовий продукт у більшості випадків не

вимагає розмолу та має добру розчинність; сушарка високопродуктивна та нескладна в обслуговуванні.

Недоліки: значні питомі габарити сушарки; відносно дороге та складне обладнання для розпилення розчинів та виділення готового продукту з відпрацьованого повітря; підвищені витрати енергії для розпилення розчинів та витрати повітря; незначна насипна щільність продукту.

Для того щоб обрати тип установки сушіння окрім порівняння характеристик необхідно провести аналіз техніко-економічних показників процесу (таблиця 5.2.5.1) [52] .

Таблиця 5.2.5.1

Техніко-економічні показники сушіння концентрату лізину

Метод сушіння	Питоме навантаження (по вологому матеріалу), кг/м ²	Швидкість теплоносія, м/с	Питома продуктивність по випареній волозі, кг × м ² /год	Температура теплоносія, °С	
Стрічковий	25	1,2	15	340	310
У «віброкиплячому шарі»	40	3	50	388	363
У «киплячому шарі»	40	5	60	-	-
Розпилювальний	-	32	1-3	389	373

Отже, в процесі сушіння доцільним буде використання розпилювальної сушарки. При даному типі сушіння тривалість контакту висушуючого матеріалу з агентом сушки визначається секундами, і втрат лізину практично немає, також не потрібно ставити подрібнюючий пристрій, оскільки можна регулювати розміри часточок в процесі сушіння.

5.2.6 Обґрунтування вибору упаковки для готового продукту

Кормовий лізин упаковують в паперові або тканинні мішки, в тканинні мішки з поліетиленовим вкладишем, в мішки з полімерних або комбінованих матеріалів і в м'які контейнери [53].

Упаковка повинна бути виготовлена з матеріалів, використання яких при контакті з кормовим лізином забезпечує збереження його якості, безпеку і незмінність ідентифікаційних ознак при зверненні продукції протягом всього терміну зберігання.

Упаковка повинна бути міцною, цілою, чистою, сухою, що не заражена шкідниками хлібних запасів, без стороннього запаху і відповідати вимогам нормативних або технічних документів. Кормовий лізин упаковують в мішки масою нетто 25 кг.



Рис.5.2.6.1. Форма пакування[53]

Допускається за узгодженням зі споживачем упаковка з меншою і більшою масою. Маса кормового лізину в м'яких спеціалізованих контейнерах повинна відповідати вимогам інструкції по застосуванню контейнерів.

Упаковку закривають (зашивають, заклеюють, скріплюють) способом, який забезпечує схоронність упаковки і кормового лізину протягом всього терміну зберігання при дотриманні умов транспортування і зберігання.

Кормовий лізин зберігають в упакованому вигляді окремо по партіях в сухих, чистих, не заражених шкідниками хлібних запасів, добре вентильованих та провітрюваних закритих складських приміщеннях при температурі повітря від 5 ° С до 25 ° С. Кормовий лізин повинен бути захищений від впливу прямих сонячних променів, джерел тепла і вологи.

Допускається зберігати кормовий лізин на відкритому майданчику під навісом або під водонепроникним покриттям.

Пакувальні одиниці при транспортуванні допускається об'єднувати в транспортні пакети[53].

РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ

З техніко економічного розрахунку потреба в лізині складає $G_{\text{нд}} = 1605$ т. За умовами замовника цю кількість амінокислоти потрібно виробити за $T_{\text{рд}} = 220$ днів. За літературними даними максимальний синтез амінокислоти (102 г/л за 72 год) досягається за умов росту штаму *Brevibacterium flavum* 90 Н на середовищі такого складу (г/л): меляса – $C_1 = 140,0$; гідролізат кормових дріжджів – $C_2 = 55,0$; NH_4Cl – $C_3 = 10,0$; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – $C_4 = 1,0$; кукурудзяний екстракт – $C_5 = 20,0$; лейцин – $C_6 = 0,2$; біотин – $C_7 = 0,00025$; тіамін – $C_8 = 0,00025$. Всього – $C_{\Sigma} = 226,2$ г/л.

Посівний матеріал вирощують на поживному середовищі такого складу (г/л): меляса – $C_1 = 50,0$; кукурудзяний екстракт – $C_2 = 40,0$; CaCl_2 – $C_3 = 10,0$; лейцин – $C_4 = 0,2$. Всього – $C_{\Sigma} = 100,2$ г/л.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 72 + 10 = 82$ год, де $T_{\text{по}}$ – час підготовчих операцій; коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) $K_i = 1,1$; коефіцієнт заповнення ферментера, частка (0,5 – 0,7); приймаємо $K_z = 0,6$; коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка $K_{\text{па}} = 0,61$; коефіцієнт заповнення інокулятора, частка $K_{\text{зі}} = 0,54$ –0,68; коефіцієнт заповнення колб, частка $K_{\text{кол}} = 0,2$; коефіцієнт заповнення збірника, частка (0,7 – 0,8) $K_{\text{зб}} = 0,8$.

Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{\text{св}} = 0,3$; кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05 – 0,1) $X_{\text{ф}} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,02 – 0,1) $X_{\text{па}} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для інокуляторів, частка (0,02 – 0,1) $X_{\text{ін}} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка (0,02 – 0,1) $X_{\text{кол}} =$

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушіє	
Розроб.		Гавриленко Я.В.							
Перевір.		Слободян О.П.					59	37	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

0,05; втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка (0,1 – 0,2) $E_{\text{ф}} = 0,1$; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в посівних апаратах, частка (0,1 – 0,2) $E_{\text{па}} = 0,1$; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в інокуляторах, частка (0,05 – 0,1) $E_{\text{ін}} = 0,1$; втрати посівного матеріалу при його культивуванні в колбах, частка (0,01 – 0,05) $E_{\text{кол}} = 0,01$.

6.1 Розрахунок кількості виробничих циклів

Кількість лізину за цикл,

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 \cdot T_{\text{рд}} = 1605 \cdot 1000 \cdot 82 / 24 \cdot 190 = 28\,611 \text{ кг}$$

Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = T_{\text{рд}} / T_{\text{цф}} = 190 \cdot 24 / 82 = 55,6 \quad \text{Приймаємо 56 циклів.}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$V_{\text{кр}} = K_1 G_{\text{цк}} C_{\text{Ргп}} / P_{\text{кр}} \cdot (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 28\,611 \cdot 0,93 / 102 \cdot (1 - 0,3) = 411 \text{ м}^3.$$

6.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

6.2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Оскільки одиничного ферментера такої потужності промисловість не виробляє беремо найбільший з відомих (табл 11.1 [56]) $V_{\text{гф}} = 100 \text{ м}^3$ при заданому коефіцієнті заповнення $K_3 = 0,6$ робочий об'єм буде становити

$$V_{\text{рф}} = V_{\text{гф}} \times K_3 = 100 \times 0,6 = 60 \text{ м}^3.$$

Кількість таких ферментерів складе $m_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / V_{\text{рф}} = 414 / 60 = 6,9$. Приймаємо 7 одиниць. Тоді уточнений коефіцієнт заповнення складе

$$K_{3\text{у}} = V_{\text{кр}} / m_{\text{ф}} \times V_{\text{гф}} = 414 / (7 \times 100) = 0,59$$

, що лежить в межах прийнятого.

Оскільки маємо 7 ферментерів, то приймає до розрахунку 7 ліній, кожна з яких має включати в себе усі апарати супроводу (реактори приготування ПС, інокулятори, посівні апарати). Розрахунок їх кількості будемо вести на 1 лінію.

6.2.2. Визначаємо кількість стадій підготовки посівного матеріалу

1) Робочий об'єм одного ферментера становить

$$V_{\text{роб1}} = 60 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Приймаємо $X_{\text{ф}} = 10\%$ або 0,1 частки.

Робочий об'єм ферментера $V_{\text{роб}}$ складається з об'єму поживного середовища $V_{\text{пс1}}$ та об'єму посівного матеріалу $V_{\text{пм1}}$. З врахуванням дози посівного матеріалу $X_{\text{пм1}}$ робочий об'єм ферментера $V_{\text{роб1}}$ складе:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{пс1}} + V_{\text{пс1}} \cdot X_{\text{ф}}$$

Звідси, об'єму поживного середовища $V_{\text{пс}}$ буде

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 60 / (1 + 0,1) = 54,5 \text{ м}^3$$

,а об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм1}}$ складе

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 60 - 54,5 = 5,5 \text{ м}^3$$

2) Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування мікроорганізмів у посівному апараті з робочим об'ємом $V_{\text{роб2}}$ з врахуванням втрат при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок крапливиносу $E_{\text{па2}} = 10\%$.

$$V_{\text{роб2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па2}}) = 5,5 / (1 - 0,1) = 6,1 \text{ м}^3$$

Найближчий за об'ємом ферментер має геометричний об'єм $V_{\text{гпа}} = 10 \text{ м}^3$, тоді його коефіцієнт заповнення складе

$$K_{\text{зап}} = V_{\text{роб2}} / V_{\text{гпа}} = 6,1 / 10 = 0,61$$

,що в межах прийнятого діапазону для ферментерів з барботером ($K_{\text{зап}} = 0,5 - 0,65$).

Для отримання посівного матеріалу в посівному апараті з робочим об'ємом $V_{\text{роб2}}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{\text{пс2}}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{\text{пм2}} = 10\%$ або 0,1 частки.

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб2}} / (1 + X_{\text{пм2}}) = 6,1 / (1 + 0,1) = 5,5 \text{ м}^3,$$

,а об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм2}}$ складе

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 6,1 - 5,5 = 0,6 \text{ м}^3 = 600 \text{ л}$$

3) Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування мікроорганізмів в інокуляторі 1 з робочим об'ємом $V_{роб3}$ з врахуванням втрат при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок краплевиносу $E_{па3} = 10\%$.

$$V_{роб3} = V_{пм2} / (1 - E_{па3}) = 600 / (1 - 0,1) = 667 \text{ л}$$

Найближчий за об'ємом ферментер (інокулятор) має геометричний об'єм $V_{гін1} = 1250$ л, тоді його коефіцієнт заповнення складе

$$K_{зап} = V_{роб3} / V_{гін1} = 667 / 1250 = 0,54$$

, що в межах прийнятого діапазону для ферментерів з барботером.

$$(K_{зап} = 0,5-0,65).$$

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 1 робочим об'ємом $V_{роб3}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{пс3}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм3} = 10\%$.

$$V_{пс3} = V_{роб3} / (1 + X_{пм3}) = 667 / (1 + 0,1) = 606 \text{ л}$$

,а об'єм посівного матеріалу $V_{пм3}$ складе

$$V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 667 - 606 = 61 \text{ л}$$

4) Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування мікроорганізмів в інокуляторі 2 з робочим об'ємом $V_{роб4}$ з врахуванням втрат при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок краплевиносу $E_{па4} = 10\%$.

$$V_{роб4} = V_{пм3} / (1 - E_{па4}) = 61 / (1 - 0,1) = 68 \text{ л}$$

Найближчий за об'ємом ферментер (інокулятор) має геометричний об'єм $V_{гін2} = 100$ л, тоді його коефіцієнт заповнення складе

$$K_{зап} = V_{роб4} / V_{гін2} = 68 / 100 = 0,68$$

що в межах прийнятого діапазону для ферментерів з барботером

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 2 робочим об'ємом $V_{роб4}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{пс4}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм4} = 10\%$.

$$V_{пс4} = V_{роб4} / (1 + X_{пм4}) = 68 / (1 + 0,1) = 62 \text{ л}$$

,а об'єм посівного матеріалу $V_{пм4}$ складе

$$V_{пм4} = V_{роб4} - V_{пс4} = 68 - 62 = 6 \text{ л}$$

5) Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування мікроорганізмів в інокуляторі 4 з робочим об'ємом $V_{роб5}$ з врахуванням втрат при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок крапливиносy $E_{па5} = 10\%$.

$$V_{роб5} = V_{пм4} / (1 - E_{па5}) = 6 / (1 - 0,1) = 6,7 \text{ л}$$

Найближчий за об'ємом ферментер (інокулятор) має геометричний об'єм $V_{гін3} = 10$ л, тоді його коефіцієнт заповнення складе

$$K_{зап} = V_{роб5} / V_{гін3} = 6,7 / 10 = 0,67$$

що в межах прийнятого діапазону для ферментерів з барботером

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі 3 робочим об'ємом $V_{роб5}$ необхідно приготувати наступну кількість поживного середовища $V_{пс5}$ з врахуванням дози посівного матеріалу $X_{пм5} = 10\%$.

$$V_{пс5} = V_{роб5} / (1 + X_{пм5}) = 6,7 / (1 + 0,1) = 6,1 \text{ л}$$

,а об'єм посівного матеріалу $V_{пм4}$ складе

$$V_{пм5} = V_{роб5} - V_{пс5} = 6,7 - 6,1 = 0,6 \text{ л}$$

6) Таку кількість інокуляту можна одержати під час вирощування в качалочних колбах геометричним об'ємом $V_{колб} = 750$ мл. Втрати при вирощуванні посівного матеріалу за рахунок крапливиносy відсутні. Коефіцієнт заповнення колб становить $K_{зап} = 0,2$. Кількість качалочних колб складає

$$N_{колб} = V_{пм5} / (V_{колб} \times K_{зап}) = 0,6 / (0,75 \times 0,2) = 4.$$

Приймаємо 4 качалочні колби.

Для зручності результати розрахунку представимо у вигляді таблиці

6.2.2.1.

Таблиця 6.2.2.1.

Результати розрахунку

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{г}, \text{м}^3 (\text{л})$	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{роб}, \text{м}^3 (\text{л})$	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}, \text{м}^3 (\text{л})$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}, \text{м}^3 (\text{л})$
1	2	3	4	5	6
1.	100	0,6	60	54,5	5,5
2.	10	0,61	6,1	5,5	0,6

3.	1250 (л)	0,54	667 (л)	606 (л)	61 (л)
4.	100 (л)	0,68	68 (л)	62 (л)	6 (л)
5.	10 (л)	0,67	6,7 (л)	6,1 (л)	0,6 (л)
6.	0,75 (л)	0,2	0,6 (л)	0,55 (л)	0,05 (л)

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу лакази у ферментері об'ємом 100 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити в 5 етапів, шостим буде етап виробничого культивування.

Стадії культивування:

I стадія – вирощування в лабораторії (у колбах на качалці);

II стадія – вирощування в інокуляторі 3 об'ємом 10 л;

III стадія – вирощування в інокуляторі 2 об'ємом 100 л;

IV стадія – вирощування в інокуляторі 1 об'ємом 1250 м^3 ;

V стадія – культивування у посівному апараті об'ємом 10 м^3 .

VI стадія – культивування у ферментері об'ємом 100 м^3 .

6.2.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері геометричним об'ємом 100 м^3

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складають:

$G_{\text{заг}} = V_{\text{пс}} C_{\Sigma} = 54,5 \cdot 126,2 = 6867 \text{ кг}$, в тому числі покомпонентно, кг:

М'яса – $G_1 = G_{\text{заг}} (C_1/C_{\Sigma}) = 6867 (40/126,2) = 2177$

Гідролізат кормових дріжджів – $G_2 = G_{\text{заг}} (C_2/C_{\Sigma}) = 6867 (55/126,2) = 2993$

Кукурудзяний екстракт – $G_3 = G_{\text{заг}} (C_3/C_{\Sigma}) = 6867 (20/126,2) = 1088$

NH_4Cl – $G_4 = G_{\text{заг}} (C_4/C_{\Sigma}) = 6867 (10/126,2) = 544$

$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ – $G_5 = G_{\text{заг}} (C_5/C_{\Sigma}) = 6867 (1/126,2) = 54,4$

L-лейцин – $G_6 = G_{\text{заг}} (C_6/C_{\Sigma}) = 6867 (0,2/126,2) = 11$

Тіамін – $G_7 = G_{\text{заг}} (C_7/C_{\Sigma}) = 6867 (0,00025/126,2) = 0,014$

Біотин – $G_8 = G_{\text{заг}} (C_8/C_{\Sigma}) = 6867 (0,00025/126,2) = 0,014$

Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає

$$V_{\text{пс}} = 54,5 \text{ м}^3.$$

Враховуючи, що під час виробничого біосинтезу в ферментер порціями вноситься розчин меляси (з розрахунку 100 г/л), кількість якої становитиме, кг:

$$54,5 \cdot 100 = 5450$$

, для розбавлення якої необхідна така ж кількість води.

Тож, об'єм підживлюючого розчину становитиме:

$$V_{\text{пж}} = 5450 + 5450 = 10900 \text{ л.}$$

Тоді об'єм поживного середовища для початкового заповнення ферментеру становитиме:

$$V_{\text{ст}} = 54500 - 10900 = 43600 \text{ л.}$$

Даний об'єм поживного середовища доцільно стерилізувати в УБС потужністю 20 м³. При цьому частка конденсату, що утворюватиметься – $K_{\text{кон}}$ становитиме 0,2 кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{фк}} = 43600 \cdot 0,2 = 8720 \text{ л.}$$

При стерилізації підживлюючого розчину в реакторі-змішувачі частка конденсату становитиме 0,1:

$$V_{\text{пжк}} = 10900 \cdot 0,1 = 1090 \text{ л.}$$

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде, л :

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пс}} - V_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} - V_{\text{пж}} - V_{\text{пжк}} = 54500 - 6867 - 8720 - 10900 - 1090 = 26923$$

Формування композицій

Таблиця 6.2.3.1

Склад композицій для стерилізації поживного середовища ферментера в УБС

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 54,5 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
--------------------------------	------------	---	------------	------------------------

Меляса	40	2177	А	42 510
Гідролізат кормових дріжджів	55	2993		
Кукурудзяний екстракт	20	1088		
NH ₄ Cl	10	544		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	54,4		
L-лейцин	0,2	11		
Тіамін	0,00025	0,014		
Біотин	0,00025	0,014		
Вода		26923		
Конденсат 20%		8720		
Меляса	100	5450	Підживлюючий розчин	11 990
Вода		5450		
Конденсат		1090		
Разом:		54 500		54 500

Все поживне середовище буде стерилізуватися за допомогою УБС (потужністю 20 м³/год) при рН 7.

6.2.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 м³

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{па}} = V_{\text{пмф}} / (1 - E_{\text{па}}) = 5,5 / (1 - 0,1) = 6,1 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

$$V_{\text{псп}} = V_{\text{па}} / (1 + X_{\text{па}}) = 6,1 / (1 + 0,1) = 5,5 \text{ м}^3$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання посівного апарата:

$$V_{\text{пмп}} = V_{\text{па}} - V_{\text{псп}} = 6,1 - 5,5 = 600 \text{ л.}$$

Згідно з прийнятим складом загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псп}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псп}} C_{\Sigma} = 5,5 \cdot 226,2 = 1244 \text{ кг, в тому числі:}$$

$$\text{Меляса} - G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 1244 (140 / 226,2) = 770$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 1244 (55 / 226,2) = 303$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 1244 (20 / 226,2) = 110$$

$$\text{NH}_4\text{Cl} - G_4 = G_{\text{заг}}(C_4/C_{\Sigma}) = 1244 (10/226,2) = 55$$

$$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 - G_5 = G_{\text{заг}}(C_5/C_{\Sigma}) = 1244 (1/226,2) = 5,5$$

$$\text{L-лейцин} - G_6 = G_{\text{заг}}(C_6/C_{\Sigma}) = 1244 (0,2/226,2) = 1,1$$

$$\text{Тіамін} - G_7 = G_{\text{заг}}(C_7/C_{\Sigma}) = 1244 (0,00025/226,2) = 0,001$$

$$\text{Біотин} - G_8 = G_{\text{заг}}(C_8/C_{\Sigma}) = 1244 (0,00025/226,2) = 0,001$$

Стерилізація компонентів в композиціях буде проводитись в окремих реакторах гострою парою, приймаємо $K_{\text{кон}} = 0,1$, тоді загальна кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{пак}} = V_{\text{псп}} K_{\text{кон}} = 5,5 \cdot 0,1 = 550 \text{ л.}$$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде становити:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псп}} - V_{\text{пак}} - G_{\text{заг}} = 5500 - 550 - 1244 = 3706 \text{ л.}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

$$\text{М'яса} - G_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_1/C_{\Sigma}) = 3706 (140/226,2) = 2294$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2/C_{\Sigma}) = 3706 (55/226,2) = 901$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3/C_{\Sigma}) = 3706 (20/226,2) = 328$$

$$\text{NH}_4\text{Cl} - G_{4\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4/C_{\Sigma}) = 3706 (10/226,2) = 164$$

$$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 - G_{5\text{в}} = V_{\text{в}} (C_5/C_{\Sigma}) = 3706 (1/226,2) = 16,4$$

$$\text{L-лейцин} - G_{6\text{в}} = V_{\text{в}} (C_6/C_{\Sigma}) = 3706 (0,2/226,2) = 3,3$$

$$\text{Тіамін} - G_{7\text{в}} = V_{\text{в}} (C_7/C_{\Sigma}) = 3706 (0,00025/226,2) = 0,004$$

$$\text{Біотин} - G_{8\text{в}} = V_{\text{в}} (C_8/C_{\Sigma}) = 3706 (0,00025/226,2) = 0,004$$

Розраховуємо кількість конденсату покомпонентно, л

$$\text{М'яса} - G_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C_1/C_{\Sigma}) = 550 (140/226,2) = 340$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_{2\text{к}} = V_{\text{к}} (C_2/C_{\Sigma}) = 550 (55/226,2) = 134$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_{3\text{к}} = V_{\text{к}} (C_3/C_{\Sigma}) = 550 (20/226,2) = 49$$

$$\text{NH}_4\text{Cl} - G_{4\text{к}} = V_{\text{к}} (C_4/C_{\Sigma}) = 550 (10/226,2) = 24$$

$$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 - G_{5\text{к}} = V_{\text{к}} (C_5/C_{\Sigma}) = 550 (1/226,2) = 2,4$$

Формування композицій:

Таблиця 6.2.4.1.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощуванні
посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 м³**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,5 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Меляса	140	770	А	5 229
Вода		2294		
Конденсат		340		
Гідролізат кормових дріжджів	55	303		
Вода		901		
Конденсат		134		
Кукурудзяний екстракт	20	110		
Вода		328		
Конденсат		49		
NH ₄ Cl	10	55	Б	267
Вода		164		
Конденсат		24		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	5,5		
Вода		16,4		
Конденсат		2,4		
L-лейцин	0,2	1,1	*В	4
Вода		3,3		
Тіамін	0,00025	0,001		
Вода		0,004		
Біотин	0,00025	0,001		
Вода		0,004		
Разом:		5 500		5 500

* композиція В готується в лабораторному посуді і стерилізується в автоклаві.

**6.2.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для
вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1,25 м³**

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{ін1}} = V_{\text{ппп}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 606 / (1 - 0,1) = 673 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в ферментері буде:

$$V_{\text{псі1}} = V_{\text{ін1}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 673 / (1 + 0,1) = 612 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання інокулятора:

$$V_{\text{пмі1}} = V_{\text{ін1}} - V_{\text{псі1}} = 673 - 612 = 61 \text{ л.}$$

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псі1}} C_{\Sigma} = 612 \cdot 226,2 = 138434 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г}$$

$$\text{Меяса} - G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 138434 (140 / 226,2) = 85680$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 138434 (55 / 226,2) = 33660$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 138434 (20 / 226,2) = 12240$$

$$\text{NH}_4\text{Cl} - G_4 = G_{\text{заг}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 138434 (10 / 226,2) = 6120$$

$$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 - G_5 = G_{\text{заг}} (C_5 / C_{\Sigma}) = 138434 (1 / 226,2) = 612$$

$$\text{L-лейцин} - G_6 = G_{\text{заг}} (C_6 / C_{\Sigma}) = 138434 (0,2 / 226,2) = 122$$

$$\text{Тіамін} - G_7 = G_{\text{заг}} (C_7 / C_{\Sigma}) = 138434 (0,00025 / 226,2) = 0,2$$

$$\text{Біотин} - G_8 = G_{\text{заг}} (C_8 / C_{\Sigma}) = 138434 (0,00025 / 226,2) = 0,2$$

Оскільки стерилізація компонентів в композиціях буде проводиться в окремих реакторах гострою парою, приймаємо $K_{\text{кон}} = 0,1$, тоді загальна кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{к}} = V_{\text{псі1}} K_{\text{кон}} = 612 \cdot 0,1 = 61,2 \text{ л.}$$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псі1}} - V_{\text{к}} - G_{\text{заг}} = 612 - 61,2 - 138,434 = 412,4 \text{ л.}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

$$\text{Меяса} - G_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 412,4 (140 / 226,2) = 255$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 412,4 (55 / 226,2) = 100$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 412,4 (20 / 226,2) = 37$$

$$\text{NH}_4\text{Cl} - G_{4\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 412,4 (10 / 226,2) = 18$$

$$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 - G_{5\text{в}} = V_{\text{в}} (C_5 / C_{\Sigma}) = 412,4 (1 / 226,2) = 2$$

$$\text{L-лейцин} - G_{6\text{в}} = V_{\text{в}} (C_6 / C_{\Sigma}) = 412,4 (0,2 / 226,2) = 0,4$$

$$\text{Тіамін} - G_{7\text{в}} = V_{\text{в}} (C_7 / C_{\Sigma}) = 412,4 (0,00025 / 226,2) = 0,001$$

$$\text{Біотин} - G_{8\text{в}} = V_{\text{в}} (C_8/C_{\Sigma}) = 412,4 (0,00025/226,2) = 0,001$$

Розраховуємо кількість конденсату покомпонентно, л.

$$\text{Меляса} - G_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C_1/C_{\Sigma}) = 61,2(140/226,2) = 38$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_{2\text{к}} = V_{\text{к}} (C_2/C_{\Sigma}) = 61,2(55/226,2) = 15$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_{3\text{к}} = V_{\text{к}} (C_3/C_{\Sigma}) = 61,2(20/226,2) = 5,4$$

$$\text{NH}_4\text{Cl} - G_{4\text{к}} = V_{\text{к}} (C_4/C_{\Sigma}) = 61,2(10/226,2) = 3$$

$$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 - G_{5\text{к}} = V_{\text{к}} (C_5/C_{\Sigma}) = 61,2(1/226,2) = 0,3$$

Формування композицій:

Таблиця 6.2.5.1.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1,25 м³**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 612 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Меляса	140	85,7	А	582
Вода		255		
Конденсат		38		
Гідролізат кормових дріжджів	55	33,7		
Вода		100		
Конденсат		15		
Кукурудзяний екстракт	20	12,2		
Вода		37		
Конденсат		5,4	Б	30
NH ₄ Cl	10	6,1		
Вода		18		
Конденсат		3		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	0,6		
Вода		2		
Конденсат		0,3		

L-лейцин	0,2	0,1	*В	0,5
Вода		0,4		
Тіамін	0,00025	0,0002		
Вода		0,001		
Біотин	0,00025	0,0002		
Вода		0,001		
Разом:		612		612

* композиція В готується в лабораторному посуді і стерилізується в автоклаві.

6.2.6 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в малому інокуляторі становить:

$$V_{\text{ін2}} = V_{\text{пмі1}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 61 / (1 - 0,1) = 68 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі становить:

$$V_{\text{псі2}} = V_{\text{ін2}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 68 / (1 + 0,1) = 62 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання інокулятора:

$$V_{\text{пмі2}} = V_{\text{ін2}} - V_{\text{псі2}} = 68 - 62 = 6 \text{ л.}$$

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псі2}} C_{\Sigma} = 62 \cdot 226,2 = 14024 \text{ г, в тому числі, г:}$$

$$\text{М'яса} - G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 14024 (140 / 226,2) = 8670$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 14024 (55 / 226,2) = 3410$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 14024 (20 / 226,2) = 1240$$

$$\text{NH}_4\text{Cl} - G_4 = G_{\text{заг}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 14024 (10 / 226,2) = 620$$

$$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 - G_5 = G_{\text{заг}} (C_5 / C_{\Sigma}) = 14024 (1 / 226,2) = 62$$

$$\text{L-лейцин} - G_6 = G_{\text{заг}} (C_6 / C_{\Sigma}) = 14024 (0,2 / 226,2) = 12$$

$$\text{Тіамін} - G_7 = G_{\text{заг}} (C_7 / C_{\Sigma}) = 14024 (0,00025 / 226,2) = 0,02$$

$$\text{Біотин} - G_8 = G_{\text{заг}} (C_8 / C_{\Sigma}) = 14024 (0,00025 / 226,2) = 0,02$$

Оскільки стерилізація компонентів в композиціях буде проводитись в окремих реакторах гострою парою, приймаємо $K_{\text{кон}} = 0,1$, тоді загальна кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{к}} = V_{\text{псі2}} K_{\text{кон}} = 62 \cdot 0,1 = 6,2 \text{ л.}$$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псі2}} - V_{\text{к}} - G_{\text{заг}} = 62 - 6,2 - 14 = 42 \text{ л.}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

$$\text{Меляса} - G_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_1/C_{\Sigma}) = 42 (140/226,2) = 26$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2/C_{\Sigma}) = 42 (55/226,2) = 10$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3/C_{\Sigma}) = 42 (20/226,2) = 4$$

$$\text{NH}_4\text{Cl} - G_{4\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4/C_{\Sigma}) = 42 (10/226,2) = 2$$

$$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 - G_{5\text{в}} = V_{\text{в}} (C_5/C_{\Sigma}) = 42 (1/226,2) = 0,2$$

$$\text{L-лейцин} - G_{6\text{в}} = V_{\text{в}} (C_6/C_{\Sigma}) = 42 (0,2/226,2) = 0,04$$

$$\text{Тіамін} - G_{7\text{в}} = V_{\text{в}} (C_7/C_{\Sigma}) = 42 (0,00025/226,2) = 0,00004$$

$$\text{Біотин} - G_{8\text{в}} = V_{\text{в}} (C_8/C_{\Sigma}) = 42 (0,00025/226,2) = 0,00004$$

Розраховуємо кількість конденсату покомпонентно, л.

$$\text{Меляса} - G_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C_1/C_{\Sigma}) = 6,2 (140/226,2) = 4$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_{2\text{к}} = V_{\text{к}} (C_2/C_{\Sigma}) = 6,2 (55/226,2) = 2$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_{3\text{к}} = V_{\text{к}} (C_3/C_{\Sigma}) = 6,2 (20/226,2) = 0,6$$

Формування композицій:

Таблиця 6.2.6.1.

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 63 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
--------------------------------	------------	--	------------	------------------------

Меляса	140	8,7	А	60
Вода		26		
Конденсат		4		
Гідролізат кормових дріжджів	55	3,4		
Вода		10		
Конденсат		2		
Кукурудзяний екстракт	20	1,2		
Вода		4		
Конденсат		0,6		
NH ₄ Cl	10	0,6	*Б	2,9
Вода		2		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	0,06		
Вода		0,2		
L-лейцин	0,2	0,01	*В	0,1
Вода		0,04		
Тіамін	0,00025	0,00002		
Вода		0,00004		
Біотин	0,00025	0,00002		
Вода		0,00004		
Разом:		63		63

* композиції Б та В готують в лабораторному посуді і стерилізують в автоклаві.

6.2.7 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в малому інокуляторі об'ємом 10 л

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в малому інокуляторі становить:

$$V_{\text{ін3}} = V_{\text{пмі2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 6 / (1 - 0,1) = 6,7 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі становить:

$$V_{\text{псі3}} = V_{\text{ін3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 6,7 / (1 + 0,1) = 6,1 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання інокулятора:

$$V_{\text{кол}} = V_{\text{ін3}} - V_{\text{псі2}} = 6,7 - 6,1 = 0,6 \text{ л.}$$

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псіз}} C_{\Sigma} = 6,1 \cdot 226,2 = 1380 \text{ г, в тому числі, г:}$$

$$\text{Меляса} - G_1 = G_{\text{заг}} (C_1/C_{\Sigma}) = 1380 (140/226,2) = 854$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_2 = G_{\text{заг}} (C_2/C_{\Sigma}) = 1380 (55/226,2) = 336$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_3 = G_{\text{заг}} (C_3/C_{\Sigma}) = 1380 (20/226,2) = 122$$

$$\text{NH}_4\text{Cl} - G_4 = G_{\text{заг}} (C_4/C_{\Sigma}) = 1380 (10/226,2) = 61$$

$$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 - G_5 = G_{\text{заг}} (C_5/C_{\Sigma}) = 1380 (1/226,2) = 6,1$$

$$\text{L-лейцин} - G_6 = G_{\text{заг}} (C_6/C_{\Sigma}) = 1380 (0,2/226,2) = 1,2$$

$$\text{Тіамін} - G_7 = G_{\text{заг}} (C_7/C_{\Sigma}) = 1380 (0,00025/226,2) = 0,002$$

$$\text{Біотин} - G_8 = G_{\text{заг}} (C_8/C_{\Sigma}) = 1380 (0,00025/226,2) = 0,002$$

Оскільки стерилізація компонентів в композиціях буде проводиться в автоклаві в окремих закритих ємностях без подачі гострої пари в ПС, крім композиції А, конденсат не утворюється і в розрахунках не враховується.

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псіз}} - V_{\text{Ак}} - G_{\text{заг}} = 6,1 - 0,45 - 1,4 = 4,25 \text{ л.}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

$$\text{Меляса} - G_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_1/C_{\Sigma}) = 4,25 (140/226,2) = 2,6$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2/C_{\Sigma}) = 4,25 (55/226,2) = 1$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3/C_{\Sigma}) = 4,25 (20/226,2) = 0,4$$

$$\text{NH}_4\text{Cl} - G_{4\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4/C_{\Sigma}) = 4,25 (10/226,2) = 0,2$$

$$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 - G_{5\text{в}} = V_{\text{в}} (C_5/C_{\Sigma}) = 4,25 (1/226,2) = 0,02$$

$$\text{L-лейцин} - G_{6\text{в}} = V_{\text{в}} (C_6/C_{\Sigma}) = 4,25 (0,2/226,2) = 0,04$$

$$\text{Тіамін} - G_{7\text{в}} = V_{\text{в}} (C_7/C_{\Sigma}) = 4,25 (0,00025/226,2) = 0,00001$$

$$\text{Біотин} - G_{8\text{в}} = V_{\text{в}} (C_8/C_{\Sigma}) = 4,25 (0,00025/226,2) = 0,00001$$

Розраховуємо кількість конденсату для композиції А, л.

$$V_{\text{Ак}} = 0,1 * V_{1\text{в}} = 0,1 \cdot 3 = 0,45$$

$$\text{Меляса} - G_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C_1/C_{\Sigma}) = 0,45 (140/226,2) = 0,3$$

$$\text{Гідролізат кормових дріжджів} - G_{2\text{к}} = V_{\text{к}} (C_2/C_{\Sigma}) = 0,3 (55/226,2) = 0,1$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_{3\text{к}} = V_{\text{к}} (C_3/C_{\Sigma}) = 0,3 (20/226,2) = 0,04$$

Формування композицій:

Таблиця 6.2.7.1.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 10 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,1 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Меляса	140	0,85	А	5,6
Вода		2,6		
Конденсат		0,2		
Гідролізат кормових дріжджів	55	0,3		
Вода		1		
Конденсат		0,1		
Кукурудзяний екстракт	20	0,1		
Вода		0,4		
Конденсат		0,03		
NH ₄ Cl	10	0,06	*Б	0,3
Вода		0,2		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	0,006		
Вода		0,02		
L-лейцин	0,2	0,001	*В	0,04
Вода		0,04		
Тіамін	0,00025	0,00002		
Вода		0,00001		
Біотин	0,00025	0,00002		
Вода		0,00001		
Разом:		6,1		6,1

**композицію Б та В готують в лабораторному посуді і стерилізують в автоклаві.*

**6.2.8 Приготування та стерилізація поживного середовища для
вирощування в колбах на качалках**

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{псм}} = V_{\text{кол}} = 0,60 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{псм}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 0,6 / (1 + 0,05) = 0,5 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, л:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{псм}} - V_{\text{пск}} = 0,6 - 0,5 = 0,1 = 100 \text{ мл.}$$

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{пск}} C_{\Sigma} = 0,5 \cdot 100,2 = 50,1 \text{ г, в тому числі:}$$

$$\text{Меяса} - G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 50,1 (50 / 100,2) = 25$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 50,1 (40 / 100,2) = 20$$

$$\text{L-лейцин} - G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 50,1 (0,2 / 100,2) = 0,1$$

$$\text{CaCO}_3 - G_4 = G_{\text{заг}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 50,1 (10 / 100,2) = 5$$

Враховуючи малу кількість компонентів їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві при цьому конденсат не утворюється. Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пск}} - G_{\text{заг}} = 500 - 50,1 = 450 \text{ мл}$$

Розрахуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{Меяса} - G_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 450 (50 / 100,2) = 224$$

$$\text{Кукурудзяний екстракт} - G_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 450 (40 / 100,2) = 180$$

$$\text{L-лейцин} - G_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 450 (0,2 / 100,2) = 0,9$$

$$\text{CaCO}_3 - G_{4\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 450 (10 / 100,2) = 45$$

Формування композицій:

Таблиця 6.2.8.1.

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках об'ємом 750 мл

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 500 мл середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
--------------------------------	------------	---	------------	------------------------

Меляса	50	25	А	449
Вода		224		
Кукурудзяний екстракт	40	20		
Вода		180		
L-лейцин	0,2	0,1	Б	1
Вода		0,9		
CaCO ₃	10	5	В	50
Вода		45		
Разом:		500		500

Усі композиції готуються у лабораторному посуді і стерилізуються в автоклаві.

6.3 Розрахунок напівпродуктів та баластних речовин в культуральній рідині після виробничого біосинтезу

В результаті біосинтезу компоненти поживного середовища у ферментері перетворюються на біомасу, цільовий продукт та баластні речовини. При цьому частина компонентів втрачається через краплинос, частина ростового субстрату окислюється до вуглекислого газу і води для одержання енергії необхідної для процесів конструктивного метаболізму. Ці втрати залежать як від складу поживного середовища, так і виду біологічного агента і особливостей його метаболізму. Для спрощення розрахунків ці втрати $E_{\text{бс}}$ можна прийняти в діапазоні від 20 до 60%.

6.3.1 Кількість абсолютно сухих речовин в поживному середовищі для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 100 м³

$$G_{\text{загф}} = 6867 \text{ кг (див.п.6.2.3)}$$

6.3.2 Кількість абсолютно сухих речовин в посівному матеріалі з врахуванням втрат при вирощуванні в посівному апараті об'ємом 10 м³

$$E_{\text{п}} = 0,1 \text{ (частка)}$$

$$G_{\text{заг}} = 1244 \text{ кг (див.п.6.2.4)}$$

$$G_{\text{загп}} = G_{\text{заг}} (1 - E_{\text{п}}) = 1244 (1 - 0,1) = 1120 \text{ кг}$$

6.3.3 Загальна кількість абсолютно сухих речовин $G_{\text{срф}}$ у середовищі для виробничого біосинтезу становить

$$G_{\text{срф}} = G_{\text{загф}} + G_{\text{загп}} = 6867 + 1120 = 7987 \text{ кг}$$

6.3.4 Кількість втрат абсолютно сухих речовин $G_{втб}$ у культуральній рідині в процесі виробничого біосинтезу з врахуванням коефіцієнта втрат $E_{бс} = 0,5$ (частка).

$$G_{втб} = G_{срф} \times E_{бс} = 7987 \times 0,5 = 3994 \text{ кг}$$

6.3.5 Кількість абсолютно сухих речовин в культуральній рідині, що йде на подальшу переробку, становить:

$$G_{сркр} = G_{срф} - G_{втб} = 7987 - 3994 = 3993 \text{ кг}$$

6.3.6 Кількість культуральної рідини після виробничого біосинтезу, кг:

$$G_{кр} = V_{кр} \times \rho_{кр} = 54,5 \times 1050 = 57225 \text{ кг}$$

, де $\rho_{кр}$ – середня густина культуральної рідини ($\rho_{кр} = 1020 \dots 1050 \text{ кг/м}^3$).

6.3.7 Визначаємо кількість абсолютно сухої біомаси (АБС) в культуральній рідині

$$G_{абс} = V_{кр} \times P_{кр} = 54,5 \times 102 = 5559 \text{ кг}$$

6.3.8 Кількість абсолютно сухих баластних речовин в культуральній рідині становить

$$G_{брв} = G_{абс} - G_{сркр} = 5559 - 3993 = 1566 \text{ кг}$$

6.3.9 Кількість води, що міститься в культуральній рідині, складе

$$G_{води} = G_{кр} - G_{абс} - G_{брв} = 57225 - 5559 - 1566 = 50100 \text{ кг.}$$

6.4 Концентрування розчину лізину методом вакуум-випарювання

6.4.1 Приймаємо ступінь концентрування $K_{вв} = 2$

6.4.2 Об'єм концентрату лізину з врахуванням коефіцієнта втрат при вакуум-випарюванні $E_{вв} = 0,02$ (частка) складатиме

$$V_{кон} = G_{кр} \times (1 - E_{вв}) / K_{вв} = 57225 \times (1 - 0,02) / 2 = 28040 \text{ л.}$$

6.4.3 Втрати об'єму концентрату при вакуум-випарюванні

$$V_{втуф} = G_{кр} \times E_{вв} = 28040 \times 0,02 = 561 \text{ л.}$$

6.4.4 Маса абсолютно сухих речовин в концентраті з врахуванням втрат вакуум-випарювання $E_{вв} = 0,02$ (частка) складає

$$G_{аск} = (G_{брв} \times E_{оч}) \times (1 - E_{уф}) = (1566 \times 0,7) \times (1 - 0,02) = 1074 \text{ кг}$$

6.4.5 Вміст сухих речовин в концентраті становить,

$$CP_{кон} = G_{аск} \times 100 / V_{кон} = 1074 \times 100 / 28040 = 4 \text{ мас.}\%$$

6.4.6 Маса баластних речовин в пермеаті

$$G_{бр} = G_{брв} - G_{аск} = 1566 - 1074 = 492 \text{ кг.}$$

6.4.7 Об'єм пермеату після концентрування

$$V_{пер} = V_{кр} - V_{кон} - V_{втуф} = 54500 - 28040 - 561 = 25899 \text{ л.}$$

6.5 Сушіння концентрату методом розпилювання

6.5.1 Масу концентрату, що йде на сушіння, при його густині $\rho_{уф}$ (1050...1100), приймаємо $\rho_{уф} = 1050 \text{ кг/м}^3$

$$G_{кон} = V_{кон} \times \rho_{уф}/1000 = 28040 \times 1050/1000 = 29442 \text{ кг.}$$

6.5.2 Маса висушеного лізину з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні $E_{сш} = 0,1$ (частка) сухої речовини з повітрям, що виходить з сушарки, при стандартному вмісті сухих речовин в готовому продукті

$$CP_{гп} = (1 - W_B) = 0,88 \text{ (частка)}$$

$$G_{сш} = G_{аск} \times (1 - E_{сш})/CP_{гп} = 1074 \times (1 - 0,1)/0,88 = 1098 \text{ кг}$$

6.5.3 Маса води, що підлягає видаленню з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні $E_{сш} = 0,1$ (частка)

$$W_{сш} = G_{кон} \times (1 - E_{сш}) - G_{сш} = 29442 \times (1 - 0,1) - 1098 = 25400 \text{ кг}$$

6.6 Стадія ПМВ. Пакування, маркування, відвантаження

6.6.1 Сухий порошок лізину розфасовують в поліетиленові пакети по 25 кг, а потім у крафт-мішки. Втрати при фасуванні складають $E_{уп} = 0,01$

Кількість порошку для фасування з урахуванням втрат складає:

$$G_{уп} = (G_{сш} + G_{нап}) \times (1 - E_{уп}) = (1098 + 0) \times (1 - 0,01) = 1087$$

або кількість крафт-мішків при заповненні $N_{п} = 25 \text{ кг}$ складає

$$N_{пк} = G_{уп} / N_{п} = 1087/25 = 44 \text{ крафт-мішків}$$

6.6.2 Механічні втрати порошку при фасуванні становлять

$$G_{вгм} = (G_{сш} + G_{нап}) - G_{уп} = (1098 + 0) - 1087 = 11 \text{ кг}$$

Похибка продуктового розрахунку складає

$$\Delta = (G_{уп} + G_{пк}) \times 100 / G_{уп} = (1087 - 1078) \times 100 / 1087 = 1 \%$$

,що значно менше заданої точності $\pm 10\%$. Отже, можна зробити висновок, що продуктивний розрахунок зроблено вірно.

6.7 Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 6.7.

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм ³	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм ³
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ 750 мл,(л)			
1.1.	Меляса	0.025	Нестерильне ПС	0.5
1.2.	Кукурудзяний екстракт	0.02		
1.3.	CaCO ₃	0.0001		
1.4.	L-лейцин	0.005		
1.5.	Вода	0.45		
	Всього:	0.5	Всього:	0.5
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ			
2.1.	Нестерильне ПС	0.5	Стерильне ПС	0.5
	Всього:	0.5	Всього:	0.5
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ 750 мл, (л)			
3.1.	Стерильне ПС	0.5	Посівний матеріал	0.6
3.2.	Посівний матеріал з колби	0.1		
	Всього:	0.6	Всього:	0.6
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА 10 л			
4.1.	Меляса	0.85	Нестерильне ПС	5.6
4.2.	Гідролізат кормових дріжджів	0.3		
4.3.	Кукурудзяний екстракт	0.1		
4.4.	NH ₄ Cl	0.06		
4.5.	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.006		
4.6.	L-лейцин	0.001		
4.7.	Тіамін	0.00002		
4.8.	Біотин	0.00002		
4.9.	Вода	4.25		
	Всього:	5.6	Всього:	5.6

5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА 10 л			
5.1.	Нестерильне ПС	5.62	Стерильне ПС	6.1
5.2.	Конденсат	0.45	(втрат немає)	0.0
	Всього:	6.1	Всього:	6.1
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В МАЛОМУ ІНОКУЛЯТОРІ			
6.1.	Стерильне ПС	6.1	Посівний матеріал	6.1
6.2.	Посівний матеріал з колб на качалках	0.5		
6.3.	Втрати (частка)	0.1		
	Всього:	6.7	Всього:	6.7
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 100 л			
7.1.	Меляса	8.7	Нестерильне ПС	56
7.2.	Гідролізат кормових дріжджів	3.4		
7.3.	Кукурудзяний екстракт	1.2		
7.4.	NH ₄ Cl	0.6		
7.5.	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.06		
7.6.	L-лейцин	0.01		
7.7.	Тіамін	0.00002		
7.8.	Біотин	0.00002		
7.9.	Вода	42		
	Всього:	56	Всього:	56
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 100 л			
8.1.	Нестерильне ПС	56	Стерильне ПС	62
8.2.	Конденсат	6.2	(втрат немає)	0.0
	Всього:	62	Всього:	62
9.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ 100 л			
9.1.	Стерильне ПС	62	Посівний матеріал	62
9.2.	Посівний матеріал з малого інокулятора	6.1		
9.3.	Втрати (частка)	0.1		
	Всього:	68.2	Всього:	68.2
10.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 1250 л			
10.1.	Меляса	85.7	Нестерильне ПС	550.8
10.2.	Гідролізат кормових дріжджів	33.7		

10.3.	Кукурудзяний екстракт	12.2		
10.4.	NH ₄ Cl	6.1		
10.5.	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.6		
10.6.	L-лейцин	0.1		
10.7.	Тіамін	0.0002		
10.8.	Біотин	0.0002		
10.9.	Вода	412.4		
	Всього:	550.8	Всього:	550.8
11.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 1250 л			
11.1.	Нестерильне ПС	550.8	Стерильне ПС	612
11.2.	Конденсат	61.2	(втрат немає)	0.0
	Всього:	612	Всього:	612
12.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ 1250 л			
12.1.	Стерильне ПС	612	Посівний матеріал	612
12.2.	Посівний матеріал з інокулятора	62		
12.3.	Втрати (частка)	0.1		
	Всього:	674.1	Всього:	674.1
13.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ 10 м ³			
13.1.	Меляса	770	Нестерильне ПС	4.95
13.2.	Гідролізат кормових дріжджів	303		
13.3.	Кукурудзяний екстракт	110		
13.4.	NH ₄ Cl	55		
13.5.	(NH ₄) ₂ HPO ₄	5.5		
13.6.	L-лейцин	1.1		
13.7.	Тіамін	0.001		
13.8.	Біотин	0.001		
13.9.	Вода	3706		
	Всього:	4.95	Всього:	4.95
14.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ 10 м ³			
14.1.	Нестерильне ПС	4.95	Стерильне ПС	5.5
14.2.	Конденсат	0.550		
	Всього:	5.5	Всього:	5.5
15.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ 10 м ³			

15.1.	Стерильне ПС	5.5	Посівний матеріал	6.4
15.2.	Посівний матеріал	0.6		
15.3.	Втрати (частка)	0.3	Втрати (кількість)	
	Всього:	6.4	Всього:	6.4
16.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА 100 м ³			
16.1.	Меляса	2177	Нестерильне ПС	44.690
16.2.	Гідролізат кормових дріжджів	2993		
16.3.	Кукурудзяний екстракт	1088		
16.4.	NH ₄ Cl	544		
16.5.	(NH ₄) ₂ HPO ₄	54,4		
16.6.	L-лейцин	11		
16.7.	Тіамін	0,014		
16.8.	Біотин	0,014		
16.9.	Підживлюючий розчин меляси	5450		
16.10	Вода	32.373		
	Всього:	44.690	Всього:	44.690
17.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА 100 м ³			
17.1.	Нестерильне ПС	44.690	Стерильне ПС	54.5
17.2.	Конденсат – 20%	9810		
	Всього:	54.5	Всього:	54.5
18.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ 100 м ³			
18.1.	Стерильне поживне середовище	54.5	Культуральна рідина на концентрування	54.5
18.2.	Посівний матеріал з посівного апарата	5.5		
18.3.	Втрати (частка)	0.1	Втрати (кількість)	
	Всього:	60	Всього:	60
19.	КОНЦЕНТРУВАННЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ЛІЗИНУ МЕТОДОМ ВАКУУМ-ВИПАРЮВАННЯ			
	КР на концентрування, м ³	54.5	Концентрат	22.9
			Пермеат	27
	Втрати	0.2	Втрати	4.6
	Всього:	54.5	Всього:	54.5
20.	СУШІННЯ КОНЦЕНТРАТУ			
	Концентрат, кг	24	Сухий лізин	0.9

			Видалена волога, кг	20.7
	Втрати	0.1	Втрати	2.4
	Всього:	24	Всього:	24
21.	ФАСУВАННЯ, УПАКУВАННЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ			
	Готовий продукт	897	Упакований продукт	888
	Крафт-мішки (25 кг)			36
	Втрати	0.01	Втрати	9
	Всього:	897	Всього:	897

Похибка продуктового розрахунку складає

$$\Delta = (G_{\text{уп}} + G_{\text{цк}}) \times 100 / G_{\text{уп}} = (897 - 888) \times 100 / 888 = 1 \%$$

,що значно менше заданої точності $\pm 10\%$. Отже, можна зробити висновок, що продуктовий розрахунок зроблено вірно.

6.8 Розрахунок обладнання

6.8.1 Розрахунок ферментаційної та ємнісної апаратури

Згідно результатів продуктового розрахунку та матеріального балансу здійснюється розрахунок ферментаційної та ємнісної апаратури для приготування та стерилізації компонентів поживного середовища. Приймають наступні коефіцієнти заповнення апаратури К:

$K_{\text{ф}}$ – коефіцієнт заповнення ферментера, посівного апарата, інокулятора, частка:

- Барботажного-0,45 – 0,55
- Комбінованого- 0,5 – 0,65

Коефіцієнт заповнення качалочних колб $K_{\text{кол}} = 0,18-0,2$

Коефіцієнт заповнення збірників -0,7-0,85

При виборі геометричного об'єму ферментаційної та ємнісної апаратури керуються даними виробника або стандартними таблицями (див. Таблиця 11.1).

Якщо перевіірочний коефіцієнт не вкладається у вибрані межі, то змінюють кількість апаратів і відповідно їх сумарний геометричний об'єм.

6.8.2 Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів

Оскільки одиничного ферментера такої потужності промисловість не виробляє беремо найбільший з відомих (*табл 11.1* [56]) $V_{гф} = 100 \text{ м}^3$ при заданому коефіцієнті заповнення $K_3 = 0,6$ робочий об'єм буде становити

$$V_{рф} = V_{гф} \times K_3 = 100 \times 0,6 = 60 \text{ м}^3.$$

Кількість таких ферментерів складе $m_{ф} = V_{кр}/V_{рф} = 414/60 = 6,9$. Приймаємо 7 одиниць. Тоді уточнений коефіцієнт заповнення складе

$K_{зф} = V_{кр}/m_{ф} \times V_{гф} = 414/(7 \times 100) = 0,59$, що лежить в межах прийнятого.

Оскільки маємо 7 ферментерів, то приймає до розрахунку 7 ліній, кожна з яких має включати в себе усі апарати супроводу (реактори приготування ПС, інокулятори, посівні апарати). Розрахунок їх кількості будемо вести на 1 лінію.

6.8.3 Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_3 = 0,61$:

$$V_{гпа} = V_{па}/K_3 = 5,5/0,61 = 9 \text{ м}^3.$$

Вибираємо з таблиці (*табл 11.1* [56]) найближчий за номінальним об'ємом посівний апарат: $V_{ппа} = 10 \text{ м}^3$.

Кількість посівних апаратів при заданому K_3 :

$$N_{пар} = V_{гпа}/V_{ппа} = 9/10 = 0,9 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці посівних апаратів:

$$K_{зпа} = V_{па}/(V_{ппа} N_{пар}) = 5,5/(10 \cdot 1) = 0,55.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65), то приймаємо до установки посівних апаратів $N_{пар} + 1$ запасний.

6.8.4 Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів для отримання інокуляту об'ємом 606 л

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора 1 при заданому $K_3 = 0,54$:

$$V_{гін1} = V_{ін1}/K_3 = 606/0,54 = 1122 \text{ л}.$$

Вибираємо з таблиці (*табл 11.1* [56]) найближчий за номінальним об'ємом інокулятор: $V_{\text{ін1}} = 1250$ л.

Кількість інокуляторів при заданому $K_{\text{зін}}$:

$$N_{\text{ін1р}} = V_{\text{гін1}} / V_{\text{ін1}} = 1122/1250 = 0,9 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного з таблиці інокулятора:

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{ін1}} / (V_{\text{ін1}} N_{\text{ін1р}}) = 606/(1250 \cdot 1) = 0,5.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5 – 0,65), приймаємо до установки інокуляторів $N_{\text{ін1р}} + 1$ запасний.

6.8.5 Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів для отримання інокуляту об'ємом 62 л

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора 1 при заданому $K_3 = 0,68$:

$$V_{\text{гін2}} = V_{\text{ін2}} / K_3 = 62/0,68 = 91 \text{ л.}$$

Вибираємо з таблиці (*табл 11.1* [56]) найближчий за номінальним об'ємом інокулятор: $V_{\text{ін2}} = 100$ л.

Кількість інокуляторів при заданому $K_{\text{зін}}$:

$$N_{\text{ін1р}} = V_{\text{гін2}} / V_{\text{ін2}} = 91/100 = 0,9 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного з таблиці інокулятора:

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{ін2}} / (V_{\text{ін2}} N_{\text{ін2р}}) = 62/(100 \cdot 1) = 0,62.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5 – 0,65), приймаємо до установки інокуляторів $N_{\text{ін1р}} + 1$ запасний.

6.8.6 Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів для отримання інокуляту об'ємом 6,1 л

Приблизний загальний геометричний об'єм малого інокулятора при заданому $K_3 = 0,67$:

$$V_{\text{гін3}} = V_{\text{ін3}} / K_3 = 6,1/0,67 = 9,1 \text{ л.}$$

Вибираємо з таблиці (*табл 11.1* [56]) найближчий за номінальним об'ємом інокулятор: $V_{\text{ін3}} = 10$ л.

Кількість інокуляторів при заданому K_3 :

$$N_{\text{ін3р}} = V_{\text{гін3}} / V_{\text{ін3}} = 9,1/10 = 0,9 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці інокуляторів:

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{інз}} / (V_{\text{інз}} N_{\text{інзр}}) = 6,1 / (10 \cdot 1) = 0,5.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5 – 0,65), приймаємо до установки інокуляторів $N_{\text{інзр}} + 1$ запасний.

6.8.7 Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

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

$$V_{\text{гколб}} = V_{\text{колб}} / K_{\text{колб}} = 0,55 / 0,2 = 2,75 \text{ л}$$

Об'єм 1 качалочної колби $V_{\text{нколб}} = 0,750 \text{ л}$.

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

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{гколб}} / V_{\text{нколб}} = 2,75 / 0,75 = 3,7 - \text{приймаємо 4 колб.}$$

6.9 Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища

Для вибору реакторів-змішувачів, збірників користуються таблицями композицій (табл 11.1 [56]) та таблицею Технічних характеристик ферментерів.

6.9.1. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 100 м³

Для приготування композиції А мелясу, гідролізат кормових дріжджів, кукурудзяний екстракт, солі та вітаміни подають в реактор-змішувач УБС. Підживлюючий розчин меляси готують також в окремому реакторі і після приготування подають в реактор-змішувач УБС.

Стерилізацію компонентів ПС в об'ємі

$V_{\text{ст}} = V_{\text{пс}} - V_{\text{кон}} = V_{\text{ст}} = 54500 - 9810 = 4469 \text{ л}$ або $44,7 \text{ м}^3$ проводять в УБС потужністю $20 \text{ м}^3/\text{год}$.

Час стерилізації становить $t = 44,7 / 20 = 2,2 \text{ год}$. Стерильне ПС з УБС передається безпосередньо в ферментер.

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача УБС. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{УБС}} = V_{\text{ст}}/K_{36} = 44,7/0,8 = 55,8 \text{ м}^3$$

Вибираємо з *табл 11.1* [56] найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 60 \text{ м}^3$.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{р}} = V_{\text{УБС}}/V_{\text{нр}} = 55,8/60 = 0,9. \text{ Приймаємо до установки 1 реактор.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3\text{р}} = V_{\text{ст}}/(V_{\text{нр}} N_{\text{р}}) = 44,7/(60 \cdot 1) = 0,7$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), то приймаємо до установки кількість реакторів УБС – 1.

б) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для підживлюючого розчину меляси. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}}/K_{36} = 5,45/0,8 = 6,8 \text{ м}^3$$

Вибираємо з *табл 11.1* [56] найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 7 \text{ м}^3$.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{Ар}} = V_{\text{Аг}}/V_{\text{нр}} = 6,8/7 = 0,9. \text{ Приймаємо - 1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3\text{р}} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}) = 5,45/(7 \cdot 1) = 0,8$$

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

6.9.2. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 м³

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}}/K_{36} = 5,2/0,8 = 6,5 \text{ м}^3$$

Вибираємо з *табл 11.1* [56] найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 7 \text{ м}^3$

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Аг}}/V_{\text{нр}} = 6,5/7 = 0,9 \text{ од. Приймаємо - 1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}}N_p) = 5,2/(7 \cdot 1) = 0,7$$

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

б) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Бг}} = V_{\text{Б}}/K_{36} = 267/0,8 = 333,7 \text{ л}$$

Вибираємо з *табл 11.1* [56] найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 400 \text{ л}$.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Бг}}/V_{\text{нр}} = 333,7/400 = 0,8. \text{ Приймаємо – 1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_{\text{Б}}/(V_{\text{нр}}N_p) = 267/(400 \cdot 1) = 0,7$$

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

6.9.3. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1250 л

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}}/K_{36} = 582/0,8 = 727,5 \text{ л}$$

Вибираємо з *табл 11.1* [56] найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 1000$ л

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_A/V_{\text{нр}} = 727,5/1000 = 0,7. \text{ Приймаємо } -1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_A/(V_{\text{нр}} N_p) = 582/(1000 \cdot 1) = 0,6$$

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

б) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції Б. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Бг}} = V_B/K_{36} = 30/0,8 = 37,5 \text{ л}$$

Вибираємо з *табл 11.1* [56] найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 40$ л. Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{\text{Бг}}/V_{\text{нр}} = 37,5/40 = 0,9. \text{ Приймаємо } -1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_B/(V_{\text{нр}} N_p) = 30/(40 \cdot 1) = 0,75$$

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

6.9.4 Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = V_A/K_{36} = 60/0,8 = 75 \text{ л}$$

Вибираємо з *табл 11.1* [56] найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 100$ л

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{Ag}/V_{np} = 75/100 = 0,7. \text{ Приймаємо } -1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_A/(V_{np} N_p) = 60/(100 \cdot 1) = 0,6$$

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

6.9.5 Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 10 л

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{Ag} = V_A/K_{36} = 5,6/0,8 = 7 \text{ л}$$

Вибираємо з *табл 11.1* [56] найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{np} = 10 \text{ л}$. Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_p = V_{Ag}/V_{np} = 7/10 = 0,7. \text{ Приймаємо } -1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_A/(V_{np} N_p) = 5,6/(10 \cdot 1) = 0,6$$

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

6.10 Розрахунок реактора змішувача для культуральної рідини після процесу біосинтезу

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для культуральної рідини після процесу біосинтезу. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{кр} = V_{кр}/K_{36} = 54,5/0,8 = 68 \text{ м}^3$$

Вибираємо з *табл 11.1* [56] найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 80 \text{ м}^3$. Оскільки номінальний та приблизний об'єм реактора співпадають уточнення коефіцієнта заповнення реактора не проводимо.

Відповідно цей реактор використовується в процесі концентрування культуральної рідини за допомогою вакуум-випарника.

6.11 Розрахунок вакуум-випарної установки для концентрування

Для розрахунку та підбору вакуум-випарної установки можна скористатись прикладом 7.1 наведеним у ([56]).

Вихідні дані:

Об'єм культуральної рідини $V_{\text{кр}} = 54,5 \text{ м}^3$

Маса абсолютно сухих речовин в концентраті $G_{\text{аск}} = 1074 \text{ кг}$

Коефіцієнт втрат при концентруванні $E_{\text{вв}}$ (1-3%). Приймаємо $E_{\text{вв}} = 0,02$ (частка).

6.12 Розрахунок розпилювальної сушильної установки

Для розрахунку розпилювальної сушильної установки слід скористатись прикладом 10.1.

Прийmemo час сушіння $\tau_{\text{суш}} = 24 \text{ год.}$

Об'єм концентрату, що йде на сушіння складає (п.6.5.1) $V_{\text{кон}} = 24 \text{ м}^3$

Підбираємо геометричний об'єм реактору для концентрату. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{зкон}} = V_{\text{кон}} / K_{36} = 24/0,8 = 30 \text{ м}^3$$

Вибираємо з *табл 11.1* [56] найближчий за номінальним об'ємом реактор:

$$V_{\text{снг}} = 32 \text{ м}^3$$

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить :

$$N_p = V_{\text{зкон}}/V_{\text{снг}} = 30/32 = 0,9. \text{ Приймаємо} - 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = V_{\text{сн}}/(V_{\text{снт}} N_p) = 24/(32 \cdot 1) = 0,7$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для концентрату – 1.

Маса концентрату, що йде на сушіння, при його густині $\rho_{\text{кц}} = 1050 \text{ кг/м}^3$

$$G_{\text{кон}} = V_{\text{кон}} \times \rho_{\text{уф}}/1000 = 22890 \times 1050/1000 = 24035 \text{ кг.}$$

Маса висушеного лізину з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні $E_{\text{сш}} = 0,1$ (частка) сухої речовини з повітрям, що виходить з сушарки, при стандартному вмісті сухих речовин в готовому продукті $CP_{\text{гп}} = (1 - W_{\text{в}}) = 0,88$ (частка)

$$G_{\text{сш}} = G_{\text{аск}} \times (1 - E_{\text{сш}})/CP_{\text{гп}} = 877 \times (1 - 0,1)/0,88 = 897 \text{ кг}$$

Маса води, що підлягає видаленню з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні $E_{\text{сш}} = 0,1$ (частка)

$$W_{\text{сш}} = G_{\text{кон}} \times (1 - E_{\text{сш}}) - G_{\text{сш}} = 24035 \times (1 - 0,1) - 897 = 20735 \text{ кг}$$

$$W = W_{\text{сш}}/\tau_{\text{суш}} = 20735/24 = 864 \text{ кг/год}$$

Прийmemo температуру на вході гарячого повітря $t_{1\text{в}} = 130^\circ\text{C}$; на виході гарячого повітря $t_{2\text{в}} = 55^\circ\text{C}$; температуру висушеного матеріалу, яка не повинна перевищувати $t_{1\text{м}} = 50^\circ\text{C}$.

Визначимо середню питому продуктивність сушарки за вологою, що випарилась

$$G_{\text{сер}} = 0,05[(t_{1\text{в}} + t_{2\text{в}})/2 - t_{\text{м}}] = 0,05[(130 + 55)/2 - 50] = 2,1 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{год})$$

Орієнтовно об'єм розпилювальної сушарки $V_{\text{суш}}$ розраховують за формулою

$$V_{\text{суш}} = W/G_{\text{сер}} = 864/2,1 = 411 \text{ м}^3$$

Обираємо з таблиці 10.1 найближчу за об'ємом стандартну розпилювальну сушарку СРЦ-10/550 об'ємом 550 м^3 , яка має діаметр 10 м і висоту циліндричної частини 7 м, нижнє підведення повітря та конічну частину, маса сушарки 62 т.

6.13 Розрахунок фасувально-пакувального обладнання

Маса лізину, що йде на фасування,

$$G_{\text{гп}} = 897 \text{ кг}$$

Маса готового порошку, що фасується в 1 поліетиленовий пакет, а потім у паперовий крафт-мішок $G_{\text{крф}} = 25 \text{ кг}$. Кількість пакетів за цикл

$$N_{\text{ц}} = 897/25 = 36$$

Використовується напівавтомат-дозатор з продуктивністю $G_{ав} = 100$ пакетів за годину.

Час фасування партії готового препарату

$$\tau_{ф} = G_{гп} / G_{ав} = 897 / 100 = 9 \text{ год}$$

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання зображеного на апаратурній схемі, наведена в
табл. 7. 1

Таблиця 7.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Д 3 Д 6 Д 8 Д 17 Д 19 Д 21 Д 25 Д 23 Д 28 Д 40 Д 43	Об'ємно - ваговий дозатор	11	Дозатор виробництва НВП "Техноаги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1% [73].
Р 4	Реактор змішувач для каустичної соди	1	Реактор об'ємом 10 м ³ , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішу-вання 100 об/хв (Україна) [69]
Н 2 Н 5 Н 27 Н 30 Н 42 Н 45 Н 49	Насос відцентровий	7	Відцентровий насос фірми ЕВАРАсерії ЕВАРА 3М, продуктивністю до 72 м ³ /год [78]
Р 7	Реактор змішувач для дезактину	1	Реактор об'ємом 10 м ³ , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв (Україна) [69]
Р 9	Реактор змішувач для гембару	1	Реактор об'ємом 10 м ³ , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв (Україна) [69]

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ 95	Літ.	Арк.	Акрушіє	
Розроб.		Гавриленко Я.В.							
Перевір.		Слободян О.П.					95	3	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

ПЗ 10	Повітрозабірник	2	Обладнений металевою сіткою для видалення механічних забруднень[71]
Ф 11	Фільтр грубої очистки	1	Фільтруючий матеріал – химволокно ФВР, Е=90% (Україна) [67]
К 12	Компресор	1	Компресор GX7 фірми AtlasCopco (Швеція), потужність 14 л/с, робочий тиск 1 МПа [66]
Т 13	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач серії АС-13,5 фірми «Уралкомпресормарш»(Росія) продуктивністю 13,5 нм ³ /год [79]
Р 14	Ресирвер	1	Ресирвер серії РВ 430/16 фірми «Уралкомпресормарш» (Росія), об'єм 430 л, робочий тиск 1,6 МПа [66]
Т 15	Теплообмінник нагрівач	1	Корпуса теплообмінника ЕО фірми Airone (Росія) виготовлений із оцинкованої сталі товщиною [79]
Ф 16	Фільтр головний	1	Фільтруючий матеріал –волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е=99%[63]
Р 18 Р 20 Р 22 Р 24 Р 26 Р 29 Р 41 Р 44	Реактори змішувачі	8	Реактори об'ємом 10,100,1250,10000 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 500 об/хв [69]
ЗП 31	Засівний пристрій	1	Виготовлений із нердавіючої сталі, розташований над ферментером[72]
Ф 32 Ф 34 Ф 36 Ф 38 Ф 47	Індивідуальні фільтри	5	Фільтри марки BonescoActive carbon filter (Швейцарія), Е=99.996[67,71,65,63]
ІН 33	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л, швидкість перемішування 500 об/хв (Росія) [72]
ІН 35	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 100 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 500 об/хв [69]
ІН 37	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 1250 л, з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 500 об/хв [69]

ПА 39	Посівний апарат	1	Посівний апарат об'ємом 10000 л, швидкість перемішування 500 об/хв (Росія) [69]
Фр 48	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 100 м ³ , з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 120 об/хв [62]
УБС 46	Установка безперервної стерилізації	1	Температура стерилізації 131°C. Продуктивність – 30 м ³ /год. Складається з колонки швидкісного нагріву, витримувача, теплообмінника типу труба в трубі, рекуператора, теплообмінника-охолоджувача[64].
Р-51	Реактор-збірник культуральної рідини	1	Реактор з нержавіючої сталі преміям класу AISI - 316L. Місткість 100000 л. Виробник: Італія[74].
ВВУ-53	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарний апарат SJN-2500 з нержавіючої сталі. Тиск пари 0,05-0,09. Розмір 8500×1700×4000. Виробник : «Goldcher-machinery», Китай [75].
С-54	Сушарка розпилювальна	1	Сушарка розпилювальна з відцентровим розпиленням. 3 нержавіючої сталі марки <u>Anka MAkine</u> потужністю 14 кВт, продуктивністю 10 кг/год, максимальний ступінь вологості до 2%, середня температура сушіння 60-70 °С. Виробник: <u>Anka MAkine</u> , Україна [76].
ПМА-55	Автомат пакувальний	1	Автомат пакувальний для пакування у крафт мішки на 25 кг, продуктивність 10 шт/хв, похибка дози (допустима) 2 %. Виробник: Корея, HYUNDAI [77].

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Підготовка виробництва виконується за вимогами нормативних документів, в яких описуються правила виробництва та контроль якості продукції.

ДР 1.1. Підготовка персоналу до виробництва

Особи, що допускаються до виробництва повинні мати відповідну професійну підготовку і пройти інструктаж з безпеки праці та ознайомитись з інструкцією по техніці безпеки на виконувану роботу, а також інструктаж по санітарному мінімуму. Дані заходи з працівником проводяться у відділі охорони праці або спеціально призначеною особою на підприємстві. Персонал, що не пройшов інструктаж, не допускають до роботи.

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих засобів

Всі мийні, дезінфікуючі розчини і суміші готує блок стерилізації, або співробітник, призначений начальником цеху, ділянки, підрозділу за наказом. Розчини готують в емальованому посуді або в бутлях з товстого темного скла. Посуд, де зберігаються розчини, обов'язково повинен бути щільно прикритим кришкою або корком. Приготування розчинів проводиться у спеціальній кімнаті, що прилягає до санвузла. Бажано, щоб це була темна або напівтемна кімната, стіни та підлога її вистелені кахлями, також є раковина для миття рук.

ДР 1.2.1. Приготування каустичної соди

Для отримання розчину 2% каустичної соди потрібно 10 л води та 2,5 кг каустичної соди (до ДР 1.3.1, ДР 1.4.1).

ДР 1.2.2. Приготування розчину дезактину

Для приготування 1 л 0,2% робочого розчину необхідно 2 мл концентрату та 998 мл води питної. На 1 використання необхідно 7,2 л 0,2%

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 98			Літ.	Арк.	Акрушіє	
Розроб.		Гавриленко Я.В.									
Перевір.		Слободян О.П.								98	21
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

робочого розчину Дезактину. У мірному стакані відмірямо 14,4 мл концентрату, виливаємо у ємність об'ємом 10 л, та додаємо 7185,6 мл питної води. Приготований робочий розчин Дезактину можна зберігати не більше 3 днів в щільно закритій тарі(до ДР 1.3.1).

ДР 1.2.3. Підготовка розчину гембару

Зі складу надходить концентрат Гембару (25 %), який розводять водою до потрібної концентрації (0,5 %). Готують у збірнику об'ємом 800 л. Щоб отримати 560 л (0,5 %) розчину Гембару наливають 24 л 25% Гембару та 536 л водопровідної води і включають перемішувач (до ДР 1.3.1).

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

Підготовка виробничих приміщень — одне з найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти і зведення до мінімуму механічних і мікробних забруднень під час виробничого процесу.

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання виробничих приміщень здійснюється персоналом 1 раз на зміну. Робочий персонал повинен бути вдягнутий у гумові рукавиці, взуття та фартух, з метою уникнення пошкоджень шкіри та одягу дезінфікуючими розчинами. Стіни, двері і інші поверхні протирають поролоновою губкою, яка змочена дезінфікуючими робочими розчинами Каустичної соди (від ДР 1.2.1), Дезактину (від ДР 1.2.2) та Гембару (від ДР 1.2.3), потім цими ж розчинами миють підлогу. При проведенні прибирання приміщень користуються 0,2% робочими розчинами Дезактину та Гембару. Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

При генеральному прибиранні виробничого приміщення застосовується 0,2 % розчин Гембару та Дезактину. Прибирання здійснюється один раз на місяць. Розчином обробляють поверхні приміщень: стіни, підлогу, стіни, вікна та двері. Стіни, двері і інші поверхні протирають

паролоновою губкою, яка змочена дезінфікуючим розчином, потім цим же розчином миють підлогу. Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання

Підготовка технологічного обладнання включає в себе миття, ополіскування обладнання та перевірку його на герметичність. Метою проведення робіт, щодо підготовки технологічного обладнання є запобігання контамінації середовища сторонніми мікроорганізмами.

ДР 1.4.1. Миття, дезінфекція та ополіскування

Миття обладнання здійснюється водопровідною водою із застосуванням 2 % розчину Каустичної соди (від ДР 1.2.1). Для миття обладнання використовується безрозбірна СІР мийка. В станцію СІР мийки завантажується робочий розчин дезінфікуючого засобу каустичної соди та дистильована вода. Вводяться параметри обраних миючих розчинів температура. Відпрацьований миючий розчин направляється на знешкодження. Після миття ферментер ополіскують холодною водою упродовж 10 хв. Стічні води зливаються і направляються на стадію знешкодження відходів.

ДР 1.4.2. Технічний огляд

Перед процесом стерилізації проводять технологічний огляд обладнання на наявність пошкоджень, вм'ятин, впадин, в яких можуть залишатись залишки можливого забруднення, що може призвести до перехресної контамінації. Всі знайдені несправності усувають.

ДР 1.4.3. Перевірка на герметичність

Перевірка обладнання на герметичність здійснюється за допомогою течієшукача. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогеновмісної речовини, зазвичай це чотирихлористий карбон або шестифтористий сульфат, закривають усю запірну арматуру та нагрівають апарат до 30 °C і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Якщо в апараті

наявні нещільності, то при наближенні щупа течіє шукача до них, пристрій буде подавати сигнал. Тривалість перевірки одного апарату цим методом становить 1,5-2 години.

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання

Після дезінфекції, ополіскування та перевірки обладнання та комунікацій на герметичність у ферментер подають насичену водяну пару, яку подають під тиском 0,28 – 0,3 МПа. Процес поділяють на три стадії. Попередньо в сорочку апарата подають глуху пару і прогрівають апарат до температури 80-90 °С. Далі подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення пари з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації 130 – 135 °С закривають всю запірну арматуру, крім парової, і витримують заданий час стерилізації (60 хвилин). При охолодженні закривається вся запірна арматура подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Процес охолодження здійснюється до досягнення температури до 30-40 °С і надлишкового тиску $P=0,003 - 0,005$ МПа. Разом весь процес стерилізації одного ферментера становить 2,5 години. На стадії стерилізації обладнання контролюється температура, тиск водяної пари (0,28 – 0,3 МПа), час стерилізації (1 година) та відсутність сторонньої мікрофлори.

ДР 2 Підготовка стерильного технологічного повітря

Атмосферне повітря забруднене твердими або рідкими частинки які містять на собі різноманітні мікроорганізми, а основною вимогою аераційного повітря є його стерильність, тому проводять очищення повітря.

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 20 м від найвищого приміщення за допомогою пристрою для забору повітря.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу та механічних часточок

Повітря очищується від грубого аерозолі на фільтрі грубої очистки. Ступінь очищення – 80 %.

ДР 2.3. Стиснення (компресування) повітря

Повітря стискають у компресорі до 0,35 МПа, стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250 °С і збільшення вмісту вологи.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

Стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі повітря до температури 25-30 °С для відведення надлишкової вологи. Повітря подають на ресивер для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ($W = 60-70\%$).

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря підігрівують до 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють у теплообміннику.

ДР 2.6. Очищення на головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі. Ступінь очищення – 95 %. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,999 % (до ТП 6.5, ТП 6.6, ТП 6.7, ТП 6.8, ТП 7).

ДР 3 Приготування та стерилізація піногасників

ДР 3.1. Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 10 л.

Так як робочий об'єм поживного середовища становить 10 л, то кількість піногасника, якого необхідно приготувати та простерилізувати потрібно 10 мл відповідно.

У мірному циліндрі відміряють необхідну кількість піногасника. Вміст мірного циліндра переносять у колбу об'ємом 100 мл. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві (до ТП 6.5).

Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР. 3.2. Приготування на стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 100 л.

Робочий об'єм середовища 100 л, для такої кількості середовища необхідно простерилізувати 100 мл піногасника. Мірним циліндром відміряють необхідну кількість піногасника. У колбу місткістю 250 мл переносять піногасник, колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві.

Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв(до ТП 6.6).

ДР. 3.3. Приготування на стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 1250 л.

Робочий об'єм середовища 1250 л, для такої кількості середовища необхідно простерилізувати 1250 мл піногасника. Мірним циліндром відміряють необхідну кількість піногасника. У колбу місткістю 2 л переносять піногасник, колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві.

Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв (до ТП 6.7).

ДР. 3.4. Приготування на стерилізація піногасника для посівного апарату об'ємом 10 м³.

Робочий об'єм середовища 10 м³, для такої кількості середовища необхідно простерилізувати 5 л піногасника.

Стерилізація відбувається у збірнику, який обладнаний електричною системою підігріву при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв (до ТП 6.8).

ДР. 3.5. Приготування на стерилізація піногасника для ферментера об'ємом 100 м³.

Для виробничого культивування у ферментері місткістю 100 м³, необхідно підготувати 50 л піногасника.

Стерилізація відбувається у збірнику, який обладнаний електричною системою підігріву при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв (до ТП 7).

ДР 4 Приготування та стерилізація розчину меляси для підживлення

У процесі біосинтезу починаючи з 2-ї години культивування, вносять 140 г/л меляси порціями по 20 г/л кожні 2 години. Розчин меляси готують та стерилізують в окремих апаратах.

ДР 5 Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживних середовищ для колб на качалках

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 8.1.

Таблиця 8.1.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування посівного матеріалу в колбах на качалках об'ємом 750 мл

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 500 мл середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Меляса	50	25	А	449
Вода		224		
Кукурудзяний екстракт	40	20		
Вода		180		
L-лейцин	0,2	0,1	Б	1
Вода		0,9		
CaCO ₃	10	5	В	50
Вода		45		
Разом:		500		500

Усі композиції готуються у лабораторному посуді і стерилізуються в автоклаві.

ДР 5.1.1. ДР Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 25 г меляси та 20 г кукурудзяного екстракту наважки переносять в 2 попередньо простерилізовані колби на 500 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,2, додають до меляси 224 мл дистильованої води , а до кукурудзяного екстракту 180 мл , перемішують. Закривають колби ватно-марлевими пробками і стерилізують в автоклаві за температури 112 °С на 30 хв(до ТП 6.4).

ДР 5.1.2. Приготування композиції Б

На аналітичних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,1 г лейцину наважку переносять в попередньо простерилізовану колбу на 50 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,2, додають 0,9 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 112 °С на 10 хв(до ТП 6.4).

ДР 5.1.3. Приготування композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 5 г крейди наважку переносять в попередньо простерилізовану колбу на 100 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,2, додають 45 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131 °С на 40 хв(до ТП 6.4).

ДР 5.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 10 л інокулятора

ДР 5.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі попередньо зважують 0,85; 0,3 та 0,1 кг меляси, гідролізату кормових дріжджів та кукурудзяного екстракту. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 4 л холодної питної води.

Мелясу, гідролізат кормових дріжджів та кукурудзяний екстракт поміщають в інокулятор об'ємом 10 л та стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв(до ТП 6.5).

ДР 5.2.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 60 та 6 г NH_4Cl ; $(NH_4)_2HPO_4$ наважки переносять в 2 попередньо простерилізовані колби на 500 та 50 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,2, додають по 200 та 20 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 40 хв(до ТП 6.5).

ДР 6.2.3. Приготування композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 1,2 г лейцину наважку переносять в попередньо простерилізовану колбу на 100 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,2, додають 40 мл дистильованої води, перемішують. На аналітичних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,08 та 0,08 г біотин та тіамін наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 50 мл, з коефіцієнтом заповнення 0.5, додають по 0,2 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 10 хв(до ТП 6.5).

Таблиця 8.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,1 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
--------------------------------	------------	---	------------	------------------------

Меляса	140	0,85	А	5,6
Вода		2,6		
Конденсат		0,2		
Гідролізат кормових дріжджів	55	0,3		
Вода		1		
Конденсат		0,1		
Кукурудзяний екстракт	20	0,1		
Вода		0,4		
Конденсат		0,03		
NH ₄ Cl	10	0,06	*Б	0,3
Вода		0,2		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	0,006		
Вода		0,02		
L-лейцин	0,2	0,001	*В	0,04
Вода		0,04		
Тіамін	0,00025	0,00002		
Вода		0,00001		
Біотин	0,00025	0,00002		
Вода		0,00001		
Разом:		6,1		6,1

*композицію Б та В готують в лабораторному посуді і стерилізують в автоклаві.

ДР 5.3 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 100 л інокулятора

ДР 5.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі попередньо зважують 8,7; 3,4 та 1,2 кг меляси, гідролізату кормових дріжджів та кукурудзяного екстракту. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 40 л холодної питної води.

Мелясу, гідролізат кормових дріжджів та кукурудзяний екстракт поміщають в інокулятор об'ємом 100 л та стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв (до ТП 6.6).

ДР 5.3.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованому стаканчику зважують 0,6 та 0,06 кг NH_4Cl ; $(NH_4)_2HPO_4$. Наважки переносять в попередньо простерилізовані колби на 5л та 500 мл, з коефіцієнтом заповнення 0.2, додають по 2л та 150 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C (тиск – 0,05 МПа) протягом 40 хв (до ТП 6.6).

ДР 5.3.3. Приготування композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 1 г лейцину наважку переносять в попередньо простерилізовану колбу на 50 мл, з коефіцієнтом заповнення 0.2, додають 25 мл дистильованої води, перемішують. На аналітичних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,002 та 0,002 г біотин та тіамін наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 50 мл, з коефіцієнтом заповнення 0.2, додають по 26 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C (тиск – 0,05 МПа) протягом 10 хв (до ТП 6.6).

Таблиця 8.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 63 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Меляса	140	8,7	А	60
Вода		26		
Конденсат		4		
Гідролізат кормових дріжджів	55	3,4		
Вода		10		
Конденсат		2		
Кукурудзяний екстракт	20	1,2		
Вода		4		
Конденсат		0,6		

NH ₄ Cl	10	0,6	*Б	2,9
Вода		2		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	0,06		
Вода		0,2	*В	0,1
L-лейцин	0,2	0,01		
Вода		0,04		
Тіамін	0,00025	0,00002		
Вода		0,00004		
Біотин	0,00025	0,00002		
Вода		0,00004		
Разом:		63		63

* композиції Б та В готують в лабораторному посуді і стерилізують в автоклаві.

ДР 5.4 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 1250 л інокулятора

ДР 5.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі попередньо зважують 85,7; 33,4 та 12,2 кг меляси, гідролізату кормових дріжджів та кукурудзяного екстракту. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 400 л холодної питної води.

Мелясу, гідролізат кормових дріжджів та кукурудзяний екстракт поміщають в інокулятор об'ємом 1250 л та стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв (до ТП 6.7).

ДР 5.4.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованому стаканчику зважують 6,1 та 0,6 кг NH₄Cl ; (NH₄)₂HPO₄. На ваговому дозаторі попередньо зважують 18 л холодної питної води. Перемішують у збірнику об'ємом 40 л. Композиція Б по трубопроводу перекачується в інокулятор об'ємом 1250 л. Підготовлена композиція Б стерилізується гострою парою за температури 131 °С протягом 40хв, безпосередньо в інокуляторі (до ТП 6.7).

ДР 5.4.3. Приготування композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 100 г лейцину наважку переносять в попередньо простерилізовану колбу на 1 л, з коефіцієнтом заповнення 0.2, додають 500 мл дистильованої

води, перемішують. На аналітичних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,02 та 0,02 г біотин та тіамін наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 5 л, з коефіцієнтом заповнення 0.2, додають 1,9 л дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C (тиск – 0,05 МПа) протягом 10 хв (до ТП 6.7).

Таблиця 8.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1,25 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 612 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Меляса	140	85,7	А	582
Вода		255		
Конденсат		38		
Гідролізат кормових дріжджів	55	33,7		
Вода		100		
Конденсат		15		
Кукурудзяний екстракт	20	12,2		
Вода		37		
Конденсат		5,4		
NH ₄ Cl	10	6,1	Б	30
Вода		18		
Конденсат		3		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	0,6		
Вода		2		
Конденсат		0,3		

L-лейцин	0,2	0,1	*В	0,5
Вода		0,4		
Тіамін	0,00025	0,0002		
Вода		0,001		
Біотин	0,00025	0,0002		
Вода		0,001		
Разом:		612		612

* композиція В готується в лабораторному посуді і стерилізується в автоклаві.

ДР. 5.5 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 10 м³ посівного апарата

ДР 5.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі попередньо зважують 777; 303 та 110 кг меляси, гідролізату кормових дріжджів та кукурудзяного екстракту. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 3523 л холодної питної води.

Мелясу, гідролізат кормових дріжджів та кукурудзяний екстракт поміщають в інокулятор об'ємом 10 м³ та стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв (до ТП 6.8).

ДР 5.5.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованому стаканчику зважують 55 та 5,5 кг NH_4Cl ; $(NH_4)2HPO_4$. На ваговому дозаторі попередньо зважують 180,4 л холодної питної води. Перемішують у збірнику об'ємом 400 л. Композиція Б по трубопроводу перекачується в інокулятор об'ємом 1250 л. Підготовлена композиція Б стерилізується гострою парою за температури 131 °С протягом 40хв, безпосередньо в інокуляторі (до ТП 6.8).

ДР 5.5.3. Приготування композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 1,1 кг лейцину наважку переносять в попередньо простерилізовану колбу на 5 л, з коефіцієнтом заповнення 0.2, додають 1650 мл дистильованої води, перемішують. На аналітичних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,1 та 0,1 г біотин та тіамін наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 5 л, з коефіцієнтом

заповнення 0.2, додають 1650 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 10 хв (до ТП 6.8).

Таблиця 8.5.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,5 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Меляса	140	770	А	5 229
Вода		2294		
Конденсат		340		
Гідролізат кормових дріжджів	55	303		
Вода		901		
Конденсат		134		
Кукурудзяний екстракт	20	110		
Вода		328		
Конденсат		49		
NH ₄ Cl	10	55	Б	267
Вода		164		
Конденсат		24		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	5,5		
Вода		16,4		
Конденсат		2,4		
L-лейцин	0,2	1,1	*В	4
Вода		3,3		
Тіамін	0,00025	0,001		
Вода		0,004		
Біотин	0,00025	0,001		
Вода		0,004		
Разом:		5 500		5 500

* композиція В готується в лабораторному посуді і стерилізується в автоклаві.

ДР 5.6 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого ферментера об'ємом 100 м³.

*ДР. 5.6.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для
виробничого біосинтезу*

На ваговому дозаторі зважуємо 2177 кг меляси, 2993 кг гідролізату кормових дріжджів, 1088 кг кукурудзяного екстракту, а також солі відповідно NH_4Cl - 544 кг; $(NH_4)2HPO_4$ – 54,4 кг, та лейцин – 11 кг, біотин -0,014 та тіамін – 0,014 кг. На об'ємному дозаторі відміряємо 32,4 м³ питної води. Змішуємо у збірнику об'ємом 60 м³ та перекачують за допомогою насоса по трубопроводу в збірник УБС об'ємом 20 м³.

Приготоване поживне середовище об'ємом 54,5 м³ за допомогою насоса потрапляє у теплообмінник-рекуператор пластинчастий для попереднього підігріву поживного середовища, а потім у колонку для нагрівання поживного середовища і після цього у теплообмінник-витримувач. Наступною стадією є зниження температури поживного середовища у теплообміннику рекуператорі пластинчастому для охолодження стерильного поживного середовища. І тільки після цього стерильне поживне середовище самопливом потрапляє у виробничий ферментер (до ТП 7).

Таблиця 8.6

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування поживного
середовища ферментера в УБС**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 54,5 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
--------------------------------	------------	---	------------	------------------------

Меляса	40	2177	А	42 510
Гідролізат кормових дріжджів	55	2993		
Кукурудзяний екстракт	20	1088		
NH ₄ Cl	10	544		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	54,4		
L-лейцин	0,2	11		
Тіамін	0,00025	0,014		
Біотин	0,00025	0,014		
Вода		26923		
Конденсат 20%		8720		
Меляса	100	5450	Підживлюючий розчин	11 990
Вода		5450		
Конденсат		1090		
Разом:		54 500		54 500

Все поживне середовище буде стерилізуватися за допомогою УБС (потужністю 20 м³/год) при рН 7.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП.6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Brevibacterium flavum* Н 90 зберігають у пробірках на агаризованому середовищі МПА в холодильнику при 3 – 4 °С. Для збереження фізіолого-біохімічних властивостей штаму здійснюють пересіви (через 3 – 4 місяці). Всі роботи з колекційною культурою проводяться в строго асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання робочої культури з колекційної

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках на середовищі МПА, розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі із м'ясопептонним агаром і вирощують при температурі 30 °С упродовж 48 год.

ТП 6.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані з ізолюваних колоній пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 48 год.

ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 5 л в асептичних умовах вносять 449 мл розчину композиції А (від ДР 5.1.1), 1 мл розчину композиції Б (від ДР 5.1.2) та 50 мл композиції В (від ДР 5.1.3). Перемішують і розливають по 140 мл в 4 стерильних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Brevibacterium flavum* Н 90, вирощеною на МПА (від ТП 6.3) і, вносять 10 мл стерильної питної води, за допомогою петлі суспендують клітини і піпеткою в асептичних умовах відбирають одержану суспензію та вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують біомасу, одержану з однієї пробірки.

Після вирощування у колбах на качалці 240 об/хв впродовж 48 год при 30 °С, культуральну рідину в асептичних умовах з колб переносять в засівну колбу об'ємом 5 л (до ТП 6.5).

ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л.

В інокулятор об'ємом 10 л вносять розчин композиції А – 5,6 л (від ДР 5.2.1) , розчин композиції Б – 0,3 л (від ДР 5.2.2) та розчин композиції В – 0,04 л (від ДР 5.2.3) , а також перекачують посівний матеріал із засівної колби через патрубок відкривши вентиль (від ТП 6.4) і вмикають перемішуючий пристрій. Інокулятор обладнаний автоматичною системою піногасіння до якої подається (від ДР 3.1) піногасник. У інокулятор подається стерильне стиснуте повітря (від ДР 2.7), а виводиться відпрацьоване. У кожух інокулятора подається вода, а також виводиться оборотна вода.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 30 °С, тривалість – 72 год. Швидкість перемішування становить 500 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 100 л.

ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л.

В інокулятор об'ємом 100 л вносять розчин композиції А – 60 л (від ДР 5.3.1) , розчин композиції Б – 2,9 л (від ДР 5.3.2) та розчин композиції В – 0,1 л (від ДР 5.3.3), а за допомогою труби перетискування – посівний матеріал (від ТП 6.5), і вмикають перемішуючий пристрій. Інокулятор обладнаний автоматичною системою піногасіння до якої подається (від ДР 3.2) піногасник. В інокулятор подається стерильне стиснуте повітря (від ДР 2.7), а виводиться відпрацьоване. У кожух інокулятора подається вода, а також виводиться оборотна вода.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 30 °С, тривалість – 72 год. Швидкість перемішування становить 500 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 6,3 м³(до ТП 6.7).

ТП 6.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1250 л.

В інокулятор об'ємом 1250 л вносять розчин композиції А – 582 л (від ДР 5.4.1) , розчин композиції Б – 30 л (від ДР 5.4.2) та розчин композиції В – 0,5 л (від ДР 5.4.3), а за допомогою труби перетискування – посівний матеріал (від ТП 6.6), і вмикають перемішуючий пристрій. Інокулятор обладнаний автоматичною системою піногасіння до якої подається (від ДР 3.3) піногасник. В інокулятор подається стерильне стиснуте повітря (від ДР 2.7), а виводиться відпрацьоване. У кожух інокулятора подається вода, а також виводиться оборотна вода.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 30 °С, тривалість – 72 год. Швидкість перемішування становить 500 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 6,3 м³(до ТП 6.8).

ТП 6.8. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 м³.

В посівний апарат об'ємом 10 м³ з 5,2 л попередньо простерилізованою композицією А (від ДР 5.5.1.) в асептичних умовах самоплином подають 0,3 л стерильного розчину композиції Б (від ДР 5.5.2.),

та розчин композиції В 0,04 л (від ДР 5.5.3), а за допомогою труби перетискування – посівний матеріал (від ТП 6.7) і вмикають перемішувач пристрій. Посівний апарат обладнаний автоматичною системою піногасіння до якої подається піногасник (від ДР 3.4). Також подається стерильне повітря (від ДР 2.7). Температура вирощування посівного матеріалу в посівному апараті – 30 °С, тривалість – 72 год. Швидкість перемішування становить 500 об/хв.

В апараті створюється надлишковий тиск ($P = 0,02 - 0,05$) подачею стерильного стисненого повітря.

З дотриманням правил асептики з посівного апарату відбирають проби через кожні 8 годин, в якій аналізують: вміст вуглецю, азоту та мікробіологічну чистоту.

Процес закінчують по досягненні 24 годин культивування. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують в ферментер об'ємом 63 м³ через трубу перетискання.

ТП 7. Біосинтез

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з об'ємом 100 м³. У попередньо простерилізований ферментер в асептичних умовах за допомогою винтового насоса вносять стерильне поживне середовище (від ДР 5.6.1) Через вентиль – посівний матеріал (від ТП 6.8) і вмикають перемішувач пристрій. Перемішувачем слугує турбінна мішалка закритого типу, якою обладнаний ферментер. Швидкість перемішування становить 120 об/хв. Ферментер обладнаний автоматичною системою піногасіння до якої подається піногасник (від ДР 3.5). Також подається стерильне повітря (від ДР 2.7), та підживлюючий розчин меляси (від ДР 4). Тривалість виробничого культивування становить 72 годин при температурі 30-32 °С.

В апараті створюється надлишковий тиск ($P = 0,02 - 0,05$) подачею стерильного стисненого повітря. рН середовища підтримують на рівні 6,8-7,2 аміачною водою.

З дотриманням правил асептики з посівного апарату відбирають проби через кожні 8 годин, в якій аналізують: вміст меляси, азоту, вміст лізину та мікробіологічну чистоту.

Процес біосинтезу завершують, при повному вичерпанні меляси в культуральній рідині і культуральна рідина передається на стадію виділення ферменту.

ТП 9. Відділення біомаси

ТП 9.1 Зберігання культуральної рідини.

Після ферментації культуральну рідину перекачують у збірник для зберігання на 100 м³ та подають холодну воду у сорочку збірника до досягнення температури 10 °С. Підкислюють культуральну рідину концентрованим розчином соляної кислоти до рН 5-6. Під час зберігання культуральної рідини, підтримують дану температуру. Термін зберігання до 12 годин. Далі стабілізовану культуральну рідину відправляють на стадію концентрування.

ТП 9.2 Концентрування культуральної рідини.

Від реактора з культуральною рідиною на 100 м³ (кількість 54500 л) насосом подають культуральну рідину на плівкову вакуум-випарну установку з випарною потужністю 2500 кг/год. Тиск пари виставляють в межах 0,05-0,09 МПа, температура пари 55 °С. Відділену біомасу перекачують за допомогою відцентрового насосу до розпилюючої сушарки.

ТП 10 Сушіння.

ТП 10.1 Висушування біомаси.

З випарної установки відділену біомасу перекачують за допомогою відцентрового насосу до розпилюючої сушарки та вставляють камери у сушарку. Герметизують сушильну установку. Встановлюють вакуум на рівень 0.01-0,03 мПа. Подають гаряче повітря температурою 60 °С. Після процесу сушіння проводять випробування на визначення вологості. Вологість лізину не повинна перевищувати 3 %.

ПМВ 11. Пакування у первинну упаковку

ПМВ 11.1 Пакування у первинну тару

Висушену біомасу завантажують у бункер пакувального автомату. Також заповнюють роторні накопичувачі крафт мішками, етикетною стрічкою. Встановлюють режим пакування: продуктивність: 10 пакетів/хв, розмір дозування: 25 кг, точність 0,5-1%.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1 Карта контрольних точок виробництва лізину

Таблиця 9.1.1

9.1 Карта контрольних точок виробництва лізину

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
К _х 1.2.1 Підготовка робочого розчину Каустичної соди	Концентрація розчину каустичної соди	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 2 %
К _х 1.2.2 Приготування робочого розчину Дезактину	Концентрація розчину Дезактину	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 0,2 %
К _х 1.2.2 Приготування робочого розчину Гембару	Концентрація розчину Гембару	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 0,5 %
К _т , К _м 1.3.1, 1.3.2 Підготовка виробничих приміщень	М/б чистота поверхонь виробничих приміщень (стіни, підлога, двері)	Змиви тампонами або метод відбитків	Після прибирання	В змивах з площею 10 x 10 см допускається ріст не більше 50 м м/о (бактерій і грибів сумарно);
К _т 1.4.1 Технологічний контроль миття обладнань та комунікацій	Обладнання та комунікації, температура	Термометр технічний, годинник	Під час проведення миття	t = 40-50 °C, τ = 20 хв
К _т 1.4.2, 1.4.3 Технологічний контроль герметичності обладнання	Обладнання та комунікації, тиск	Датчик	Після миття та ополіскування обладнання	P = 0,02 МПа, τ = 1 год

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ							
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОНИЦТВА 120			Літ.	Арк.	Акрушіє		
Розроб.	Гавриленко Я.В.									12020	1203	
Перевір.	Слободян О.П.							Кафедра БТМ				
Реценз.												
Н. Контр.												
Затверд.	Пирог Т.П.											

К _т , К _м 1.4.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, режим стерилізації вузлів, тиск, температура, мікробна контамінація.	Манометр, термометр м/б метод, висіви на чашки Петрі	Температура та тиск визначаються безперервно під час виробничого процесу.	p = 0,003, 0,005 Мпа, t = 125-130°C, τ = 1 год
К _т 2.2 Попереднє очищення від пилу та механічних часточок	Повітря, ступінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Безперервно при подачі повітря	E = 80%
К _т 2.3 Компресування повітря	Повітря, температура, тиск стиснення повітря	Термометр, манометр технічний	Після компресування повітря	p = 0,35 Мпа, t = 120-250 °C
К _т 2.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Повітря, температура, вологість повітря	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря, видалення зайвої вологи	t = 25-40°C, W=60-70%
К _т 2.5 Нагрівання повітря	Повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання	t = 40-50°C
К _т 2.6 Очищення на головному фільтрі	Повітря, вміст часток, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очищення повітря у головному фільтрі	E = 95 %
К _т 2.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря, ступінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Безперервно при подачі повітря	E = 99%
К _м К _т 3 Приготування та стерилізація піногасників	температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, p = 0,15 МПа, τ = 40 хв,
К _м К _т 4 Приготування та стерилізація м'яси для підживлення	температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 30 хв,

К _м К _т 5.1.1, Приготування та стерилізація поживного середовища	Композиція А, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	V=750мл, t = 112 °С, τ = 30 хв,
К _м К _т 5.1.2 Приготування та стерилізація поживного середовища	Композиція Б, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	V=750мл, t = 112 °С, τ = 30 хв,
К _м К _т 5.1.3 Приготування та стерилізація поживного середовища	Композиція В, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	V=750мл, t = 131 °С, τ = 40 хв,
К _м К _т , 5.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв,
К _м К _т , 5.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв,
К _м К _т , 5.2.3 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція В, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв,
К _т , К _м 5.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
К _т , К _м 5.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
К _т , К _м 5.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

[illegible]

Кт, Км 6.1. Підтримання колекційної культури	Температура, час, асептичність	Термометр технічний, мікробіологі чний контроль	Температура, час та зовнішній вигляд визначається безперервно під час підтримання культури	$t = 3-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3-4$ місяці., відсутність сторонньої мікробіоти
Км, Кт 6.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Температура, час, асептичність	Термометр технічний, годинник, мікробіологі чний контроль	Температура, час і зовнішній вигляд визначається під час виробничого процесу. Мікробіологічний контроль по закінченню процесу	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологі чний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, $w=240$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологі чний контроль	Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу	$t = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, $w=240$ об/хв. відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 10 л.	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологі чний контроль	Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу	$t = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72$ год, $w=500$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 100 л.	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологі чний контроль	Під час вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу	$t = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72$ год, $w=500$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 6.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 1250 л.	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу	$t = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72\text{ год}$, $w=500\text{ об/хв.}$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.8. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті 10000 л.	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу	$t = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72\text{ год}$, $w=500\text{ об/хв.}$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 7 Виробниче культивування	Посівний матеріал, тривалість культивування, швидкість перемішування, вміст лізину, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, рН метр, колориметричний метод	Під час вирощування культури у ферментері. Відбір проби культуральної рідини відбувається кожні 8 год	$\text{pH} = 7$ $t = 30-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72\text{ год}$, $w=500\text{ об/хв.}$, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх 8.1 Зберігання культуральної рідини	Температура, час, рН	Хімічний метод Термометр технічний	Під час процесу та перед початком	$t=12\text{ год}$ $\text{pH}= 5-6$ $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 8.2 Концентрування культуральної рідини	Температура, час, тиск	Термометр технічний Годинник барометр	Під час проведення технологічного процесу	$T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ $t=2-3\text{ год}$ $P = 0,05-0,09\text{ МПа}$
Кт 9.1 Висушування біомаси	Температура сушіння, час, тиск	Термометр технічний Годинник барометр	Під час проведення технологічного процесу	Вологість $\leq 3\%$ $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ $t=30-40\text{ хв}$ $P = 0.01-0,03\text{ МПа}$
Кт 10.1 Пакування у первинну тару	Маса, точність, продуктивність	Ваги	Під час проведення технологічного процесу та перед початком	$N = 3-6\text{ мм}$ $m = 25\text{ кг}$ $n1 = 10\text{ упак/хв}$ точн = 0,5-1%.

9.2 Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль передбачає: забезпечення і підтримання умов, необхідних для нормальної життєдіяльності мікроорганізмів-продуцентів; контроль виробничого процесу та готової продукції; своєчасне виявлення контамінації та встановлення джерела її появи [24].

Протягом вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу відбирають кожні 8 годин проби культуральної рідини для аналізу. Відібрані проби мікроскопіюють і візуально оглядають. З метою виявлення можливих заражень здійснюється періодичний посів проб на чашки Петрі з агаризованими середовищами [19].

При рості клітин на МПА клітини утворюють жовті, круглі, блискучі, маслянисті колонії діаметром 3-4 мм, які не виділяють пігмент у середовище. Поверхня колоній гладенька, форма опукла, край рівний, структура однорідна. У воді колонії дають рівномірну суспензію. Посів штрихом на середовищі МПА показує помірний ріст, край колоній гладенький, поверхня матова, забарвлення жовто-кремове. Посів уколом показує слабкий ріст в товщі агару, на поверхні ріст помірний (*Рис.5.1*).

Для мікроскопіювання використовують препарати «роздавлена крапля». Для приготування препарату у вигляді «роздавленої краплі» на середину чистого предметного скла нанести маленьку краплю води, перенести в неї невелику кількість культуральної рідини, перемішати, накрити покривним склом і мікроскопіювати. Мікроскопіювання здійснюють зі збільшенням 8х та 40х.

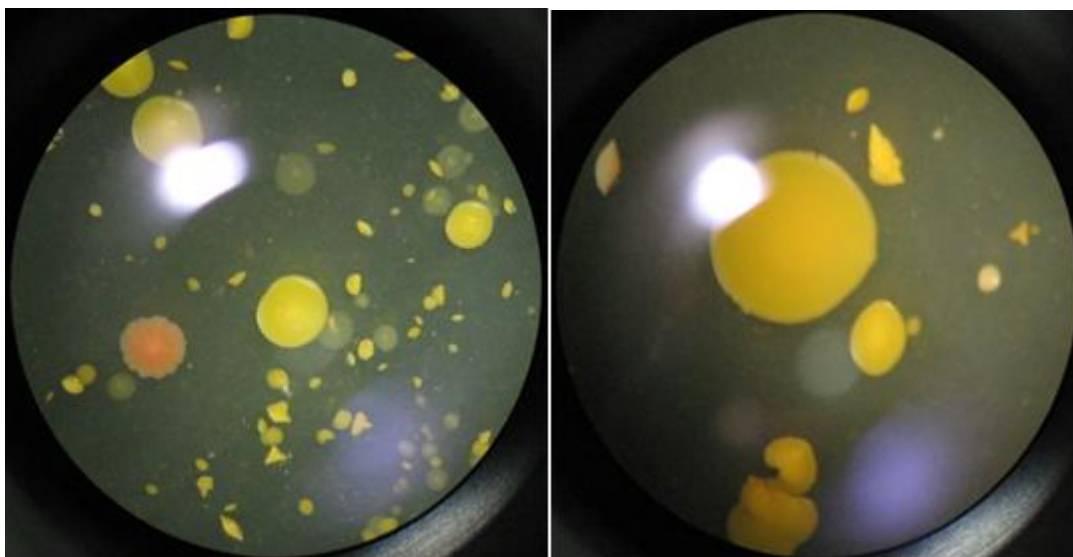


Рис. 9.2.1 Клітини мутантного штаму *Brevibacterium flavum* Н 90 на середовищі МПА (збільшення 40х)

9.3 Показники росту і синтезу лізину

На першому етапі досліджувану біомасу лізину необхідно відмити від компонентів поживного середовища. Для цього беруть 5-7 грам вологої біомаси додають 100 мл дистильованої води, перемішують і центрифугують 15-20 хв при 8000об / хв. Надосадову рідину зливають.

До наважки відмитої вологої біомаси (2-3 г) доливають 5 мл гарячої дистильованої води ($t = 80^{\circ}\text{C}$) і розтирають у ступці з кварцовим піском протягом 15 хв. Лізин та можливі інші амінокислоти при цьому переходять у водну фазу. Залишки клітинної маси відокремлюють центрифугуванням протягом 20 хв на настільній центрифугі при 3000 об / хв. Екстракт, що містить амінокислоти переносять в стакан або колбу. Далі проводять повторну екстракцію амінокислот 5-ма мл гарячої води з отриманого осаду. Екстракт відокремлюють центрифугуванням і об'єднують з першим супернатантом. Вимірюють обсяг отриманого сумарного екстракту. Паралельно визначають вологість відмитої біомаси отриманої після центрифугування. Далі отриманий екстракт (концентрація лізину 60-200) використовують для визначення накопичення лізину в культуральній рідині.

Визначають за допомогою тонкошарової хроматографії. Тонкошарова хроматографія характеризується високою чутливістю і універсальністю,

швидкістю і простотою виконання аналізу. Завдяки цим якостям, а також наочності, чіткому розділенню навіть дуже малих кількостей речовин (від 0,1 до 0,005 мкг) і надійності їх ідентифікації, ТШХ широко використовується для аналізу різних об'єктів, у т.ч. і харчових продуктів. У методі ТШХ розділення речовин ґрунтується на їх розподілі в системі тверда нерухома фаза (адсорбент) – рідка рухлива фаза (розчинник) або в системі твердий носій – рідка нерухома фаза – рідка рухлива фаза[54].

1. Підготовка хроматографічної камери.

Для того щоб запобігти випаровування розчинника при його русі на папері, камеру необхідно наситити парами розчинника. Для цього в камеру поміщають рулон фільтрувального паперу, який займає половину окружності камери і не доходить 5 см до верхнього розширення камери. На дно камери наливають невелику кількість розчинника, достатню для того, щоб просочити рулон паперу[54].

2. Підготовка паперу для хроматографії.

Вирізають смугу паперу, ширина якої повинна бути на 5 см менше діаметра камери, а довжина дорівнює висоті камери. На відстані 3,5 см від кінця смуги проводять простим олівцем стартову лінію і відзначають точки нанесення досліджуваного розчину. Точки нанесення розчинів повинні знаходитися на відстані 3 см від бічних країв хроматограми і на відстані 2,5 см одна від одної. [54]

3. Нанесення проб.

На відміченій стартовій лінії наносять точки мікропіпеткою або відкаліброваним капіляром по 40 мкл досліджуваного розчину. Діаметр плями не повинен перевищувати 5 мм. Для цього після кожного дотику капілярів плями підсушують на повітрі або струмом теплого повітря. При нанесенні проб не можна торкатися смуги паперу руками[54].

4. Висхідна хроматографія.

У верхнє розширення камери поміщають скляну паличку і підвішують папір з пробами так, щоб вона на 3-5 мм не діставала до дна камери. На дно камери обережно наливають розчинник шаром 7-10 мм.

Камеру закривають кришкою і спостерігають рух розчинника по паперу[54].

5. Прояв хроматограми

Після того як зона розчинника пройде $4/5$ довжини хроматограми, папір виймають, відзначають кордон зони розчинника. Хроматограму сушать спочатку на повітрі, потім в сушильній шафі при 60°C . Висушену хроматограму виявляють, обприскуючи її нінгідриновим реактивом з пульверизатора або обережно занурюючи в ванночку з проявником, висушують на повітрі і прогрівають в сушильній шафі при $t\ 100^{\circ}\text{C}$ 10 хв. Проявлені плями обводять олівцем і обчислюють R_f для лізину. Візуально оцінюють кількісний вміст лізину в суміші за інтенсивністю фарбування окремих плям[54].

9.3.1 Визначення концентрації біомаси

Прямий метод(Метод Коха):

В ряду послідовних десятикратних розведень досліджуваного зразка з 2 останніх розведень (ступінь розведення залежить від кількості КУО в 1 мл досліджуваного препарату). Роблять кілька послідовних десятикратних розведень культуральної рідини, орієнтовно 7-8 штук. Далі по 0,1 мл мікробної суспензії висівають на чашки Петрі з поживним середовищем (МПА або Гаузе-2). Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища шпателем Дрігальського або за допомогою скляних бус до повного вбирання (висихання) суспензії. Чашки закривають і поміщають перевернутими догори дном в термостат для інкубації. Посіви інкубують при температурі $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ протягом 12- 24 год. Метод придатний для визначення лише живих клітин, та досить тривалий у часі.

Після інкубації підраховують кількість колоній, що вирости після неї та множать на розведення культуральної рідини і множать на їх кількість. Після

число перемножують на 1 мл суспензії і отримують кінцеве значення[61].

Непрямий метод :

Концентрацію біомаси, а точніше концентрацію КУО в 1 мл культуральної рідини визначають за допомогою фотоелектроколориметра(ФЕК), а саме за різницею оптичної густини D клітинної суспензії та еталонного зразка і переводять відповідне значення оптичної густини за допомогою калібрувального графіка у КУО (концентрацію клітин утворюючих одиниць) виражену у КУО/мл.

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на кількість КУО за допомогою калібрувального графіка відносно еталонного зразка.

Для цього у пробірки вносимо 9 мл дистильованої води і 1мл культуральної рідини. Суміш збовтуємо і вимірюємо оптичну густину на фотоелектроколориметрі (при довжині хвилі 540 нм)[61].

9.3.2 Визначення концентрації лізину хімічним методом

Хімічний метод заснований на здатності амінокислоти лізину утворювати кольоровий продукт реакції в кислому середовищі. Інші амінокислоти (крім проліну та орнітину) при значенні кислотності середовища менше 3 не утворюють з нінгідрином кольорових комплексів[54].

До 0,3 мл досліджуваного екстракту (концентрація лізину 60 -200 мкг/мл) доливають 0,2 мл 3М HCl і 0,5 мл нінгідринового реактиву. Процес проводять в пробірках на 10-20 мл зі скляними пробками. Пробірки поміщають на 1 годину в киплячу водяну баню, потім охолоджують при кімнатній температурі і додають 3 мл концентрованої ортофосфорної кислоти або етанолу. У контроль замість досліджуваного розчину вносять дистильовану воду[55].

Вимірюють оптичну щільність розчину проти контролю при 540 нм в кюветі з товщиною шару 5 мм. Концентрацію лізину визначають за калібрувальним графіком.

Побудова калібрувального графіка

Готують стандартний розчин L-лізину, що містить 1 мг/мл амінокислоти. Для побудови калібрувальної кривої з стандартного розчину готують ряд робочих розчинів за схемою[54], представленій в таблиці 9.3.1.

Таблиця 9.3.1

Критерії робочого розчину

Робочий розчин		Об'єм робочого розчину, мл	Концентрація лізину, мкг/мл
Стандартний розчин, мл	Дистильована вода, мл		
1	4	0,3	200
1	5	0,3	166
1	7	0,3	125
1	9	0,3	100
1	16	0,3	60

Визначення концентрації меляси

Основним джерелом вуглецю в середовищі виступає меляса, гідролізату кормових дріжджів та кукурудзяного екстракту. Концентрація даного джерела вуглецю визначається модифікованим глюкозооксидазним методом з використанням біосенсорів з іммобілізованою глюкозооксидазою та амперометричним датчиком.

Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 1500 об/хв 15-20 хв, далі відцентрифуговану суспензію фільтрують через фільтрувальний папір, фільтрат відбирають у окрему ємність для аналізів.

Відбирається певний об'єм проби, його розводять у 250-1000 разів, далі від розведеного розчину відбирають 5-10 мл і переносять у 20 мл 20 мМ буферного розчину системи: KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 з рН 7.2. До даної системи додають глюкозооксидазу іммобілізовану на полімері ЕДТ (20 мМ фосфатному буфері, рН 6,2, яка складалася з 10–2 М 3,4-

етилендіокситіофену, 10–3 М поліетиленгліколю та 30 мг/мл розчину ГОД) у вигляді суспензії.

Вимірювання концентрації меляси здійснюється за допомогою амперометричного перетворювального приладу, що складається з традиційної триелектродної системи, в якій друкований електрод SensLab (SensLab GmbH, Leipzig, Німеччина) [55] поєднав у собі всі три електроди: платиновий робочий, до поміжний та електрод порівняння. Платинові друковані електроди SensLab досліджували на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до +600 мВ. Вимірювання проводять опусканням датчика амперометричного приладу у розчин-систему з глюкозооксидазою та підготовленою культуральною рідиною.

Величина, що вимірюється - це сила струму, що визначається у нА. Концентрацію глюкози визначають за градувальним графіком залежності сили струму (нА) і концентрації глюкози (мМ) [55]. Одержане значення концентрації спочатку перемножують на ступінь розведення, а потім переводять концентрацію з мМ у г у певному об'ємі чи г/л[55].

Визначення амонійного азоту

Метод Несслера базується на утворенні забарвленої важкорозчинної сполуки при взаємодії реактиву Несслера (K_2HgI_4) з аміаком в нейтральних або лужних розчинах[6]:



Великого надлишку луку слід уникати, оскільки може відбутися розкладання $NH_2Hg_2I_3$ з утворенням оксиду ртуті. Забарвлена сполука $NH_2Hg_2I_3$ схильна до утворення негативно заряджених колоїдних частинок. Для отримання рівномірної і стійкої суспензії в розчин вводять захисний колоїд – желатин, полівініловий спирт. При малих концентраціях аміаку колоїдні розчини мають жовте забарвлення, при збільшенні концентрації з'являється бурий відтінок. Отримання в ході аналізу колоїдних розчинів, здатних до коагуляції, знижує відтворюваність результатів аналізу, одержуваних методом Несслера. Для визначення аміаку до 1 мл супернатанту

культуральної рідини додають 1 мл реактиву Несслера. Коефіцієнт екстинції вимірюють при довжині хвилі 400–425 нм. Концентрацію аміаку визначають за калібрувальним графіком. Фотометричному визначенню азоту методом Несслера заважають іони, що випадають в осад у лужному середовищі і утворюють нерозчинні сполуки з йодид - іонами та іонами ртуті (магній, марганець, залізо, титан, сульфід-іони та ін.) [64].

РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ОПИС АПАРАТУРНО-ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЧОЇ ДІЛЬНИЦІ

Випарювання відноситься до числа розповсюджених технологічних процесів у фармацевтичному виробництві, що використовується для загущення водних і спиртових витяжок при одержанні густих і сухих екстрактів, індивідуальних і сумарних екстракційних препаратів з рослинної, тваринної та мікробіологічної сировини[58].

При випарюванні відбувається зменшення кількості леткого розчинника й підвищення концентрації нелетких речовин. У більшості випадків цей процес проводять при інтенсивному підведенні тепла, для забезпечення кипіння рідини й утворення парів розчинника. Пара, що утворюється над киплячою рідиною, називається вторинною (вода, етанол і ін.) [58].

Залежно від властивостей рідин, що випарюються (мало концентровані, рухливі або в'язкі, наявність термолабільних біологічно активних речовин та ін.), а також від параметрів гріючої пари, випарювання здійснюють при нормальному тиску або під вакуумом у робочій камері апарата (випарника).

З метою збереження діючих речовин випарювання з кипінням рідини здійснюють в установках, у яких вторинна пара, що утворюється над рідиною, постійно видаляється з робочої частини апарата (випарника), що створює розрідження (вакуум) і знижену температуру кипіння (40-55 °С).

Проведення процесу випарювання під вакуумом має істотні переваги: знижується температура кипіння розчину, уловлюється цінна вторинна пара, для нагрівання випарного апарата можна використати пару низького тиску. Внаслідок зниження точки кипіння рідини збільшується середня різниця температур між гріючою парою і рідиною, що обігрівається, а це призводить до зменшення необхідних розмірів випарного апарата[52].

					НУХТ БТЕК 04.01.16 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Гавриленко Я.В			РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ОПИС ЗАПАРАТУРНО- ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЧОЇ ДІЛЬНИЦІ	Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Слободян О.П.						13434	8
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

Наступним важливим етапом процесу автоматизації є сушіння. *Розпилювальні сушарки* застосовують для висушування ферментів, амінокислот тощо. Концентрація сухих речовин у розчині повинна бути не менше 10%. Розпилювальні сушарки дають м'які режими сушіння, що запобігають втратам БАР. У розпилювальних сушарках можливе суміщення процесів висушування та мікрокапсулювання. Відцентровий розпил продукту дозволяє рівномірно розпилювати рідину та інтенсифікувати процес випарювання. В розпилювальній сушарці рідина перетворюється в туман. Камери для висушування виготовляють з нержавіючої сталі[52].

Схема розпилювальної сушарки представлена на рис. 10.1. Основа апарата - циліндричний корпус 1. Днище корпусу може бути конічним (як показано на схемі) або плоским. В останньому випадку висушений матеріал виводиться разом з відпрацьованим повітрям і відділяється від нього в потужних циклонах. Концентрат, що підлягає висушуванню, безперервно подається в апарат через отвір кришки. Через центр кришки проходить вал електродвигуна. Наприкінці валу закріплений диск 2 діаметром 100... 400 мм.

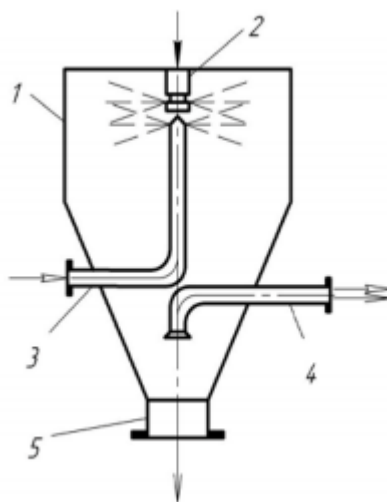


Рис. 10.3. Схема розпилювальної сушарки: 1 – корпус; 2 – розпилювальний пристрій; 3 – введення теплоносія; 4 – відпрацьований теплоносій; 5 – відведення сухого продукту[52].

Диск обертається зі швидкістю 5...40 тис.обертів/хв. Для досягнення такої швидкості між диском та валом встановлюють редуктор, що підвищує

швидкість обертання вала електродвигуна. Іноді для обертання вала використовують парову турбінку. Після надходження потоку концентрату до центра диска під дією відцентрової сили рідина заповнює канали рельєфу диска, мікропотоки рухаються до його периферії, зриваються з краю диска і надходять у верхню частину камери у вигляді мікрокрапель. За допомогою дисків можна розпилювати не тільки чисті рідини, але й пасти. Для диспергування рідини використовують також форсунки, роботу яких забезпечують стиснене повітря або пара. Використання форсунок спрощує розпилювання матеріалу, але вимагає відсутності в рідині будь-яких механічних домішок. Розпилювальні сушарки з відцентровими дисками називають сушарками Краузе, а з форсунками - сушарками системи "Siccaton"[58].

Одночасно знизу під диск подають потік гарячого газового сушильного агента 3 (повітря, азот, топкові гази, наприклад, продукти згоряння природного газу). Подача газу може бути здійснена і зверху над диском. Вибір способу подачі сушильного агенту зумовлений схемою процесу: прямотечією або протитечією. Якщо подачу здійснювати зверху, то сушіння буде організовано прямотечією. Такий метод менш інтенсивний, ніж протитечією, але це сприяє м'якшому режиму сушіння. Попереднє нагрівання агента здійснюють в калориферах, які в свою чергу, обігріваються електроенергією, природним газом або парою. Топкові гази самі по собі мають достатньо високу температуру і не потребують штучного нагрівання, вони хімічно інертні до матеріалу, що висушується, але можуть забруднити кінцевий продукт[58].

Після контакту сушильного агента з мікрокрапельками вологого матеріалу відбувається майже миттєве випаровування води, але температура на поверхні матеріалу дорівнює температурі мокрого термометра і ніколи не досягає температури теплоносія. Оскільки перегрівання матеріалу не спостерігають, то ця властивість є особливо привабливою для сушіння термолабільних матеріалів[52].

Аерозоль, що утворився, рухається до виходу з апарата. Оскільки швидкість аерозолі є малою, регламентується і регулюється, частина висушеного матеріалу седиментує і накопичується в кінчній частині апарата 5, а решта (близько 20%) виноситься з відпрацьованим газом 4 у циклоні.

Звичайно концентрація твердих частинок в аерозолі становить 2...4 г/м³. Відділений від відпрацьованого повітря у циклонах матеріал повертають в сушарку або змішують з основною масою поза сушаркою. Іноді потрібно висушити матеріал, що містить незначну кількість сухих речовин. Під час сушіння таких матеріалів утворюється і незначна кількість порошкоподібного матеріалу, який може "зависнути" на стінках апарата. Для попередження цього явища деякі сушарки споряджають пристроями, які утворюють біля стінок апаратів повітряні подушки, які не дають можливості осісти порошку на цих стінках. Для попередження зсідання порошоків на стінках сушарки в концентраті попередньо розчиняють інертні наповнювачі, доводячи вміст сухих речовин до 13...18 %[60].

Практика попереднього розчинення наповнювачів поширена при сушінні ферментних препаратів, оскільки ці наповнювачі не тільки полегшують технологію сушіння, але й виконують функції стабілізаторів кінцевої продукції. Так, наприклад, перед сушінням у концентрованому і охолоджену розчині лужної протеази розчиняють хлорид кальцію. Таке попереднє оброблення концентратів називають рідинною стандартизацією.

Розпилювальні сушарки є досить складними і небезпечними апаратами, оскільки усередині може утворитись вибухонебезпечна суміш органічного порошку і повітря. Тому їх роботу намагаються автоматизувати, використовувати інертні гази, розташовувати їх поза цехом на відкритому повітрі. Автоматизація до того ж дозволяє інтенсифікувати процес, підвищувати якість продукції, скоротити питомі витрати палива [59].

Таблиця 10.1

Технологічні вимоги до системи автоматизації ділянки виробничого сушіння

№ з.п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
ВВУ-1	Вакуум-випарна установка	рН: середовища	5-6	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
		Тиск концентрування	0,05-0,09 МПа	Контроль, Регулювання	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
		Температура випарювання Температура середовища	70°±0,1° С 50°±0,1° С	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	АРМ оператора
С-2	Розпилююча сушарка з відцентровими дисками для розпилення гранул	Вологість продукту	≤ 3%	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
		Температура сушіння Температура середовища	120°±0,1° С 60°±0,1° С	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	АРМ оператора
		Тиск сушіння	0,01-0,03 МПа	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
		Час перебування продукту	1-2 с	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Захист від переповнення	Вплив на кількість обертів/хв і кнопка «Стоп» по місцю

10.1 Обґрунтування та вибір системи засобів автоматизації

Виходячи з умов виробництва обираються новітні засоби автоматизації, що мають похибку не більше 1%, задовольняють потреби в надійності та швидкодії. Для зручності підключення та економії на модулях контролера обираються датчики з уніфікованим вхідним сигналом 4-20 мА. Використовуються вихідні уніфіковані сигнали 0-10 В[60].

10.2 Опис функціональної схеми автоматизації

У першому контурі відбувається контроль і реєстрація рівня рН середовища (поз. 1а, 1б).

У другому контурі здійснюється контроль та регулювання тиску, який має регламентоване значення 0,05-0,09 МПа. за допомогою датчика (поз. 2а, 2б). Спостереження за зміною тиску передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Сигналізація про відхилення значення або досягнення заданого значення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога.

У третьому контурі здійснюється контроль та регулювання температури датчиком температури (поз. 3б). Регулюють температуру в вакуум-випарнику (подачею пари/води) виконавчими органами (поз. 3в, 3г) за допомогою електропневмоперетворювачів (поз. 3б, 3а).

У четвертому контурі здійснюється контроль та регулювання вологості продукту датчиком вологості (поз. 4б). Регулюють вологість в сушарці за допомогою термогігрометра (поз. 4а).

У п'ятому контурі здійснюється контроль та регулювання температури датчиком температури (поз. 5б). Регулюють температуру в вакуум-випарнику (подачею пари/води) виконавчими органами (поз. 5в, 5а) за допомогою електропневмоперетворювачів (поз. 5б, 5г).

У шостому контурі здійснюється контроль та регулювання тиску, який має регламентоване значення 0,01-0,03 МПа. за допомогою датчика (поз. 6а, 6б). Спостереження за зміною тиску передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Сигналізація

про відхилення значення або досягнення заданого значення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога.

У цьому контурі здійснюється контроль та регулювання часу перебування концентрату в сушарці регулюється механізмом (поз. 7а). Спостереження за зміною часу здійснюється на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у архіві. Сигналізація про відхилення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB1).

10.3 Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Таблиця 10.3.1

№	№ позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
1	1а	Датчик рН, діапазон вимірювання 0...14, матеріал – скло/кераміка, робоча температура 0...140 °С, робочий тиск – макс 7 бар	Memosens CPS171D	Endress+Hauser (Росія)
	1б	1-/2-канальний перетворювач для рН-метра Memosens, матеріал – полікарбонат, робоча температура -20...60 °С, ступінь захисту IP67, вхідний сигнал – 2 входи 0/4...20 мА (опція) або 2 цифрових входи (опція), вихідний сигнал – 2...4 токових виходи 0/4...20 мА	Liquiline CM442	Endress+Hauser (Росія)
2	2а,6а	Частотний перетворювач для двигунів середньої потужності. Потужність 0.75кВт 1-ф/220 В, номінальний струм 4,2 В	VFD007EL21A	Delta Electronics
3	2б,6б	Диференційний перетворювач тиску, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, під'єднання – 1/2NPT, клас точності – 0,075, вихідний сигнал аналоговий	PAD	Kobold
3	3а,5а	Датчик термоперетворювач опору ТСП, НСХ-Pt100, діапазон (0 – 150)°С, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА	TCM-0193-01	ЧТП “Теплоприбор” (Росія)

4	3б,5б	Електро-пневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwer серія 2700	СВ Альтера (Україна)
5	3в,5в	Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713WP	Dwyer
6	3г,5г	Поплавковий датчик рівня діапазон робочих температур -60...+125°C, густина робочого середовища $\geq 0,66 \text{ г/см}^3$, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА, матеріал – нержавіюча сталь 12Х18Н10Т	ПДУ-И	ОВЕН (Україна)
7	4а	Датчик вологості ХН10Р	ХН20Р	(DIXELL, Italy)
8	7а	Реле часу NTE8-480В Аско Укрем	NTE8-480В	Китай
12	КМ1	Магнітний пускач, робочий струм 7А, управляючий сигнал 220 В	3RT2015- 1AP01	SIEMENS
13	SB1	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»- «Стоп»	8LP2T B7113	Lovato

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біологічна і біоорганічна хімія : базовий підручник: у 2 кн./ кол.авт.; за ред. Б 63 чл.-кор. НАМН України, проф. Б.С.Зіменковського, проф. І.В. Ніженковської. – Кн.1 : Біоорганічна хімія/ [проф. Б.С.Зіменковського, проф. І.В. Ніженковської.]; за ред. проф. Б.С.Зіменковського, проф. І.В. Ніженковської. – К. :ВСВ «Медицина»,2014. – 272 с.
2. Биохимия / Под ред. Е.С. Северина. — М., 2003; Біологічна хімія / Л.М. Вороніна, В.Ф. Десенко, Н.М. Мадієвська та ін. — Х., 2000; Боєчко Ф.Ф., Боєчко Л.О. Основні біохімічні поняття, визначення і терміни. — К., 1993; Гонський Я.І., Максимчук Т.П. Біохімія людини. — Тернопіль, 2001; Губський Ю.І. Біологічна хімія. — К.–Тернопіль, 2000.
3. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова // К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
4. Підгорський В. С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В. С. Підгорський, Г. О. Іутинська, Т. П. Пирог // К.: Наук. думка, 2010. – 328 с.
5. Виестур У. Э. Биотехнология – биологические агенты, технология, аппаратура / У. Э. Виестур, И. А. Шмите, А. В. Жилевич // Рига: Зинатне, 1987. – 261 с.
6. Некоторые результаты селекции штамма-продуцента лизина *Brevibacterium sp.* 22 / Г. А. Удровский, Л. Б. Шкагале [и др.] // Технология микробиологического синтеза. – 1978. – С. 11-17.
7. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин [и др.] // М.: Высшая школа, 2008. – 469 с.
8. Васильківська М. К. Сучасний стан та перспективи біотехнологічних методів виробництва амінокислот / М. К. Васильківська, Ю. М. Пенчук // *Ukrainian food journal*. – 2012. – № 2. – С. 51-54.

9. Біологічна хімія / Л. М. Вороніна, В. Ф. Десенко, Н. М. Мадієвська [та ін.]; за ред. проф. Л. М. Вороніної // Х.: Основа: Видавництво НФАУ, 2000. – 608 с.
10. Formula of the 20 common amino acids [Електронний журнал] / E. Foulquier, C. Ginestoux, Z. Ouarray [et. al.] // Режим доступу до журн.: http://www.imgt.org/IMGTEducation/Aidememoire/_UK/aminoacids/formuleAA/
11. Бейли Дж. Основы биохимической инженерии. Пер. с англ. В 2-х частях. Ч. 1 / Дж. Бейли, Д. Оллис. // М.: Мир, 1989. – 692 с.
12. Lysine [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://www.aminoacidsguide.com/Lys.html>.
13. Гонський Я.І. Біохімія людини: Підручник // Я. І. Гонський, Т. П. Максимчук // Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 736 с.
14. Лизин – одна из важнейших незаменимых аминокислот в обеспечении полноценного питания/ А. С. Фаустов, М. И. Чубирко, О. В. Бобрешова [и др.]; под общей редакцией А. С. Фаустова // Воронеж: Воронежский государственный университет, 2003. – 88 с.
15. Шелтон Г. Правильное питание // М.: ФАИР. 2000. – 320 с.
16. Eurolysine – европейский лидер в области биотехнологий // Комбикорма. – 1999. – № 7. – С. 49.
17. Ібатулін І. І. Перетравність поживних речовин у бойлерів різних рівней лізину в комбікормах / І. І. Ібатулін, І. І. Ильчук, М. Я. Кривенок // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво», 2014. – Вип. 21, №24. – С. 144-148.
18. Величко І. М. Нова форма кормового концентрату лізину та ефективність його використання в годівлі свиней / І. М. Величко // Сучасні проблеми вет. медицини, зооінженерії та технологій продуктів тваринництва. – Львів, 1997. – С. 458-459.
19. Визначення вмісту лізину в кормових добавках методом капілярного електрофорезу / Т. Р. Левицький, Г. П. Ривак, Г. В. Кушнір, Р. О. Ривак

- // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – 2013. – Вип. 14, № 3-4. – С. 55-59.
- 20.Лягушкин И. Аминокислотный баланс [Электронный ресурс] / И. Лягушкин // «Агротехника и технологии». – 2008. – Вип. 10, №6. – Режим доступа до журн.: <http://www.agroinvestor.ru/technologies/article/14813-aminokislotnyy-balans/>
- 21.Тараненко Г. А. Лизин и метионин в кормлении / Г. А. Тараненко // Животноводство. – 1974. – № 1. – С. 43-44.
- 22.Сломчинський М. М. Оптимізація доз згодовування ліпроту молодняку кролів при вирощуванні на м'ясо: автореф. дис. на здобуття ступеня канд. с.-г. наук.: спец. 06.02.02 «Годівля тварин і технологія кормів» / М. М. Сломчинський – К., 2005. – 18 с.
- 23.Digestible lysine requirements of straightrun broiler chickens from fifteen to twenty-eight days of age / M Mehri, H Nassiri-Moghaddam, H Kermanshahi, M Danesh-Mesgaran // J. Anim. Vet. Adv, 2010. – V. 9, Issue 17. – P. 2321-2324
- 24.Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин [и др.] // М.: Высшая школа, 2008. – 469 с.
- 25.Taormina J. P. Microbiological Research and Development for the Food Industry / J. P. Taormina // Food microbiology and food safety series / USA: CRC Press, 2012. – 355 p.
- 26.Лизин – одна из важнейших незаменимых аминокислот в обеспечении полноценного питания/ А. С. Фаустов, М. И. Чубирко, О. В. Бобрешова [и др.]; под общей редакцией А. С. Фаустова // Воронеж: Воронежский государственный университет, 2003. – 88 с.
- 27.Faurie R. Microbial Production of L-Amino Acids / R. Faurie, J. Thommel // USA: Springer Science & Business Media, 2003. – Т. 79. – 185 p.
- 28.Патент УКР № 17130. Спосіб одержання l- лізину.// Сушко В.І., та інші.,-18-03-1997.

- 29.Патент УКР № 39807. Спосіб одержання l- лізину.// Мариночкіна Лариса Іванівна, Краєва Наталія Кирилівна, Руських Анна Миколаївна, Василенко Наталія Іллівна, Лужков Олександр Михайлович, та інші.,15-06-2001.
- 30.Патент РФ № 2549690С1. L-ЛИЗИН-ПРОДУЦИРУЮЩАЯ БАКТЕРИЯ *Corynebacterium glutamicum* ИЛИ *Brevibacterium flavum*, УСТОЙЧИВАЯ К ФУЗИДИНОВОЙ КИСЛОТЕ, И СПОСОБ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА L-ЛИЗИНА С ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ.// Тарутин М.Г., и другие,-8-10-2013.
- 31.Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. / Edited by G. John, Holt Williams & Wilkins // Baltimor, 1994. – 787 p.
- 32.Богданов Г.А. Кормление сельскохозяйственных животных. - М.: Агропромиздат, 1990.- 624 с.
- 33.Белковый обмен и питание/Пер. с англ. Г.Н. Жидкоблиновой: Под. Ред. В.Ф. Вракина. - М.: Колос, 1980.- 352 с.
- 34.Dean, W.D. 2005. Amino acid requirements and low crude protein. Amino acid supplemented diets for swine and poultry. M.S., Kansas State University.
- 35.Амінокислоти: успішний вибір/ журнал//The Ukrainian Farmer Під Редакцією О.Махно, канд. с.-г. Наук.- 10.12.2020
- 36.L-ЛИЗИН СУЛЬФАТ, 70% [Електронний ресурс] : http://agroforward.com.ua/ru/product/l-lzin-sulfat-70_05/
- 37.Ліпрот [Електронний ресурс] : <https://vetagrozhist.com/p639982509-liprot-eko-dlya.html>
- 38.Шейко И.П., Смирнов В.С. Свиноводство. - Мн.: Новое знание, 2005. - 384 с.
- 39.ОСНОВИ НОРМОВАНОЇ ГОДІВЛІ СВИНЕЙ/ Виробнично-практичні рекомендації //Укладачі: Топіха Віра Сергіївна, Лихач Вадим Ярославович, Луговий Сергій Іванович, Лихач Анна Василівна,

- Крамаренко Сергій Сергійович:// Миколаївський національний аграрний університет, 2016
- 40.Тенденції розвитку галузі тваринництва та ринків м'ясо-молочної продукції України /[І. М. Демчак, Д. М. Микитюк, І. В. Свиноус та ін.]. – К. : НДІ “Укراгропромпродуктивність”, 2019. – 68 с
41. Импорт кормовых фосфатов [Електронний ресурс] : <http://agro.press/ru/article/import-kormovykh-preparatov-v-ukraine--2017>
- 42.Мосичев М.С.Общая технология микробиологических производств : учеб./ М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов – М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1982. – 264 с.
- 43.Малежик І. Процеси та апарати харчових виробництв. - К.: НУХТ, 2003. - с. 400.
- 44.Наказ від 14.12.2001 № 502 Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20011214_502.html.
45. Каустична сода [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://him-component.com.ua/p568048886-kausticheskaya-soda-granula.html?gclid=CjwKCAjw8J32BRBCEiwApQEKgeCGYnxjzHiq4GxZCTst-m5XBRX5L-_oW4gd2Pi
46. Кальцинована сода [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://novohim.com.ua/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/soda-kalcinirovannaya/?attribute_fasovka=25%20%D0%BA%D0%B3&gclid=CjwKCAjw8J32BRBCEiwApQEKgdiUqOv4OF02_YWqS9IIABiJafXnCQUc9TU8vbiQM1oz6kFKHI_mpRoCNIQQA_vD_BwE
47. Гембар [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.attis.com.ua/site/liquid/gembar.html>
- 48.Шманенков Н.А., Кошаров А.Н., Дьячкова Г.С. Биологические основы рационального аминокислотного питания сельскохозяйственных

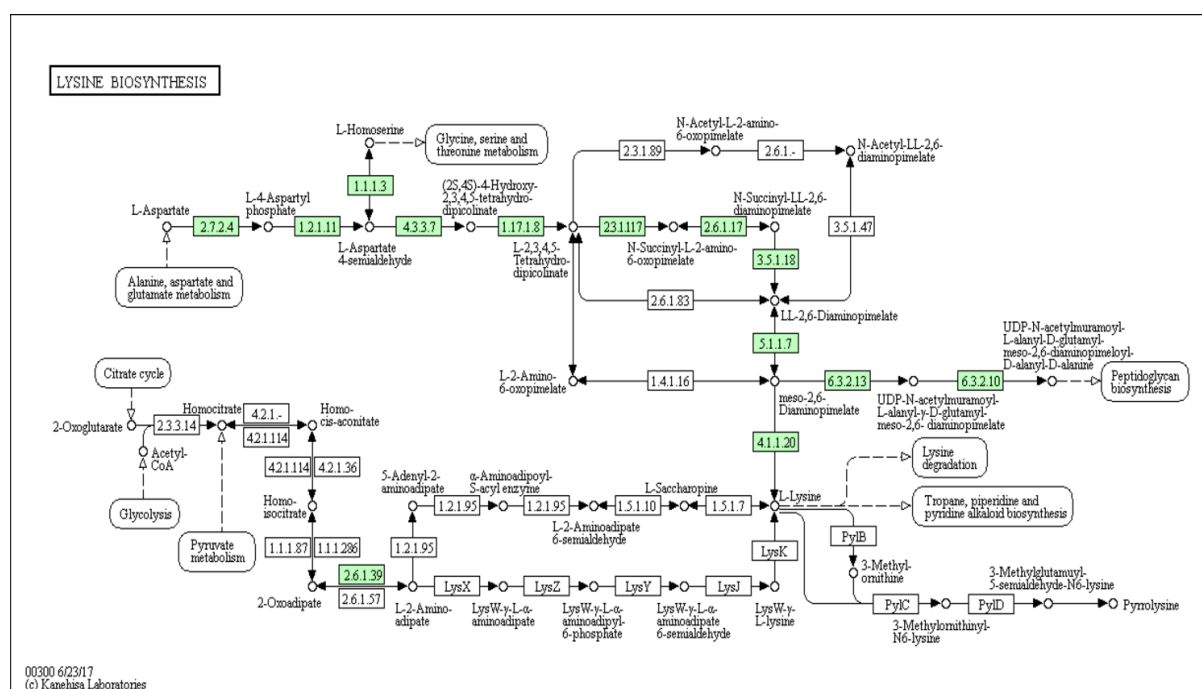
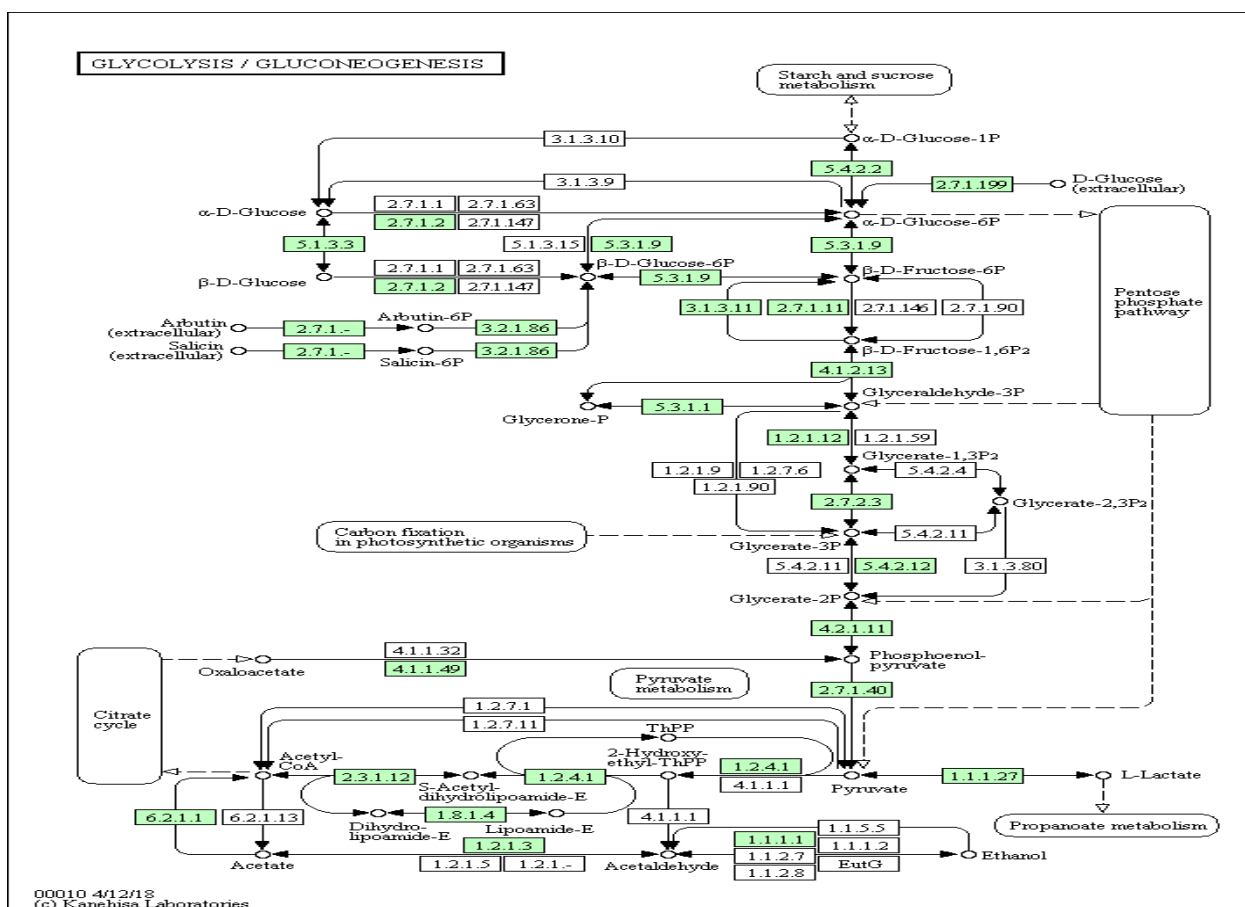
- животных. ВИНТИ, М., 1967
- 49.Томмэ М.Ф., Филипович Э.Г., Птак И. Аминокислоты в животноводстве. Материалы междунар. симпозиума. Калуга, 1971.
- 50.Хаджинов М.И., Рядчиков В.Г. Животноводство, 2, 1972, 51
- 51.Патент УКР № 40762. Спосіб комплексної переробки культуральної рідини продуцента лізину.// Мариночкіна Лариса Іванівна, Краєва Наталія Кирилівна, Руських Анна Миколаївна, Василенко Наталія Іллівна, Лужков Олександр Михайлович, та інші., 15-06-2001.
- 52.Апарати мікробіологічної промисловості : навч.посібник/ І.П.Данилов, С.І.Самійленко.- Харків: НТУ «ХП», 2008.-272 с.
- 53.ГОСТ Р 56913-2016 Лизин кормовой. Общие технические условия [Електронний ресурс]: <http://docs.cntd.ru/document/1200134026>
- 54.Биотехнология: Учеб. Пособие для вузов. В 8 кн./Под Б 63 ред. Н. С. Егорова. В. Д. Самуилова. Кн. 6: Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов/Быков В. А., Крылов И. А., Манаков М. Н. и др. – М.: Высш. шк., 1987. – 143 с.: ил.
- 55.Бекер М. Е., Лиепиньш Г. К., Райпулис Е. П. Биотехнология, М., ВО Агропромиздат. 1990.
- 56.Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. рекомендації до практ. занять для студ. напр. підгот. 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. / уклад. Ю.В.Карлаш – К.: НУХТ, 2016. – 83 с.
- 57.Дезактин [Електронний ресурс]: <https://apteka911.com.ua/shop/poroshok-dlya-dezinfektsii-dezaktin-1-kg-p27126>
- 58.КАРЛАШ Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с

- 59.Ельперін, І.В. : Автоматизовані системи управління технологічними процесами : конспект лекцій до вивчення дисципліни для студентів спеціальності 6.080400 «Інформаційні управляючі системи та технології» напряму підготовки 0804 «Комп'ютерні науки» денної та заочної форм навчання / І.В. Ельперін, С.М. Швед. – К. : НУХТ, 2007. – 71с.
- 60.Киричук, С.А. Автоматизація виробничих процесів : конспект лекцій з дисципліни «Автоматизація виробничих процесів» для студентів механічних та технологічних спеціальностей денної та заочної форм навчання / уклад. С.А.Киричук, А.П.Ладанюк. – К. : НУХТ, 2007. – 168 с.
- 61.Визначення біомаси зважуванням. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://sdamzavas.net/1-56159.html>
- 62.Ферментер об'ємом 100 м³ [Електронний ресурс] //Агромаш. – Режим доступу:<http://www.agro-mash.ru/fermenter.html>
- 63.Фільтри тонкої очистки[Електронний ресурс] // Airpol. – Режим доступу:<http://www.airpol.com.ua/catalog/ochystka-povtria/filters/filtry-tonkoi-ochystky/>
- 64.Установка безперервної стерилізації [Електронний ресурс] // AIRONE. – Режим доступу:http://www.airone.ru/s2/catalog_2/?ID=59&SECTION_ID=303
- 65.Системы воздухоподготовки[Електронний ресурс] // Уралкомпрессормаш. – Режим доступу:http://www.ukm.ru/systemy_vozduhopodgotovki/
- 66.Компрессор винтовой Atlas Copco GX 7 10P / 400В 3ф 50Гц без N / CE[Електронний ресурс] //Группа компаний Воздух. – Режим доступу:<http://www.companyair.ru/kompressor-vintovoj-atlas-copco-gx7-10p-400v-3f-50hz-bez-n-ce>

- 67.Фильтр карманный грубой очистки воздуха G3-G4[Электронний ресурс] //Айс-климат. – Режим доступу:<http://air-klimat.prom.ua/p203201321-filtr-karmannyj-gruboj.html>
- 68.Дозатори[Электронний ресурс] //Техноваги. – Режим доступу:<http://www.technowagy.com.ua/uk/products/31>
- 69.Емкости из нержавеющей стали от 30 до 100000 литров[Электронний ресурс] //ЧП "Стройторгсервис". – Режим доступу:<http://stprom.com.ua/p15745045-emkosti-nerzhaveyuschej-stali.html>.
- 70.Трубкові насоси АТР[Электронний ресурс] //Насоси і насосне обладнання". – Режим доступу:<http://www.prom-nasos.com.ua/pdf/atr.pdf>
- 71.Приточно-витяжні установки АФ[Электронний ресурс] // Вент Заводи. – Режим доступу:<http://v-z.com.ua/ua/category/pritочно-vytzhnye-ustanovki -af/>
- 72.Диаэм – продажа лабораторного оборудования, расходных материалов и реактивов.– Режим доступу:<http://www.dia-m.ru>.
- 73.Дозатор ваговий для сипучих продуктів [Электронний ресурс]: <http://www.vostok.dp.ua/ukr/catalog/products/scale/doza/product.html?id=4117>
- 74.Реактор-збірник культуральної рідини [Электронний ресурс]: <http://metall-servis-grupp.zakupka.com/p/789662405-reaktor-iz-nerzhaveyushchey-stali-ot-10-litrov-do-100m3-nalichie/>
75. Вакуум-випарна установка [Электронний ресурс]: <http://www.gc-machinery.com/uk/falling-film-vacuum-evaporator-32.html>
76. Сушарка розпилювальна [Электронний ресурс]: <https://zakupka.com/p/283949840-raspylitelnaya-sushilka-anka-makine/>
77. Автомат пакувальний [Электронний ресурс]: <https://prom.ua/ua/p29952421-fasovochno-upakovochnyj-avtomat.html>
78. Насос відцентровий [Электронний ресурс]: <https://ukrnasos.com.ua/uk/%D0%BD%D0%B0%D1%81%D0%BE%D1%81%D0%B8->

[%D0%B2%D1%96%D0%B4%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B2%D1%96-%D1%81%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D0%B9%D0%BD%D1%96-%D1%82%D0%B8%D0%BF%D1%83-%D1%86%D0%BD%D1%81/%D1%86%D0%BD%D1%81-60/](#)

- 79.Пластинчатый теплообменник Swep E6Tx12[Электронный ресурс] // Компания "Акваимпорт. – Режим доступа: Пластинчатый теплообменник Swep E6Tx12[Электронный ресурс] // Компания "Акваимпорт. – Режим доступа:<http://aquaimport.com.ua/p411956472-plastinchatyj-teploobmennik-swep.html>



Изобретение относится к технологии получения L-лизина микробиологическим синтезом с использованием штаммов-продуцентов преимущественно типа *Brevibacterium* sp., ВНИИгенетика-90, *Brevibacterium lactofermentum* НИИГА-88 и им подобных и подходящих произвольных питательных сред.

При этом термин "получение L-лизина" здесь и далее обозначает преимущественно процесс получения L-лизина как целевой продукт в смеси с остатками питательной среды, микроорганизмами-продуцентами и иными продуктами их жизнедеятельности, независимо от того, будет ли L-лизин впоследствии выделен в чистом виде, или использован иным образом, например, в виде концентрированной добавки в комбикорма для сельскохозяйственных животных и птиц, полученной обезвоживанием культуральной жидкости.

Общезвестно, что L-лизин относится к числу незаменимых аминокислот, производство которых в мировой экономике уже давно стало крупнотоннажным, оцениваемым в несколько сот тысяч тонн в год.

Поэтому к технологическим процессам производства лизина предъявляется комплекс систематически ужесточающихся труднореализуемых требований. Действительно, весьма желательно, чтобы эти процессы были:

как можно более производительными и как можно менее материало- и энергоемкими.

Выполнение указанных требований может быть достигнуто различными средствами.

Одно из наиболее активно разрабатываемых направлений поиска таких средств предусматривает использование штаммов-продуцентов, способных к так называемому "сверхсинтезу" L-лизина, под которым подразумевают их способность обеспечивать концентрацию целевого продукта в культуральной жидкости свыше 10 (предпочтительно - свыше 20) г/л.

Штаммы такого типа обычно являются:

ауксотрофными мутантами, то есть способными к росту только в присутствии в питательных средах специфических ростовых веществ, преимущественно некоторых аминокислот, способность к внутриклеточному синтезу которых была утрачена вследствие мутации (Бекер В.Ф., Бекер М.Е. Лизин микробного синтеза. - Рига, Зинатне, 1974. - С.17), или более приемлемыми

аналог-резистентными ауксотрофными мутантами, синтез L-лизина которыми не ингибируется по мере нарастания его концентрации в культуральной жидкости (Жданова Н.И., Гусятинер М.М. Методы селекции и свойства штаммов микроорганизмов-продуцентов аминокислот // Обзорная информация. - Серия II. Селекция и генетика промышленных микроорганизмов. - М.: ВНИИСЭНТИ, 1985. - С.4 - 17), или наконец, leaky-мутантами (т.е. "ослабленными" мутантами) микроорганизмов, зависимыми от концентрации в питательных средах специфических ростовых веществ, способность к внутриклеточному синтезу которых была лишь понижена, но не утрачена

вследствие мутации (см. в том же обзоре, с.6).

Мутанты указанных типов обычно принадлежат к родам: *Brevibacterium*, *Micrococcus* и *Corynebacterium*.

Другое направление поиска средств снижения издержек на производство L-лизина, очевидно связанное с первым, предусматривает разработку и применение все более совершенных питательных сред, наиболее полно учитывающих потребности указанных штаммов в питательных веществах.

Примером может служить использование белково-витаминного концентрата (БВК, или паприна) в качестве основы питательных сред для культивирования микроорганизмов-продуцентов аминокислот (см., соответственно: 1. Бекер В.Ф., Бекер М.Е. Лизин микробного синтеза. - Рига: Зинатне, 1974. - С.37 - 38; 2. Панкова Т.Д. Применение кислотного гидролизата БВК при производстве лизина // Микробиологическая промышленность. - 1983. - №3. - С.9).

Однако БВК, получаемый микробиологическим синтезом с использованием грибов рода *Candida*, культивируемых на парафинах нефти, в условиях систематического роста цен на энергоносители становится все менее доступным для промышленного микробиологического синтеза аминокислот. Кроме того, БВК опасен как аллерген для промышленного персонала, пожаро- и взрывоопасен при транспортировке и хранении и, наконец, служит источником трудноудаляемых балластных примесей в производстве высокоочищенного кристаллического L-лизина как целевого продукта.

Если же учесть, что синтез БВК сам по себе экологически опасен, то ясно, что совершенствование процессов микробного синтеза L-лизина не может ограничиваться лишь улучшением питательных сред.

Тем не менее, по мере решения проблемы утилизации отходов различных отраслей пищевой (в особенности, мясоперерабатывающей и молочной) промышленности проблема сбалансированного питания штаммов-продуцентов L-лизина решается все более эффективно и экологически рационально.

Примером может служить использование в процессах микробиологического синтеза частичного (по лактозе) гидролизата концентрированной молочной сыворотки как источника конвертируемых в аминокислоты моносахаридов (патент Фракции №2526808).

Соответственно, все большее значение приобретает дальнейшее совершенствование технологии микробиологического синтеза L-лизина как таковой.

В общих чертах эта технология, широко известная специалистам из многочисленных промышленных регламентов, предусматривает: приготовление исходной (стерильной) питательной среды, достаточно сбалансированной по комплексу питательных веществ;

внесение порции такой среды в аппарат ("ферментер") для культивирования микроорганизмов;

посев избранного штамма-продуцента L-лизина;

ферментацию, то есть создание и поддержание условий для роста биомассы

соответствующего штамма и микробиологического синтеза целевого продукта, включая:

- подпитку ферментируемой (растущей) биомассы свежей питательной средой, содержащей:

- ростовые вещества,
- источники углерода, фосфора и неорганического азота,
- аэрацию и перемешивание культуральной жидкости,

- поддержание заданных значений температуры и pH среды;

- прекращение ферментации после достижения максимально возможной концентрации целевого продукта в культуральной жидкости, или после заполнения ферментера культуральной жидкостью до заданного уровня, смотря по тому, что наступит раньше;

- удаление культуральной жидкости из ферментера и повторение процесса.

Полученная культуральная жидкость может быть переработана в различные товарные продукты. В частности, можно либо одним из подходящих известных способов извлечь из нее (и очистить) L-лизин, либо концентрированной (упариванием и-или сушкой) культуральной жидкости преобразовать ее сухой остаток в товарную добавку к комбикормам для сельскохозяйственных животных, птиц и рыб.

Для стадии ферментации лизин-продуцирующих микроорганизмов характерна конкуренция двух направлений потребления питательных веществ. Из них одно внешне выражается преимущественно в приросте биомассы и, в меньшей степени, в синтезе L-лизина, а второе - преимущественно в конверсии моносахаридов (в особенности, глюкозы) в L-лизин и некоторые сопутствующие аминокислоты (глутаминовую кислоту), валин, аланин, изолейцин и др.).

Существенную роль на той же стадии играет и концентрация кислорода, растворенного в культуральной жидкости. Его недостаток приводит к прекращению биосинтеза на продуцирование слабых карбоновых кислот типа молочной, яблочной и некоторых других в ущерб синтезу целевого продукта, поскольку происходит неполное окисление углеводов. Избыток же кислорода стимулирует расход углеводов на дыхание микроорганизмов и, соответственно, активует прирост биомассы и биосинтез сопутствующих аминокислот в ущерб биосинтезу L-лизина (см., например, Руклиша М.П. Физиолого-биохимическая характеристика продуцента лизина *Brevibacterium* sp. 22 в периодическом и непрерывном процессе культивирования. - Рига, 1974. Канд. диссертация).

И, наконец, при ферментации микроорганизмов-продуцентов L-лизина явный недостаток углеводов в свежей питательной среде (и, соответственно, в культуральной жидкости) обуславливает прекращение синтеза лизина сверх необходимого для самообеспечения бактериальных клеток физиологического минимума, а явный избыток углеводов приводит к увеличению их расхода на синтез сопутствующих L-лизину аминокислот. Это снижает производительность процесса в целом и удельный выход целевого продукта (в расчете на

единицу массы потребленных углеводов). Если же концентрация углеводов в культуральной жидкости превышает 15% по массе, то наблюдается общеизвестное специалистам угнетение развития микроорганизмов (см. Куцева Л.С., Ключева Н.М. Прикладная биохимия и микробиология. - 1966. - Т.2. - №6. - С.729).

Однако, по имеющимся данным, в практике промышленного биосинтеза L-лизина указанные факторы до сих пор системно не регулируются.

Из числа известных способов, учитывающих взаимосвязь и взаимовлияние указанных факторов, к предлагаемому по технической сущности наиболее близок способ получения L-лизина микробиологическим синтезом по а.с. СССР №1194020.

Этот способ предусматривает:

- приготовление и подачу в ферментер периодического действия порции стерильной питательной среды;

- посев избранного штамма-продуцента L-лизина;

- ферментацию, включающую:

- дробную (периодическую, дискретную) подпитку ферментируемой биомассы свежей питательной средой, содержащей ростовые вещества и источники углерода (углероды или, что то же самое, сахара)), проводимую по результатам определения интенсивности дыхания по соотношению углекислого газа и остаточного кислорода в отходящих из ферментера газах,

- аэрацию и перемешивание культуральной жидкости,

- поддержание заданных значений температуры и pH среды;

- прекращение ферментации;

- удаление культуральной жидкости из ферментера и

- повторение процесса.

Указанную периодическую подпитку проводили при снижении интенсивности дыхания биомассы до 35 - 65% от максимального значения.

Тем самым при использовании разных штаммов-продуцентов и различных по исходному составу питательных сред удавалось добиться повышения продуктивности биосинтеза преимущественно в аспекте повышения концентрации целевого продукта в культуральной жидкости.

Однако стабилизация процесса одновременно по двум критериям: скорости прироста биомассы и скорости синтеза L-лизина - оказывалась недостижимой. Действительно, несмотря на то, что интенсивность дыхания служит интегральным показателем прироста биомассы и интенсивности биосинтеза целевого продукта, ее искусственное снижение вследствие периодичности введения подпитки, может привести только к снижению средней скорости биосинтеза и удельного выхода L-лизина по отношению к теоретически возможным значениям этих показателей.

В связи с изложенным в основу изобретения положена задача путем изменения порядка и режимов подпитки ферментируемой биомассы свежей питательной средой создать такой способ получения L-лизина, который повышал бы сбалансированность процессов как роста биомассы, так и наработки целевого продукта в культуральной жидкости в течение всего процесса ферментации и, тем самым, обеспечивал бы

ферментер;
посев избранного штамма-продуцента L-лизина;

ферментацию, включающую:

- раздельную подпитку ферментируемой биомассы свежей питательной средой, содержащей (отдельно) ростовые вещества и (отдельно) источники углерода (углеводы), проводимую с соблюдением следующих условий:

- во всех случаях биосинтеза L-лизина контролируют скорость прироста биомассы и скорость синтеза L-лизина и расходы указанных подпиток устанавливают с учетом соотношения указанных скоростей,

- предпочтительно подпитку, содержащую углеводы, подают с расходом, обеспечивающим их концентрацию в культуральной жидкости в интервале 1,2 - 2,8 от упомянутого минимума, а подпитку, содержащую ростовые вещества, подают с учетом результатов контроля напряжения кислорода в культуральной жидкости с таким расходом, чтобы упомянутое напряжение было не менее 12мм рт.ст., а еще более предпочтительно в процессе ферментации в пробах культуральной жидкости периодически определяют отношение массы L-лизина к сухой биомассе штамма-продуцента и расход подпитки, содержащей ростовые вещества, регулируют таким образом, что упомянутое отношение поддерживают в интервале 2,4 - 2,9г/г;

- аэрацию и перемешивание культуральной жидкости,

- поддержание заданных значений температуры и pH среды;

- прекращение ферментации;

- удаление культуральной жидкости из ферментера и

- повторение процесса.

Примеры определения минимально допустимых концентраций углеводов в культуральной жидкости.

Пример 1мк. Определение минимально допустимой концентрации углеводов в культуральной жидкости для штамма *Brevibacterium* sp. ВНИИгенетика-90.

В качестве источника углеводов использовали свекловичную мелассу с содержанием сахаров 46%. Были приготовлены:

а) основная питательная среда следующего состава, г/л:

Меласса	125 (по сырому весу)
Кукурузный экстракт	25 (по сухому весу)
Аммоний хлористый	13
Диаммоний фосфат	1

б) дополнительная питательная среда следующего состава, г/л:

Кукурузный экстракт	25 (по сухому весу)
Аммоний хлористый	13
Диаммоний фосфат	1

В лабораторный ферментер емкость 1л внесли 350мл стерильной основной питательной среды. Стерильным концентрированным раствором аммиака установили pH в пределах 7,0 - 7,2. Температура питательной среды 30°C, расход воздуха на аэрацию 0,5л/мин., избыточное давление воздуха 0,02 МПа, число оборотов мешалки 600 в мин.

После достижения указанных параметров в

питательную среду внесли 30мл посевного материала. Культивирование продолжали до начала фазы стационарного роста, что соответствует в данном примере 14 - му часу (точка Р на кривой 1 прилагаемого чертежа). Еще 2 часа продолжали ферментацию в том же режиме.

На 16 - м часу роста начали вводить в ферментер стерильную дополнительную питательную среду со скоростью 120мл/час. Через 1,5 часа напряжение кислорода в культуральной жидкости резко возросло и за 8 минут увеличилось на 10мм рт.ст. (стрелка вблизи точки В на кривой 1).

В этот момент в пробирку с 3 каплями хлороформа отобрали пробу культуральной жидкости объемом 15мл. Анализ пробы показал остаточную концентрацию сахаров в культуральной жидкости 4г/л как минимально допустимую (критическую) для данного продуцента лизина при использовании мелассы.

Пример 2мк. Определение минимально допустимой концентрации углеводов в культуральной жидкости для штамма *Brevibacterium lactofermentum* НИТИА-88.

Определение проводили, как в примере 1. Анализ пробы показал, что для данного штамма-продуцента лизина критическая концентрация сахаров мелассы в культуральной жидкости равна 5,5г/л.

Пример 3мк. Определение минимально допустимой концентрации углеводов в культуральной жидкости для штамма *Brevibacterium flavum* Е-531.

Определение проводили, как в примере 1. Анализ пробы показал, что для данного штамма-продуцента лизина критическая концентрация сахаров мелассы в культуральной жидкости составляет 6,2г/л.

Примеры биосинтеза L-лизина.

Пример 16с. Биосинтез L-лизина с использованием штамма *Brevibacterium* sp. ВНИИгенетика-90 (1).

Для получения посевного материала использовали стерильную питательную среду следующего состава, г/л:

Меласса	60 (по сырому весу)
Кукурузный экстракт	40 (по сухому весу)
Аммоний хлористый	5
Мел	8

По 50мл указанной питательной среды внесли в колбы Эрленмейера емкостью 750мл и выращивали посевной материал в течение 24 часов при температуре 30°C на качалке при 250об/мин.

Эксперименты по биосинтезу L-лизина предложенным способом проводили в четырех (А, Б, В и Г) лабораторных ферментерах емкостью 1л, оборудованных регулирующими нагревателями со средствами контроля температуры, приспособлениями для аэрации с регулируемым расходом стерильного воздуха, мешалками с регулируемым числом оборотов, насосами-дозаторами для раздельной подачи подпитки (в виде дополнительных питательных сред) и датчиками напряжения кислорода в культуральной жидкости, с использованием следующих стерильных сред:

а) основной питательной среды следующего

состава, г/л:

Кукурузный экстракт	35 (по сухому весу)
Меласса	30 (по сырому весу)
Аммоний хлористый	7,5
Диаммоний фосфат	1,5.

б) первой дополнительной питательной среды (как подпитки-источника ростовых веществ) следующего состава г/л:

Гидролизат БВК	35 (по весу исходного БВК).
Гидролизат кукурузного экстракта	35 (по сухому весу исходного экстракта).

в) второй дополнительной питательной среды (как подпитки-источника углеводов) следующего состава, г/л:

Меласса	650 (по сырому весу)
Аммоний хлористый	40.

г) 25% - го водного раствора аммиака (как средства коррекции pH культуральной жидкости и дополнительного источника азота).

В каждый из ферментеров внесли по 200мл основной питательной среды, включили аэрацию с подачей одного объема воздуха на 1 объем жидкости в минуту и мешалку на 600об/мин, довели pH указанным водным раствором аммиака до 7,0 - 7,2, установили температуру на уровне 30 - 31град. С, внесли по 20мл посевного материала, содержащего указанный штамм-продуцент, и насосами-дозаторами начали подавать первую (с начальным расходом 4мл/ч) и вторую (с начальным расходом 0,5мл/ч) дополнительные (подпиточные) питательные среды.

Затем с учетом показаний датчика напряжения (парциального давления) кислорода в культуральной жидкости подачу второй дополнительной питательной среды регулировали таким образом, чтобы указанное давление в период пуска поддерживалось около (но не ниже) 12мм рт.ст. во всех четырех ферментерах, а далее - со следующими вариациями:

в ферментере А - с условием, чтобы концентрация сахаров в культуральной жидкости находилась в пределах от 1,2 до 2,8 от минимально допустимой;

в ферментере Б - в пределах от 0,8 до 1,2;

в ферментере В - в пределах от 2,8 до 3,5;

в ферментере Г - в пределах от 3,5 до 4,5.

Процессы прекращали после заполнения ферментеров культуральной жидкостью до уровня 700мл и фиксировали время, за которое этот уровень был достигнут.

Для контроля в аналогичном ферментере Д, оборудованном лишь одним насосом-дозатором, с использованием того же штамма-продуцента проводили биосинтез L-лизина по способу-прототипу.

В этом контроле применяли две питательные среды:

а) основную, содержащую, в г/л:

Меласса	250 (по сырому весу)
Гидролизат БВК	7 (по весу исходного БВК)
Кукурузный экстракт	18 (по сухому ве- су)
Аммоний хлористый	19
Диаммоний фосфат	2

б) дополнительную (подпиточную), содержащую, г/л:

Меласса	650 (по сырому весу)
Гидролизат БВК	4 (по весу исходного БВК)
Кукурузный экстракт	9 (по сухому весу)
Аммоний хлористый	40

В ферментер Д внесли 400мл основной питательной среды, включили аэрацию с подачей одного объема воздуха на 1 объем жидкости в минуту и мешалку на 600об/мин, довели pH указанным водным раствором аммиака до 7,0 - 7,2, установили температуру на уровне 30 - 31град. С и избыточное давление 0,02 - 0,03МПа и внесли 40мл посевного материала, содержащего указанный штамм-продуцент.

После запуска процесса в культуральной жидкости периодически (не реже одного раза за 4 часа) контролировали концентрацию сахаров и при ее падении до 1,0 - 1,5%, что соответствовало снижению интенсивности дыхания биомассы до 35 - 65% от максимального значения, периодически же (через каждый час) подавали указанную подпиточную среду с расходом 8 - 2мл за каждый впрыск, продолжавшийся 1 - 2 минуты, с таким расчетом, чтобы указанная концентрация возрастала до 1,5 - 2,0%.

После достижения объема культуральной жидкости 700мл подпитку прекращали и, контролируя концентрацию сахаров и фиксируя длительность процесса, продолжали ферментацию до момента, когда указанная концентрация снижалась до 0,6%.

В культуральных жидкостях во всех ферментерах общеизвестным методом определили концентрацию L-лизина в г/л и тривиальными вычислениями установили выход L-лизина (в %) в расчете на единицу массы потребленных при ферментации углеводов (сахаров).

Сравнительные результаты приведены в таблице.

Как видно из таблицы, предложенный способ при соблюдении условий раздельной подпитки и балансировки расходов подпиточных сред с учетом скоростей прироста биомассы и синтеза целевого продукта (ферментер А) обеспечивает наилучшие результаты биосинтеза L-лизина, а при раздельной подпитке (ферментеры В и Г) обеспечивает повышение концентрации L-лизина в культуральной жидкости и повышение производительности биосинтеза.

Пример 26с. Биосинтез L-лизина с использованием штамма *Brevibacterium* sp. ВНИИгенетика-90 (2).

Посевной материал нарабатывали и биосинтез целевого продукта проводили, как описано в (15с) для ферментера А, с теми отличиями, что:

- на 20 - м часу ферментирования и далее через каждые 4 часа определяли соотношение

массы лизина и сухой биомассы штамма-продуцента в культуральной жидкости и,

- регулируя расход второй дополнительной питательной среды, удерживали это соотношение в пределах 2,4 - 2,9 г/г.

Длительность ферментации до наработки 700мл культуральной жидкости составила 50ч, концентрация L-лизина в культуральной жидкости - 75г/л, а выход L-лизина от массы потребленных углеводов составил 50%.

Пример 36с. Биосинтез L-лизина с использованием штамма *Brevibacterium lactofermentum* НИТИА-88.

Биосинтез целевого продукта проводили, как описано в (26с), учитывая, что минимально допустимая концентрация углеводов в культуральной жидкости для указанного штамма равна 5,5г/л.

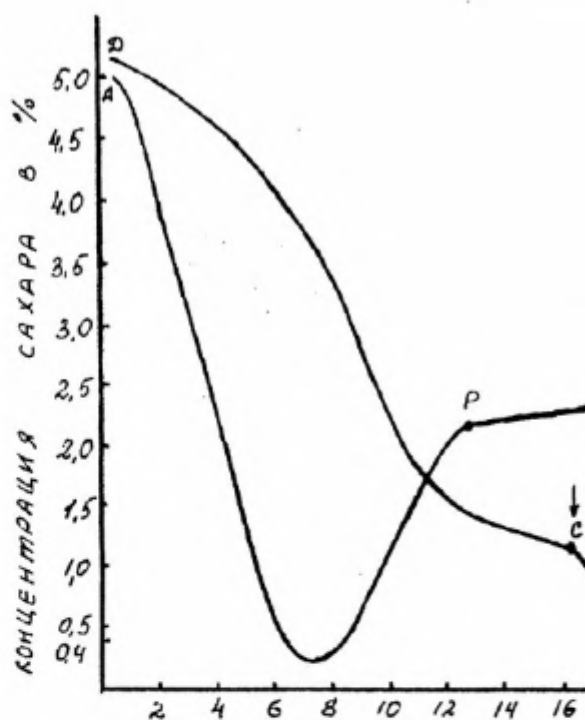
Длительность ферментации до наработки 700мл культуральной жидкости составила 56ч, концентрация L-лизина в культуральной жидкости 72г/л, а выход L-лизина от массы потребленных углеводов составил 45%.

Пример 46с. Биосинтез L-лизина с использованием штамма *Brevibacterium flavum* E-531.

Биосинтез целевого продукта проводили, как описано в (26с), учитывая, что минимально допустимая концентрация углеводов в культуральной жидкости для указанного штамма равна 6,2г/л.

Длительность ферментации до наработки 700мл культуральной жидкости составила 54ч, концентрация L-лизина в культуральной жидкости 60г/л, а выход L-лизина от массы потребленных углеводов составил 45%.

Приведенные примеры биосинтеза L-лизина с использованием разных штаммов-продуцентов подтверждают промышленную применимость предложенного способа.



Фиг.

Таблица

Контролируемые показатели и единицы измерения	Ферментеры				
	А	Б	В	Г	Д
Концентрация L-лизина в культуральной жидкости, г/л	75	36	70	68	60
Выход L-лизина от массы углеводов, %	46	22	38	34	37
Конечный объем культуральной жидкости, мл	700	700	700	700	700
Длительность ферментации, ч	53	72	58	60	72



УКРАЇНА

(19) UA (11) 39807 (13) A

(51) 7 C12P13/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ L-ЛІЗИНУ

(21) 99021112

(22) 25.02.1999

(24) 15.06.2001

(33) UA

(46) 15.06.2001, Бюл. № 5, 2001 р.

(72) Лужков Олександр Михайлович, Краєва Наталя Кирилівна, Василенко Наталія Іллівна, Руських Анна Миколаївна, Роговер Валерій Семенович, Соболенко Олександр Петрович, Мотузюк Людмила Володимирівна, Мариночкіна Лариса Іванівна

(73) Відкрите акціонерне товариство "Трипільський біохімічний завод"

(57) 1. Спосіб одержання L-лізину, що передбачає вирощування продукуючих його мікроорганізмів в умовах аерації в поживному середовищі, яке містить джерела вуглецевого, азотного живлення, мінеральні солі і ростові фактори, а також подачу в процесі ферментації поживного середовища в залежності від інтенсивності споживання поживних речовин і дихальної активності та відливи культуральної рідини при заповненні ферментатора на 60-90% з подальшим продовженням підживного режиму та після закінчення процесу ферментації концентрування, висушування або очищення цільового продукту, який відрізняється тим, що подача поживного середовища здійснюється двома потоками, один з яких містить всі необхідні речовини для синтезу L-лізину (джерела вуглецевого, азотного живлення, ростові речовини), а другий - тільки ростові речовини, при цьому поживне середовище одного потоку збалансоване таким чином, що забезпечує одночасно ріст продуценту і синтез цільового продукту, а другий потік корегує швидкість росту продуценту, відповідно до збільшення об'єму культуральної рідини та забезпечує максимальну швидкість синтезу L-лізину.

2. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що швидкість подачі поживного середовища обох потоків регулюється таким чином, щоб забезпечити співвідношення вуглецевого компонента та ростового фактору, наприклад сахарів до амінокислоти (L-лейцину) в межах 125 - 275.

3. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що після відливу культуральної рідини швидкість подачі поживного середовища з вуглецевим джерелом збільшують в 2-5 разів, а підживного середовища з ростовим фактором - збільшують таким чином, щоб швидкість подачі амінокислоти (L-лейцину) сумарно з двох потоків збільшилась в 2-12 разів протягом 1-4 годин.

4. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що як продуцент L-лізину використовують штам *Brevibacterium sp.90 H* аналогорезистентний, який є аукоотрофом по L-лейцину та лейкі-L-гомосерину.

5. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що як джерело вуглецевого живлення використовують бурякову меласу, а з культуральної рідини після концентрування та змішування з наповнювачем одержують кормовий препарат "Ліпрот", що містить L-лізин і збагачений бетаїном.

Винахід належить до мікробіологічної промисловості і стосується одержання незамінної амінокислоти L-лізину, яка може бути використана в сільському господарстві як кормова добавка в раціони домашніх тварин і птиці.

Метою винаходу є зниження вартості способу за рахунок збільшення виходу продукту з одиниці обладнання на стадії біосинтезу, а також покращення кормових властивостей готового продукту.

Винахід має такий зміст.

Під час одержання L-лізину, з використанням глибинної культивування продуцентів при аерації на поживному середовищі з джерелами вуглецю, азоту, мінеральних солей та ростових речовин, для підтримання біомаси продукуючих мікроорганізмів в активному стані в культуральну рідину додають

свіже поживне середовище таким чином, щоб співвідношення між джерелом вуглеводного живлення та ростовими речовинами відповідало оптимальному фізіологічному стану продуценту та забезпечувало максимальну швидкість синтезу кінцевого продукту. При цьому для збільшення виходу продукту з одиниці обладнання при накопиченні культуральної рідини в ферментаторі проводять одно- чи багаторазові відливи культуральної рідини, не перестаючи подавати підживку та після кожного відливу міняється швидкість і співвідношення джерел живлення, що додаються.

Відомі способи одержання L-лізину мікробіологічним синтезом передбачають приготування стерильного поживного середовища посів культури продуценту та здійснення процесу біосинтезу з

(19) UA (11) 39807 (13) A

додатковою подачею поживних речовин, наприклад м'яся або комплексного вуглеводного джерела (редуючих речовин + органічні кислоти чи спирти (див.: А.с. СРСР 498940, 1381991) та стимуляторів росту (див.: А.с. СРСР 494040). Подача поживних речовин відбувається з швидкістю, яка забезпечує визначену концентрацію речовин в поживному середовищі, що подаються, чи за показником дихальної активності культури або вмісту залишкового кисню в культуральній рідині (див.: А.с. СРСР 1194020).

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб, що передбачає подачу свіжого поживного середовища до досягнення об'єму 0,6-0,9 від об'єму ферментатору з припиненням його подачі до моменту зниження інтенсивності дихання на 30-60% від рівня, при якому припиняють підживку з наступним відливом культуральної рідини з її верхньої частини до досягнення об'єму 0,4-0,65 від об'єму ферментатору та відновленням підживки в кількості, що забезпечує інтенсивність дихання на рівні до припинення подачі підживки (див.: А.с. СРСР 1460999).

Треба визнати такі недоліки цього способу: припинення подачі підживки та наступний відлив культуральної рідини створюють несприятливі умови для життєдіяльності культури продуцента, внаслідок чого треба час (непродуктивний) для активізації культури; підживка, що подається має всі компоненти поживного середовища та однаковий склад на протязі всього процесу, тому після відливу культура не досягне максимально можливої продуктивності внаслідок неоптимального (розбалансу) співвідношення компонентів поживного середовища для кожного періоду росту; регулювання швидкості подачі підживки в визначеному інтервалі залежно від дихальної активності культури, не дає об'єктивної оцінки потенційних можливостей культури продуцента в швидкості росту та синтезу продукту, внаслідок чого відбувається уповільнення процесу чи не ефективне використання вуглеводної сировини.

Таким чином, під час здійснення цього способу в умовах багатотоннажного виробництва рівень накопичення L-лізину досягне не більше 60 г/л і продуктивність ферментатору 11-13 кг/м³·добу.

Спосіб, що пропонується, усуває вище зазначені недоліки і створює умови для підвищення продуктивності продуцента, дає можливість досягнути рівня накопичення L-лізину в багатотоннажному виробництві до 90-120 г/л, збільшити продуктивність ферментаційного обладнання на 20-70%.

Спосіб має такий зміст.

В процесі глибинної культивування продуцентів L-лізину, переважно роду *Brevibacterium*, на поживному середовищі з джерелами вуглецю, азоту, мінеральних солей та ростових речовин подачу свіжого поживного середовища здійснюють двома потоками, один з яких має всі необхідні речовини для росту продуцента та синтезу продукту, а інший - тільки ростові речовини. Таким чином, потік поживного середовища з комплексом поживних речовин (джерела вуглецю, мінеральний азот, ростові речовини), збалансований так, що забезпечує швидкість росту продуцента, яка не лімітується киснем (тобто у відповідності з масообмінними характеристиками ферментатора).

Другий потік, що складається тільки з ростових факторів, застосовують для корегування швидкості росту продуцента під час процесу біосинтезу L-лізину, коли об'єм культуральної рідини незначний та масообмінні характеристики ферментатора максимальні, а також для активізації культури продуцента після відливу культуральної рідини, що здійснюють коли об'єм в ферментаторі буде не менше 60% та зменшиться швидкість біосинтезу. Подачу підживного середовища, що включає ростові фактори починають при споживанні одного з головних факторів росту, наприклад L-лейцину не менш як на 40% від початкової концентрації. Швидкість подачі вибирають залежно від бажаної швидкості росту культури продуцента, тобто оптимальної для цих умов в межах 0,01-0,03 г/л·год. Подачу комплексного поживного середовища починають коли концентрація редуючих речовин в культуральній рідині зменшиться до 5-20 г/л з швидкістю 3-7,5 г/л·год, при цьому поступає частково ростовий фактор, що містить L-лейцин, і це дає змогу підтримувати співвідношення концентрацій головних компонентів поживного середовища (редуючих речовин до L-лейцину) в межах 125-275.

Коли об'єм в ферментаторі буде не меншим 60% здійснюють відлив культуральної рідини в кількості від 10% до 50% від об'єму культуральної рідини не припиняючи подачі підживки. Після закінчення відливу збільшують швидкість подачі підживного середовища, що містить ростові речовини та комплексного підживного середовища таким чином, щоб швидкість подачі вуглеводного компоненту (редуючих речовин) збільшилась в 2-5 разів, а швидкість подачі ростових факторів в розрахунку на вміст L-лейцину (в сумі з двома потоками) збільшилась в 2-12 разів. Тривалість періоду подачі підживних середовищ з збільшеною швидкістю змінюється в межах від 1 до 4 годин залежно від об'єму культуральної рідини, що залишилась, та умов масообміну.

Протягом процесу біосинтезу здійснюють від 1 до 4 відливів культуральної рідини, збільшуючи об'єм культуральної рідини з одного ферментатора на 40-60%. Рівень накопичення L-лізину в першому відливі не менше 70 г/л, в кінцевому зливі - не менше 85 г/л.

Управління швидкостями потоків підживних середовищ в вище зазначених межах здійснюють, враховуючи концентрацію вуглеводів в культуральній рідині на рівні 5-15 г/л та концентрацію вуглекислого газу в відпрацьованому повітрі в межах 1-2,6%, що дає можливість мати оперативну інформацію про швидкість споживання вуглеводів.

Культуральну рідину, що одержують в результаті ферментації, переробляють одним з відомих способів для одержання кінцевого продукту - кормового концентрату або кристалічного L-лізину.

Склад підживних середовищ підбирається таким чином, щоб забезпечити регулювання швидкості подачі двох потоків, враховуючи оптимальне співвідношення між вуглецевим та ростовим компонентами.

Вуглецевий компонент (сахароза, глюкоза) визначається за редуючими речовинами, а ростовий - за амінокислотою L-лейцином. Оптимальні границі цього співвідношення визначені експериментально за максимальною питомою швидкістю

синтезу L-лізину Y_p (год^{-1}), під час біосинтезу в 100 м^3 ферментаторах і наведені в табл. 1.

Для забезпечення високої продуктивності об'єднання питома швидкість синтезу L-лізину повинна бути не меншою $0,05 \text{ год}^{-1}$, отже оптимальне співвідношення редуруючих речовин до L-лейцину повинно бути в межах 125-275.

Межу кратності збільшення швидкості подачі вуглецевого живлення (редуючих речовин - р.р.) після відливу визначили експериментально за економічним коефіцієнтом процесу біосинтезу L-лізину в 100 м^3 ферментаторах і представили в табл. 2.

Найбільш економічно використання р.р. для синтезу L-лізину відбувається при збільшенні швидкості подачі р.р. після відливу в 2-5 разів, подальше підвищення швидкості дасть різке збільшення витрат вуглецевого компоненту для підтримки та синтезу біомаси.

Для вибору оптимальної межі збільшення швидкості подачі підживного середовища, що містить L-лейцин, визначили питому швидкість синтезу L-лізину та росту біомаси при різній швидкості подачі L-лейцину після відливу (сумарно за двома потоками) в процесі біосинтезу L-лізину в 100 м^3 ферментаторі (табл. 3).

В зв'язку з тим, що головною метою подачі підживного середовища, що містить L-лейцин, є підвищення швидкості росту при збереженні високої продуктивності, то після відливу Y_x не повинна бути нижче $0,02 \text{ год}^{-1}$. Таким чином, оптимальна кратність збільшення подачі L-лейцину після відливу, що забезпечує ці показники, складає 2-12 разів.

Для оцінки ефективності способу, що пропонується, як прототип використали дані а.с. № 1460999 та результати промислових випробувань. Дані наведені в табл. 4.

Штам продуцент L-лізину *Brevibacterium* sp 90 (реєстраційний номер ВКПМ В-5593) аналогорезистентний аутотроф за L-лейцином з зниженою потребою для росту в цьому факторі, для росту на мінімальному середовищі потребує біотину та тіаміну, досягає в виробничих умовах на середовищах з м'ясою рівня накопичення L-лізину 70-85 г/л, конверсії 35-37%. Особливістю цього штаму є уповільнений ріст та незначна швидкість біосинтезу L-лізину. З метою одержання нового штаму більш продуктивного була проведена селекція. Під дією мутагену нітрозоганідину з штаму *Brevibacterium* sp 90, шляхом багатоступеневої селекції було одержано штам *Brevibacterium* sp 90 Н з підвищеною швидкістю росту та синтезу L-лізину порівняно з вихідним штамом.

На поживному середовищі з м'ясою новий штам дає можливість одержувати за 72 години 100 г/л L-лізину, на середовищі з глюкозою – 120 г/л за 85 годин при коефіцієнті конверсії 42-48%.

На першому етапі селекції одержані мутанти стійкі до структурного аналогу L-лізину 8-(2-аміноетил)-цистеїну та їх колонії на мінімальному середовищі з L-лейцином та гомосерином відрізняються більшим розміром порівняно з колоніями вихідного штаму.

Шляхом багатоступеневого відбору на поживних середовищах з м'ясою і білковою сирови-

ною, що містять L-лейцин в різних концентраціях, одержано штам *Brevibacterium* sp 90 Н, який перевищує вихідний за швидкістю росту біомаси та продуктивністю. Під час культивування в колбах на качалці рівень накопичення L-лізину досягає 68 г/л за 68 годин. Штам має підвищену потребу в L-лейцині порівняно з вихідним штамом та в присутності мінімальної кількості гомосерину збільшує швидкість росту та синтезу цільового продукту.

Новий штам *Brevibacterium* sp 90 Н має такі культурально-морфологічні та біохімічні ознаки.

Культурально-морфологічні ознаки

Клітини овальні, розміри 1,0-1,5 мкм та 0,6-0,8 мкм, нерухомі, грампозитивні, спор не утворюють. Через 2-3 доби росту при 30°C на МПА утворюють колонії 2-4 мм жовтого кольору, поверхня гладенька, форма вишукана, край рівний, структура однорідна тістоподібна. Коли посіяти штрихом, то через дві доби ріст хороший, край рівний, поверхня матова. Коли посіяти уколком, ріст в глибині агару слабкий, на поверхні помірний. Через 2-3 доби росту при 30°C на глюкозо-мінеральному середовищі Гловера, що містить L-лейцин, гомосерин, колонії 2-3 мм, край рівний, структура однорідна, консистенція тістоподібна, поверхня гладенька, колір колоній жовтий. Ріст штриха на цьому середовищі через 2 доби хороший.

Фізіолого-біохімічні ознаки

Аероб. Желатину не розрізжує. Добре росте на глюкозі, сахарозі, мальтозі, фруктозі, манозі, етанолі, оцтовій кислоті. Не росте на ксилізі, арабінозі, лактозі, рафінозі. Засвоює азот в формі солей амонію та сечовини. Не засвоює нітратний азот. Росте при температурі 24-42°C. Оптимальна температура 32°C. Росте на середовищах з рН від 6 до 8,5. Оптимальне значення рН 6,8-7,2. Для росту на мінімальному середовищі потребує L-лейцин, лейкі-L-гомосерин. Стійкий до бактеріофагів, що лізують штам - прототип *Brevibacterium* sp 90. Стійкий до аналогу L-лізину 8-(2-аміноетил)-цистеїну. Штам зберігається при температурі 4°C на косяках з агаром Хоттінгера протягом 6 місяців чи в піофілії висушених ампулах на протязі року. Спосіб іліструється такими прикладами.

Приклад 1

Як продуцент використовують культуру *Brevibacterium* sp 90 Н. Подівний матеріал вирощують в качалочних колбах об'ємом 750 мл з поживним середовищем об'ємом 50 мл такого складу, %: м'яса - 5, кукурудзяний екстракт - 4, культуральна рідина L-лейцину - 0,2 г/л (за вмістом L-лейцину), крейда - 1. Перед посівом рН середовища доводять до 7-7,2. Через 20 годин культивування при температурі 32°C посівний матеріал в кількості 10% подають в ферментатор об'ємом 10 л з поживним середовищем об'ємом 4,5 л такого складу, %: м'яса - 14, гідролізат кормових дріжджів - 5,5, кукурудзяний екстракт - 2, NH_4Cl - 1, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - 0,1, культуральна рідина L-лейцину - 0,2 г/л (за вмістом L-лейцину), декстробіотин - 250 мкг/л, тіамін - 250 мкг/л. Біосинтез L-лізину ведуть при аерації стерильним повітрям і перемішуванні з швидкістю 500 об./хв, що забезпечує масообмін 5 г O_2 /л/год (по сульфитному числу). рН середовища підтримують на рівні 6,8-7,2 аміачною водою. Процес ведуть при температурі 32°C. Як піногасник використовують пропінол Б-400. З 6 годин росту, коли

біомаса досягне рівня 6 г/л починають подавати підживне середовище (1) такого складу, %: кукурудзяний екстракт - 40, культуральна рідина L-лейцину - 40. Вміст L-лейцину складає 10 г/л. Швидкість подачі в перерахунок на L-лейцин - 0,01 г/л-год.

При зменшенні в поживному середовищі р.р. до 5 г/л починають подавати підживне середовище (2) такого складу, %: меляса - 54, гідролізат кормових дріжджів - 2,5, кукурудзяний екстракт - 1, NH_4Cl - 4, культуральна рідина L-лейцину - 0,15 г/л (за вмістом L-лейцину), дестіобіотин - 250 мкг/л, тіамін - 250 мкг/л, з швидкістю в перерахунок на р.р. 5,5 г/л-год. При цьому швидкість подачі L-лейцину сумарно за двома потоками складає 0,028 г/л-год, а співвідношення р.р. до L-лейцину - 196. При збільшенні об'єму культуральної рідини до 7,5 л на 39 годин росту здійснюють відлив 2 л з вмістом L-лізину 70 г/л.

Після відливу збільшують подачу підживного середовища (2) в розрахунок на р.р. до 11 г/л протягом години, а середовища (1) до 0,06 г/л L-лейцину протягом години (за сумарним вмістом двох потоків). Потім швидкість подачі підживних середовищ зменшують до 4,7 г/л-год по р.р. і 0,019 г/л-год по L-лейцину. На 50 годині росту роблять відлив культуральної рідини в об'ємі 2 л з вмістом L-лізину - 80 г/л і збільшують подачу середовищ (1) та (2) вдвічі протягом 1,5 год, потім зменшують подачу середовища (2) до 4,2 г/л-год по р.р., а середовища (1) - до 0,016 г/л-год по сумарному L-лейцину. На 59 годині росту роблять відлив культуральної рідини в об'ємі 1,2 л з вмістом L-лізину 87 г/л. Далі процес ведуть, як згадано вище, і через 8 год роблять відлив культуральної рідини в об'ємі 1,2 л з вмістом L-лізину 93 г/л і на 72 години росту процес закінчують, вміст L-лізину в культуральній рідині 102 г/л. Загальна кількість синтезованого L-лізину 1005 г, об'єм культуральної рідини 11,2 л, коефіцієнт конверсії 48%.

Приклад 2

Посівний матеріал штаму *Brevibacterium* sp 90 Н вирощують, як зазначено в прикладі 1. Ферментаційне середовище має такий склад, %: глюкоза - 8, гідролізат соєвого шроту - 6, кукурудзяний екстракт - 2, культуральна рідина L-лейцину - 0,3 г/л (в перерахунок на L-лейцин) MgSO_4 - 0,025; K_2HPO_4 - 0,225; KH_2PO_4 - 0,075, дестіобіотин - 250 мкг/л, тіамін - 250 мкг/л. Ферментацію ведуть в 20 л ферментаторі з аерацією та перемішуванням культуральної рідини, що відповідають сульфатному числу 6-7 г O_2 /л-год. Початковий об'єм поживного середовища 7,5 л. Умови культивування, як в прикладі 1. Підживне середовище (1), що містить ростовий фактор такий же, як в прикладі 1, підживне середовище (2) такого складу, %: глюкоза - 45, гідролізат соєвого шроту - 6,5, кукурудзяний екстракт - 2, культуральна рідина L-лейцину - 0,25 г/л (в перерахунок на L-лейцин), вітаміни в такій самій кількості, як в початковому середовищі. Подачу обох підживок починають при рівні накопичення біомаси 20 г/л на 12 годині культивування, при цьому р.р. подають з швидкістю 3-3,5 г/л-год, а L-лейцин - 0,014 г/л-год, тобто забезпечують співвідношення 210-250. На 46 год культивування роблять відлив культуральної рідини, що містить 74 г/л L-лізину в об'ємі 1,7 л. Після відливу збільшують швидкість

подачі підживного середовища (2) в 3 рази в перерахунок на р.р., а середовища (1) в перерахунок на сумарний L-лейцин в 3 рази протягом 4 год. Потім зменшують швидкість подачі підживних середовищ відповідно до 4-6 г/л-год по р.р. і 0,022 г/л-год по L-лейцину. Кожні наступні 8-10 годин роблять відлив культуральної рідини по 1,2-1,5 л з наступним збільшенням подачі підживних середовищ в 2,5-3 рази протягом 1,5-2,0 годин. Через 85 годин від початку процесу одержують 11,5 л культуральної рідини з вмістом L-лізину 120 г/л. Загальний об'єм одержаної культуральної рідини 17 л або 1864 г L-лізину, коефіцієнт конверсії сахарів - 41%.

Приклад 3

Посівний матеріал штаму *Brevibacterium* sp 90 Н вирощують на поживному середовищі, як зазначено в прикладі 1, але в об'ємі 5 м³ в 10 м³ ферментаторі. Ферментаційне середовище в кількості 37 м³ завантажують в 100 м³ ферментатор, обладнаний мішалкою, автоматичними системами регулювання температури, pH середовища, піногасіння та аналізатором вуглекислого газу в відпрацьованому повітрі. Поживне середовище має такий склад, %: меляса - 24, гідролізат кормових дріжджів - 3, кукурудзяний екстракт - 5, NH_4Cl - 0,8, $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ - 0,1, культуральна рідина L-лейцину - 0,15 г/л (за вмістом L-лейцину). В стерильне поживне середовище подають посівний матеріал в кількості 5 м³ і далі процес ферментації ведуть при температурі 32°C, pH 6,8-7,2, витрати повітря 1-1,2 об'єму на об'єм середовища та перемішуванні з швидкістю 120 об./хв. З 20-ї години росту при рівні біомаси 24 г/л та вмісті р.р. 9 г/л додають підживне середовище двома потоками такого складу, %: 1-й потік - кукурудзяний екстракт - 30, культуральна рідина L-лейцину - 30; 2-й потік - меляса - 54, гідролізат кормових дріжджів - 1,6, кукурудзяний екстракт - 2,5, культуральна рідина L-лейцину - 0,15 г/л (в перерахунок на L-лейцин), NH_4Cl - 3,7 (вміст L-лейцину - 1,1 г/л). Подачу підживного середовища другого потоку здійснюють з швидкістю 0,6-0,8 м³/год, і таким чином забезпечують подачу р.р. з швидкістю 4 г/л-год. Подачу підживного середовища першого потоку здійснюють з швидкістю 20-60 літрів і таким чином забезпечують подачу L-лейцину з двома потоками зі швидкістю 0,015-0,02 г/л-год та співвідношення р.р. до L-лейцину 200-256. Регулюють швидкість подачі підживного середовища в зазначених межах за показником вмісту вуглекислого газу в відпрацьованому повітрі в межах 1-2,6%. Коли об'єм культуральної рідини в ферментаторі буде 62 м³, а вміст L-лізину 75 г/л, на 57-й годині росту здійснюють відлив 15 м³, далі швидкість подачі поживного середовища 1-го потоку збільшують в 3 рази, а 2-го - в 2,5 рази протягом 1 години і потім відновлюють попередній режим до наступного відливу. Через 16 годин після 1-го відливу здійснюють 2-й відлив об'ємом 15 м³ з вмістом L-лізину 81 г/л. Подальше управління підживним середовищем здійснюють так, як після 1-го відливу.

Процес закінчують на 105-й годині росту з об'ємом культуральної рідини 64 м³ та вмістом L-лізину 97 г/л. За весь процес одержують 94 м³ культуральної рідини з 8,5 т L-лізину. Коефіцієнт конверсії вуглеводів меляси в L-лізін - 38%. З одержаної культуральної рідини відділяють біома-

су і з допомогою іонного обміну одержують кристалічний L-лізін одним з відомих способів.

Приклад 4

Процес ведуть, як зазначено в прикладі 3, але з продуцентом *Brevibacterium* sp 90, а поживні середовища містять в 1,5 раза менше ростових речовин. Процес закінчують на 120 годині росту з вмістом L-лізину в культуральній рідині 85 г/л. Загальний вихід L-лізину 7,7 т в 93 м³ культуральної рідини. Культуральну рідину випарюють під вакуумом, змішують з наповнювачем (висівками) та висушують. Одержаний кормовий препарат "ЛІПРОТ" містить, крім L-лізину, інші амінокислоти, білок, мікроелементи та вітаміни.

При використанні як вуглеводного джерела бурякової меляси в культуральній рідині накопичу-

ється бетаїн - речовина, що містить азот, не завоюється продуцентами L-лізину і повністю зберігається в готовому кормовому препараті "ЛІПРОТ". Бетаїн відіграє важливу роль як компонент живлення сільськогосподарських тварин і птиці. Бетаїн є джерелом лабільних металічних груп і може забезпечити ендогенне утворення холіну. Так, в комбікормах для птиці бетаїн враховується разом з холіном (див.: Ємеліна Н.Т. та ін. Вітаміни в годівлі сільськогосподарських тварин і птиці. - М.: Колос, 1970. - 312 с.). В мелясі вміст бетаїну змінюється в межах від 6% до 13%. В способі одержання L-лізину, що пропонується, меляси додається в культуральну рідину на 10-15% більше, ніж в прототипі. Таким чином, кормовий препарат "ЛІПРОТ" містить від 7,5% до 14% бетаїну.

Таблиця 1

Співвідношення редуруючих речовин до L-лейцину	100	125	150	175	200	250	275	300
Питома швидкість синтезу Y_p (год ⁻¹)	0,025	0,05	0,06	0,085	0,09	0,095	0,08	0,035

Таблиця 2

Швидкість подачі підживного середовища з вуглецевим компонентом в розрахунку на р.р.
Vc г/л-год до відливу - 3,5 (середнє)

Vc після відливу	8	10	12	14	16	1 ^А	20
Кратність збільшення Vc	2,3	2,9	3,4	4	4,6	5,1	5,7
Економічний коефіцієнт після відливу, Vc, год ⁻¹	3,6	3,3	3	2,7	3	3,6	5,5

Таблиця 3

Швидкість подачі L-лейцину до відливу Y_{lei} , г/л-год (0,015±0,005)

Y_{lei} після відливу	0,04	0,06	0,08	0,09	0,1	0,11	0,012	0,013	0,014
Кратність збільшення Y_{lei}	2-4	3-6	4-8	4,5-9	5-10	5,5-11	6-12	6,5-13	7-14
Після відливу Y_p , год ⁻¹	0,05	0,06	0,06	0,08	0,085	0,085	0,08	0,08	0,06
Питома швидкість росту біомаси Y_x , год ⁻¹	0,02	0,026	0,038	0,038	0,04	0,032	0,027	0,018	0,01

Таблиця 4

Порівняльні показники біосинтезу L-лізину на поживних середовищах з мелясою за способом, що пропонується, та прототипом

1. Біосинтез в лабораторному ферментаторі об'ємом 10 л

Спосіб	Кількість відливів	Кількість підживки, л	Співвідношення ред. речовин до ростових факторів		Швидкість подачі поживних речовин, г/л-год			
			під час процесу	після відливу	ред. речовини		рост. фактори	
					під час процесу	після відливу	під час процесу	після відливу
Прототип	4	12	714	714	9,3	12,5	0,013	0,018
Спосіб, що пропонується	4	5,2	256	160	5,3	8	0,02	0,05

Продовження табл. 4

Спосіб	Накопичення L-лізину, г/л	Вихід L-лізину з операції, г	Продуктивність, г/л-добу	Витрата меляси г/г L-лізину
Прототип	49	847	24,2	5,7
Спосіб, що пропонується	102	1005	25,5	4,8

Продовження табл. 4

2. Біосинтез в 100 м³ ферментаторі

Спосіб	№ п/п	Кількість відливів	Кількість підживки, м ³	Співвідношення ред. речовин до ростових факторів		Швидкість подачі поживних речовин, кг/м ³ -год			
				під час процесу	після відливу	ред. речовини		рост. фактор	
						під час процесу	після відливу	під час процесу	після відливу
Прототип	1	1	46	850	850	4,5	4,5	0,01	0,01
	2	2	73	660	660	5,0	5,0	0,01	0,01
	3	3	92	460	460	6,2	6,2	0,015	0,015
Спосіб, що пропонується	4	1	48	240	200	3,2	16,0	0,013	0,08
	5	2	55	200	160	3,0	9,6	0,015	0,06
	6	2	57	175	125	3,0	15,0	0,017	0,12
	7	3	67	220	160	3,4	15,4	0,015	0,096

Продовження табл. 4

Спосіб	№ п/п	Накопичення L-лізину, кг/м ³	Вихід L-лізину з операції, кг	Продуктивність, кг/м ³ -добу	Витрата меляси кг/кг L-лізину
Прототип	1	45,1	4490	10,8	8,3
	2	45,2	5560	12,6	8,7
	3	47,0	6436	13,4	8,2
Спосіб, що пропонується	4	88,6	7358	15,0	5,8
	5	88,0	8796	16,0	5,6
	6	9838	8941	14,0	6,2
	7	85,0	7442	13,6	6,4

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 549 690** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013144955/10, 08.10.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.10.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.10.2013

(45) Опубликовано: 27.04.2015 Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 8361758 B2, 29.01.2013. US 4623623
A1, 18.11.1986. RU 2000117837 A, 27.12.2002

Адрес для переписки:

117545, Москва, 1-ый Дорожный пр-д, 1, ФГУП
"ГосНИИгенетика"

(72) Автор(ы):

Рябченко Людмила Евгеньевна (RU),
Акипина Раиса Илларионовна (RU),
Барсуков Евгений Дмитриевич (RU),
Герасимова Татьяна Васильевна (RU),
Глазунов Александр Викторович (RU),
Губанова Татьяна Александровна (RU),
Демина Наталья Георгиевна (RU),
Иванкова Татьяна Алексеевна (RU),
Леонова Татьяна Евгеньевна (RU),
Раевская Наталья Михайловна (RU),
Румянцева Надежда Фридриховна (RU),
Тарутина Марина Геннадьевна (RU),
Яненко Александр Степанович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное унитарное
предприятие "Государственный научно-
исследовательский институт генетики и
селекции промышленных микроорганизмов"
(ФГУП "ГосНИИгенетика") (RU)(54) L-ЛИЗИН-ПРОДУЦИРУЮЩАЯ БАКТЕРИЯ *Corynebacterium glutamicum* ИЛИ *Brevibacterium flavum*, УСТОЙЧИВАЯ К ФУЗИДИНОВОЙ КИСЛОТЕ, И СПОСОБ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА L-ЛИЗИНА С ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии и представляет собой способ получения бактерии *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum* с повышенным уровнем синтеза L-лизина, включающий высеv культуры бактерии *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum*, способной продуцировать L-лизин, на среду, содержащую фузидиновую

кислоту, и отбор среди выросших колоний таких, которые обладают повышенным уровнем синтеза L-лизина. Изобретение относится также к способу микробиологического синтеза L-лизина путем культивирования бактерии, полученной указанным способом. Изобретение позволяет получать L-лизин с высокой степенью эффективности. 2 н.п. ф-лы, 1 табл., 8 пр.

Изобретение относится к биотехнологии и касается штаммов *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum*, продуцирующих L-лизин, а также способа получения L-лизина с помощью ферментационного процесса с использованием бактерий-продуцентов L-лизина, устойчивых к фузидиновой кислоте.

5 L-лизин относится к группе незаменимых аминокислот и является наиболее востребованной кормовой добавкой для животноводства и птицеводства.

Основным способом получения L-лизина является ферментация сахаров с помощью бактерий, таких как *Corynebacterium glutamicum* (US 3687810, US 3929571), *Brevibacterium* sp. (US 3687810, US 3929571) и *Escherichia coli* (RU 2347807). В известных способах
10 получения L-лизина используют, главным образом, различные генетически измененные штаммы бактерий с повышенной продуктивностью по L-лизу, полученные либо с помощью генетической инженерии, либо с помощью традиционных селекционных методов. Одним из подходов к повышению продуктивности штаммов является получение мутантных штаммов, устойчивых к клеточным метаболитам (антибиотикам).

15 Известны способы получения L-лизина, в которых используются бактерии, устойчивые к антибиотикам рифампицину (US 4623623), стрептомицину (US 3929571, US 4623623), канамицину (US 7736880, US 8361758) или одновременно к нескольким антибиотикам (US 3687810, US 4623623). Эти антибиотики относятся к группам ансамицинов и аминогликозидных антибиотиков, соответственно. О влиянии
20 антибиотиков из других групп на продукцию L-лизина не сообщалось.

Задачей заявляемого изобретения является расширение арсенала бактерий, обладающих способностью повышать уровень синтеза L-лизина в результате приобретения устойчивости к антибиотику, и разработка способа микробиологического синтеза L-лизина с использованием этих бактерий.

25 Задача решена путем:

- получения L-лизин-продуцирующего штамма *Corynebacterium glutamicum* ВКПМ В-11609, устойчивого к фузидиновой кислоте;
- получения L-лизин-продуцирующего штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11635, устойчивого к фузидиновой кислоте;
- 30 - получения L-лизин-продуцирующего штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404, устойчивого к фузидиновой кислоте;
- разработки способа микробиологического синтеза L-лизина путем культивирования в подходящих условиях L-лизин-продуцирующих бактерий *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum*, устойчивых к фузидиновой кислоте.

35 Характеристика заявляемых штаммов:

Штамм *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11635

Мутант штамма *Brevibacterium flavum* 90 ВКПМ В-5593, устойчивый к фузидиновой кислоте и обладающий повышенной продуктивностью по L-лизу, депонирован во
40 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) как *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11635.

Культурально-морфологические признаки:

- клетки овальные, размером 1,0-1,5×0,6-0,6-0,8 мкм, неподвижные, грамположительные, спор не образуют;
- через 2-4 суток роста при 30°C на МПА (ГОСТ 29112-91) образует колонии
45 диаметром 2-4 мм, желтовато-кремовые, поверхность гладкая, форма выпуклая, край ровный, структура однородная тестообразная;
- при посеве штрихом через 2-4 суток рост умеренный, край гладкий, поверхность матовая.

Физиолого-биохимические признаки:

- аэроб;
- хорошо растет на глюкозе, сахарозе, мальтозе, фруктозе, маннозе, этаноле, уксусной кислоте, не растет на ксилозе, арабинозе, лактозе, раффинозе;

- 5 - усваивает азот в форме солей аммония и мочевины;
- растет при температуре 24-37°C, оптимальная температура 30-32°C;
- растет на средах с pH от 6 до 8,5, оптимальное значение pH 6,8-7,2;
- при росте в минимальной среде нуждается в биотине, тиамине и L-лейцине;
- устойчив к аналогу лизина S-(2-аминоэтил)-L-цистеину (АЭЦ);
- 10 - устойчив к фузидиновой кислоте.

Штамм *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404

Мутант штамма *Brevibacterium flavum* НФ410, устойчивый к фузидиновой кислоте и обладающий повышенной продуктивностью по L-лизину, депонирован в ВКПМ как *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404.

- 15 Штамм НФ410 в свою очередь получен с помощью генетических методов из штамма *Brevibacterium flavum* 90 (ВКПМ В-5593). Штамм НФ410, в отличие от штамма ВКПМ В-5593, не способен использовать ацетат в качестве единственного источника углерода и обладает повышенной активностью аспартаткиназы и диаминопимелатдегидрогеназы.

Культурально-морфологические признаки:

- 20 - клетки овальные, размером 1,0-1,5×0,6-0,6-0,8 мкм, неподвижные, грамположительные, спор не образуют;
- через 2-4 суток роста при 30°C на среде МПА образует колонии диаметром 2-4 мм, желтовато-кремовые, поверхность гладкая, форма выпуклая, край ровный, структура однородная тестообразная;
- 25 - при посеве штрихом через 2-4 суток рост умеренный, край гладкий, поверхность матовая.

Физиолого-биохимические признаки:

- аэроб;
- хорошо растет на глюкозе, сахарозе, мальтозе, фруктозе, маннозе, не растет на ксилозе, арабинозе, лактозе, раффинозе и ацетате;
- 30 - усваивает азот в форме солей аммония и мочевины;
- растет при температуре 24-37°C, оптимальная температура 30-32°C;
- растет на средах с pH от 6 до 8,5, оптимальное значение pH 6,8-7,2;
- при росте в минимальной среде нуждается в биотине, тиамине и L-лейцине;
- 35 - устойчив к аналогу лизина S-(2-аминоэтил)-L-цистеину (АЭЦ);
- устойчив к фузидиновой кислоте;
- обладает повышенной, по сравнению со штаммом *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-5593, активностью аспартаткиназы и диаминопимелатдегидрогеназы.

Штамм *Corynebacterium glutamicum* ВКПМ В-11609

- 40 Мутант штамма *Corynebacterium glutamicum* ВКПМ В-11608, устойчивый к фузидиновой кислоте и обладающий повышенной продуктивностью по L-лизину, депонирован в ВКПМ под номером ВКПМ В-11609.

Штамм *Corynebacterium glutamicum* ВКПМ В-11608 в свою очередь получен из штамма *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 как устойчивый к S-(2-аминоэтил)-цистеину.

- 45 Культурально-морфологические признаки:
- клетки овальные, размером 1,0-1,5×0,6-0,6-0,8 мкм, неподвижные, грамположительные, спор не образуют;
- через 1-3 суток роста при 30°C на МПА образует колонии диаметром 2-4 мм,

кремовые, поверхность гладкая, форма выпуклая, край ровный, структура однородная тестообразная;

- при посеве штрихом через 1-2 суток рост умеренный, край гладкий, поверхность матовая.

5 Физиолого-биохимические признаки:

- аэроб;

- хорошо растет на глюкозе, сахарозе, мальтозе, фруктозе, маннозе и ацетате, не растет на ксилозе, арабинозе, лактозе, раффинозе;

- усваивает азот в форме солей аммония и мочевины;

10 - растет при температуре 24-40°C, оптимальная температура 32-34°C;

- растет на средах с pH от 6 до 8,5, оптимальное значение pH 6,8-7,2;

- при росте в минимальной среде нуждается в биотине и тиамине;

- устойчив к аналогу лизина S-(2-аминоэтил)-L-цистеину (АЭЦ);

- устойчив к фузидиновой кислоте.

15 Штаммы, устойчивые к фузидиновой кислоте, получают путем посева на агаризованную питательную среду, содержащую фузидиновую кислоту, интактных L-лизин-продуцирующих клеток *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum*, либо L-лизин-продуцирующих клеток *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum*, предварительно обработанных любым известным мутагеном (в частности, нитрозогуанидином), с последующим инкубированием при 30°C в течение 72 ч. Среди мутантов, устойчивых к фузидиновой кислоте, штаммы с повышенной продуктивностью по L-лизину составляют не менее 20%.

Способ в общем виде

Способ микробиологического синтеза L-лизина осуществляют путем культивирования L-лизин-продуцирующего штамма бактерий *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum*, устойчивого к фузидиновой кислоте. В качестве питательной среды для культивирования используют минеральную среду, включающую фосфаты натрия или калия, соли магния, а при необходимости соли марганца и железа, и содержащую в качестве источника углерода любые сахара, например глюкозу, глюкозные сиропы или сахарозу, в качестве источника азота - аммонийные соли или мочевины, а также необходимые для роста аминокислоты и витамины. В качестве компонентов, ускоряющих рост бактерий, дополнительно добавляют кукурузный экстракт, гидролизаты глютен или сои. Культивирование бактерий проводят при 24-42°C, преимущественно при 30-32°C, и pH среды в интервале 6,0-8,5, преимущественно в интервале 6,8-7,2.

35 Культивирование бактерий осуществляют в пробирках, колбах или специальных реакторах при аэробных условиях.

Заявляемый способ микробиологического синтеза позволяет выделять синтезированный L-лизин из культуральной жидкости одним из известных способом, включая добавление к культуральной жидкости серной или соляной кислоты, использование ионообменной хроматографии, кристаллизации и т.д.

Пример 1. Получение L-лизин-продуцирующего штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11635, устойчивого к фузидиновой кислоте

Отбор устойчивых к фузидиновой кислоте мутантов L-лизин-продуцирующего штамма бактерий *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-5593 осуществляют путем посева культуры на агаризованную среду LB следующего состава (мас. %): триптон - 1,0, дрожжевой экстракт - 0,5, хлорид натрия - 0,5, вода - остальное, с добавлением биотина до 0,00001%, глюкозы до 0,5% и фузидиновой кислоты до 0,0005%. Культуры штамма

Brevibacterium flavum ВКПМ В-5593 предварительно выращивают на качалке (250 об/мин) при 30°C в течение 24 ч в жидкой среде LB с добавлением биотина до 0,00001% и глюкозы до 0,5%.

Через 3-5 суток инкубирования чашек при 30°C на поверхности агаризованной среды вырастают колонии клонов, устойчивых к фузидиновой кислоте. Уровень биосинтеза L-лизина у отобранных клонов тестируют в чашечном тесте (модифицированный ауксанографический метод) (Методы общей бактериологии в 3-х томах, 1984), который основан на способности штаммов, продуцирующих L-лизин, обеспечивать на агаризованной минимальной среде рост ауксотрофных по L-лизу штаммов, например штамма *E. coli* ВКПМ В-558. С этой целью биомассу штамма ВКПМ В-558, выращенную предварительно при 37°C на среде LB при перемешивании (240 об/мин) в течение 18 ч, отделяют центрифугированием, дважды промывают 0,9% раствором NaCl, суспендируют в 0,9% растворе NaCl и затем 0,1 мл полученной клеточной суспензии высевает на чашку с минимальной средой следующего состава (мас. %): фосфат калия
 15 однозамещенный - 0,1, фосфат калия двухзамещенный - 0,6, сульфат магния семиводный - 0,05, хлорид аммония - 0,5, глюкоза - 2,0, биотин - 0,00001, тиамин - 0,00002, L-лейцин - 0,025, агар - 1,5, вода - остальное, pH 7,2-7,4. На эту же чашку зубочисткой переносят клетки мутантных клонов *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-5593, выросших на среде, содержащей фузидиновую кислоту (около 25 шт. на чашку). В качестве контроля на чашку зубочисткой переносят клеточный материал исходного штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-5593. Чашки инкубируют при 30°C в течение 2 дней.

В результате теста отобран устойчивый к фузидиновой кислоте (5 мкг/мл) мутант штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-5593, вокруг колоний которого в чашечном тесте наблюдали максимальную зону роста штамма *E. coli* ВКПМ В-558. Полученный
 25 мутант депонирован в ВКПМ как *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11635.

Пример 2. Получение L-лизин-продуцирующего штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404, устойчивого к фузидиновой кислоте

Получение мутантов осуществляют как описано в примере 1, но с использованием в качестве исходного штамма *Brevibacterium flavum* НФ410.

30 Один из мутантов штамма *Brevibacterium flavum* НФ410, устойчивый к фузидиновой кислоте (5 мкг/мл) и формирующий максимальную зону роста штамма *E. coli* ВКПМ В-558 при совместном культивировании на минимальной среде в чашечном тесте, депонирован в ВКПМ как штамм *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404.

Пример 3. Получение L-лизин-продуцирующего штамма *Corynebacterium glutamicum*
 35 ВКПМ В-11609, устойчивого к фузидиновой кислоте

Получение мутанта осуществляют как описано в примере 1, но с использованием в качестве исходного штамма *Corynebacterium glutamicum* ВКПМ В-11608, который в свою очередь получен из штамма *C. glutamicum* ATCC13032 как устойчивый к аналогу лизина S-(2-аминоэтил)-цистеину.

40 Один из мутантов штамма *Corynebacterium glutamicum* ВКПМ В-11608, устойчивый к фузидиновой кислоте (5 мкг/мл) и формирующий максимальную зону роста штамма *E. coli* ВКПМ В-558 при совместном культивировании на минимальной среде в чашечном тесте, депонирован в ВКПМ как штамм *Corynebacterium glutamicum* ВКПМ В-11609.

Пример 4. Оценка уровня синтеза L-лизина полученными штаммами

45 Оценку проводят в пробирочных тестах. Для этого 0,3 мл культуры одного из заявляемых штаммов, предварительно выращенной в течение 22 ч с перемешиванием (240 об/мин) при 30°C, вносят в пробирки с 3 мл среды следующего состава (мас. %): глюкоза - 10,0 хлорид аммония - 2,5, фосфат калия однозамещенный - 0,1, сульфат

магния семиводный - 0,1, мел - 2,5, биотин - 0,00001, тиамин - 0,00002, с добавлением кислотного гидролизата пшеничного глютена* 50,0 мл/л, вода - остальное. *Гидролизат пшеничного глютена получают путем гидролиза пшеничного глютена серной кислотой согласно известным способам гидролиза различного сырья с целью получения источника

ростовых факторов при микробиологическом производстве аминокислот (Биотехнология и биоинженерия, Рига, 1978). Перед внесением в среду гидролизат нейтрализуют концентрированным аммиаком. Пробирки с культурами инкубируют в течение 24 или 48 ч с перемешиванием (250 об/мин) при 30°C и затем в культуральной жидкости определяют уровень накопления L-лизина методом тонкослойной

Таблица. Уровень синтеза L-лизина полученными штаммами <i>Brevibacterium flavum</i> ВКПМ В-11635, <i>Brevibacterium flavum</i> ВКПМ В-11404 и <i>Corynebacterium glutamicum</i> ВКПМ В-11609 в пробирочных тестах.			
Культура	Концентрация L-лизина в культуральной жидкости через 24 ч (г/л)	Концентрация L-лизина в культуральной жидкости через 48 ч (г/л)	Повышение уровня синтеза L-лизина по сравнению с родительским штаммом (%)
<i>Brevibacterium flavum</i> ВКПМ В-11635 (мутант)	22,2	39,5	10
<i>Brevibacterium flavum</i> , ВКПМ В-5593 (родительский штамм)	17,6	36,0	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ВКПМ В-11609 (мутант)	Не определяли	18,0	9
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ВКПМ В-11608 (родительский штамм)	Не определяли	16,5	
<i>Brevibacterium flavum</i> ВКПМ В-11404 (мутант)	Не определяли	41,5	10
<i>Brevibacterium flavum</i> НФ410 (родительский штамм)	Не определяли	37,5	

Из результатов, представленных в таблице, следует, что устойчивые к фузидиновой кислоте мутанты L-лизин-продуцирующих штаммов *Brevibacterium flavum* и *Corynebacterium glutamicum* обладают повышенным уровнем синтеза L-лизина по сравнению с родительскими штаммами не менее чем на 9%.

Пример 5. Синтез L-лизина путем культивирования штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11635 в ферментере

Синтез L-лизина осуществляют путем культивирования штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11635 в ферментере объемом 3 л. Для этого в ферментер, содержащий 0,600 л ферментационной среды, вносят 0,450 л 70% стерильного раствора глюкозы и 0,15 л культуры, предварительно выращенной при 31°C в течение 16 ч. Состав ферментационной среды (мас. %): фосфат калия однозамещенный - 0,90, сульфат магния семиводного - 0,32, сульфат аммония - 5,5, биотин - 0,000045, тиамин - 0,000045, сульфат железа семиводный - 0,0045, сульфат марганца пятиводный - 0,0045, пеногаситель пропиол Б-400 - 0,10, с добавлением кислотного гидролизата пшеничного глютена - 167 мл/л, остальное - вода, pH среды доведен до 7,0 добавлением 16% аммиака.

Культивирование в ферментере проводят при 32°C, с перемешиванием (900 об/мин), аэрацией 1,2 л/мин и pH 7,0, который поддерживают добавлением 16% аммиака.

Культивирование завершают при полном исчерпании глюкозы в культуральной жидкости. Уровень накопления L-лизина в культуральной жидкости определяют с помощью тонкослойной хроматографии.

Через 70 час культивирования концентрация L-лизина в культуральной жидкости составляла 115 г/л.

Пример 6. Синтез L-лизина путем культивирования штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404 в ферментере

Синтез L-лизина осуществляют путем культивирования штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404 в ферментере объемом 3 л. Для этого в ферментер, содержащий 0,550 л ферментационной среды, вносят 0,15 л культуры, предварительно выращенной при 31°C в течение 16 ч в посевном ферментере. Состав ферментационной среды (мас.%):
 5 фосфат калия однозамещенный - 0,90, сульфат магния семиводный - 0,32, сульфат аммония - 5,50, глюкоза - 2,50, биотин - 0,000045, тиамин - 0,000045, сульфат железа семиводный - 0,0045, сульфат марганца пятиводный - 0,0045, пеногаситель пропинол Б-400 - 0,10, с добавлением кислотного гидролизата пшеничного глютена - 167 мл/л, вода - остальное, pH среды доведен до 7,0 добавлением 16% аммиака. Культивирование
 10 в ферментере проводят при 32°C, с перемешиванием (900 об/мин), аэрацией 1,2 л/мин и pH 7,0, который поддерживают добавлением 16% аммиака.

В ходе ферментации остаточную концентрацию глюкозы в культуральной жидкости поддерживают в диапазоне от 5 до 60 г/л добавлением подпитки, содержащей глюкозу и гидролизат пшеничного глютена. Суммарная подача глюкозы (с учетом исходной
 15 концентрации) составляет 310 г/л, а гидролизата пшеничного глютена - 45 мл/л.

Культивирование завершают при полном исчерпании глюкозы в культуральной жидкости. Уровень накопления L-лизина в культуральной жидкости определяют с помощью тонкослойной хроматографии.

Через 70 час культивирования концентрация L-лизина в культуральной жидкости
 20 составляла 150 г/л.

Пример 7. Получение L-лизин моногидрохлорида из культуральной жидкости штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11635 или штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11404

К 1 л содержащей L-лизин культуральной жидкости, полученной как описано в примерах 5 или 6, добавляют концентрированную серную кислоту в количестве?
 25 необходимом для доведения pH до 1,5. Затем культуральную жидкость пропускают через колонну с сульфокатионитом КУ-2-8 (ГОСТ 20298-74) в аммонийной форме. После абсорбции L-лизина колонну сразу промывают деминерализованной водой комнатной температуры. Сорбированный на сульфокатионите L-лизин элюируют раствором, содержащим 2,0 моль/л гидроксида аммония. Фракции, содержащие L-
 30 лизин, концентрируют упариванием в вакууме, подкисляют концентрированной соляной кислотой до pH 4,5 и охлаждают до 10°C. Выпавшие кристаллы отделяют от маточного раствора центрифугированием, промывают небольшим количеством деминерализованной воды и высушивают. Полученный продукт содержит не менее 98% L-лизин моногидрохлорида.

35 В случае использования 1 л культуральной жидкости, получение которой описано в примере 5, получено 103 г L-лизин моногидрохлорида, а в случае культуральной жидкости, полученной как описано в примере 6, - 135 г L-лизин моногидрохлорида.

Пример 8. Получение L-лизин сульфата из культуральной жидкости заявляемых штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ В-11635 или штамма *Brevibacterium flavum* ВКПМ
 40 В-11404

К 1 л содержащей L-лизин культуральной жидкости, полученной как описано в примерах 5 или 6, добавляют 3,5 мл концентрированной серной кислоты до pH 5,0. Затем полученную жидкость направляют на распылительную сушку. Сушку проводят при температуре входящего воздуха 120°C в течение 3 часов.

45 В результате получают продукт, содержащий 65% L-лизин сульфата. В случае использования 1 л культуральной жидкости, полученной как описано в примере 5, получено 157,5 г продукта, а в случае использования 1 л культуральной жидкости, полученной как описано в примере 6, - 205 г продукта.

Таким образом, введение в L-лизин-продуцирующие штаммы *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum* мутаций устойчивости к фузидиновой кислоте приводит к повышению уровня продукции L-лизина не менее чем на 9%. Заявляемый способ синтеза L-лизина, с использованием L-лизин-продуцирующих штаммов *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum*, устойчивых к фузидиновой кислоте, позволяет получать две наиболее распространенные товарные формы L-лизина - лизин гидрохлорид и лизин сульфат.

Источники информации

1. Методы общей бактериологии. Под ред. Ф. Герхардта, в 3-х томах, 1984.
2. Биотехнология и биоинженерия, Рига, 1978.
3. US 3687810.
4. US 3929571.
5. RU 2347807.
6. US 4623623.
7. US 7736880.
8. US 8361758.

Формула изобретения

1. Способ получения бактерии *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum* с повышенным уровнем синтеза L-лизина, включающий высеv культуры бактерии *Corynebacterium glutamicum* или *Brevibacterium flavum*, способной продуцировать L-лизин, на среду, содержащую фузидиновую кислоту, и отбор среди выросших колоний таких, которые обладают повышенным уровнем синтеза L-лизина.

2. Способ микробиологического синтеза L-лизина путем культивирования бактерии, полученной способом по п. 1, в подходящих условиях на минеральной среде, содержащей источники углерода, азота, а также необходимые для роста бактерий аминокислоты и витамины.



УКРАЇНА

(19) UA (11) 45632 (13) A

(51) C 12P13/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДКОВІДІЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ВИЛУЧЕННЯ ЛІЗИНУ ІЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ПРОДУЦЕНТА

1

2

(21) 2001053207

(22) 14 05 2001

(24) 15 04 2002

(46) 15 04 2002, Бюл. № 4, 2002 р.

(72) Степанов Валерій Андрійович, Крамаренко
Юрій Петрович, Белов Євген Юрійович, Рискаль
Володимир Олегович, Власенко Михайло
Іванович, Лихман Костянтин Восподимирович(73) ВІДКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО
"КОНЦЕРН СТИРОЛ"(57) 1 Спосіб вилучення лізину з культуральної
рідини продуцента, який включає в себе екст-
ракцію лізину з культуральної і такої іншої рідини, і
його реекстракцію, який відрізняється тим, що
екстракцію проводять безпосередньо із необроб-
леної культуральної рідини, яка вийшла із фер-
ментерів, на екстракційних декантерах, а реекст-
ракцію проводять газоподібним аміаком у
присутності невеликої кількості води /абовідсутності такої/ із наступним розподілом екстра-
гента і реекстрагованого лізину2 Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що реек-
стракцію лізину проводять при підвищеній темпе-
ратурі і тиску3 Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що
твердий лізин, який вилучився, концентрують на
відцентрових сепараторах до вмісту твердої речо-
вини 30-60%, а потім до отриманого концентрату
додають воду і відділяють отриманий розчин
лізину від екстрагента для отримання концентро-
ваного розчину лізину4 Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що при
відсутності води в екстрагенті реекстракцію про-
водять, відділяючи твердий продукт, який вилучи-
вся, на сепараторі, а потім на центрифугі із про-
миванням органічним розчинником і сушінням з
отриманням твердого лізинуВинахід відноситься до біотехнології і може
бути безпосередньо використаний у мікробіологіч-
ній промисловості при отриманні лізину біотехно-
логічним шляхомВідомий спосіб вилучення лізину з куль-
туральної рідини продуцента, який включає в себе
екстракцію лізину з культуральної рідини та його
реекстракцію С 1 А С N 1367493, МДК C12P
13/08, опубл. 15 01 1988г., О В N 21, в якому про-
цес переробки культуральної рідини (КР) є багато-
стадійним і включає в себе стадію підготовки КР
шляхом фракціонування методом ультрафільтра-
ції на мембранах або діалізу з використанням ди-
фузійних мембран, а відділення біомаси від куль-
туральної рідини здійснюють центрифугуваннямНедоліками відомого способу є складність
здійснення через багата стадійність процесу, який
вимагає значних витрат на обладнання, періодич-
ність проведення, тому що приходиться зупиняти
фільтри на очистку у зв'язку з їх засміченням за-
брудненою КР, що також пов'язане з додатковими
витратами на очистку і концентрування, втрати
цільового продукту на фільтрах, відносно велика
площа, яку займає, потребує підвищеної кількостіобслуговуючого персоналу і витрат на амортиза-
цію, що знижує його економічністьНайбільш близьким за технічною сутністю є
спосіб вилучення лізину з культуральної рідини
продуцента, який включає в себе екстракцію лізи-
ну з культуральної і такої іншої рідини та його реек-
стракцію [2 Лабораторный регламент Способ
выделения лизина из культуральной жидкости
экстракционным методом с использованием жид-
ких ионитов. Институт физико-органической химии,
г. Минск, 1987г. с. 11-26] У відомому способі про-
цес отримання аміачних розчинів лізину є багато-
стадійним, який включає в себе декілька основних
стадій. Стадія підготовки сировини включає робо-
ти, пов'язані з приготуванням розчинів і баромем-
бранною обробкою, яка здійснюється шляхом від-
ділення біомаси ультрафільтрацією,
застосуванням інообмінної екстракції розчинами
іонітів (як, наприклад, полііоніглінафталін сульфо-
кислота) в органічному розчиннику, який не змен-
шується з водою Екстракцію лізину проводять
після баромембранної обробки КР А реекстракцію
лізину проводять розчином аміаку (аміачною во-
дою) з наступним упаровуванням реекстракту для

(13) A

(11) 45632

(19) UA

виділення аміаку і води і сушінням продукту, який утворився після, упарювання. Спосіб дозволяє отримати дві і більше товарних форм лізиністичних продуктів.

До недоліків відноситься складність здійснення способу, багатостадійність і періодичність процесу, що знижує його економічність, значні витрати пари на упарювання реекстракту і втрати лізину при баромембранній обробці, використання для реекстракції відносно дорогої аміачної води. При проведенні діалізу отримують розведений водяний розчин продукту біосинтезу, забруднений до того ж низькомолекулярними сполуками, такими як солі, органічні кислоти та ін. Це вимагає для отримання цільового продукту додаткових витрат на очищення і концентрування, підвищує кількість стоків при регенерації мембран, збільшує втрати лізину. Весь цей процес складений в апаратному оформленні (застосовується мікрофільтраційна та ультрафільтраційна установка). Застосування такого обладнання вимагає підвищеного контролю і пожежності процесів, займає велику робочу площу, збільшує кількість обслуговуючого персоналу і витрати на амортизацію обладнання.

В основу винаходу поставлена задача вдосконалення способу вилучення лізину з культуральної рідини продуцента, в якому екстракцію лізину проводять в екстракційних декантерах після підкислення необробленої культуральної рідини, яка вийшла із ферментерів, а реекстракцію проводять при підвищеній температурі і тиску газоподібним аміаком у присутності невеликої кількості води/або її відсутності із наступним розділенням органічної і неорганічної фаз, спрощуючи тим самим технологію виділення лізину, зменшуючи кількість стадій, включаючи процес баромембранної обробки, знижуючи витрату енергоносіїв на упарювання екстрагента, запобігаючи втратам лізину, з відходами при баромембранній обробці, збільшуючи вихід цільового продукту, що, в цілому, підвищить економічність процесу.

Поставлена задача вирішується тим, що, у відомому способі вилучення лізину з культуральної рідини продуцента, який включає в себе екстракцію лізину з культуральної і такої іншої рідини, і його реекстракцію, згідно з винаходом, екстракцію лізину проводять безпосередньо з необробленої культуральної рідини, яка вийшла з ферментерів на екстракційних декантерах, а реекстракцію проводять газоподібним аміаком у присутності невеликої кількості води/або відсутності такої з наступним розподілом екстрагента і реекстрагованого лізину, причому реекстракцію лізину проводять при підвищеній температурі і тиску, а твердий лізин, який вилучився, концентрують на відцентрових сепараторах до вмісту твердої речовини 30 - 60%, а потім до отриманого концентрату додають воду і відділяють отриманий розчин лізину від екстрагента для отримання концентрованого розчину лізину, а при відсутності води в екстрагенті реекстракцію проводять, відділяючи твердий продукт, який вилучився, на сепараторі, а потім на центрифугі із промиванням органічним розчинником і сушінням з отриманням твердого лізину.

Проведення процесу екстракції лізину на екстракційних декантерах безпосередньо з необроб-

леної культуральної рідини, яка вийшла із ферментерів після її підкислення, дозволяє зменшити кількість проміжних стадій процесу виділення лізину із КР, тому що в екстракційних декантерах перероблюються суспензії з високим вмістом твердої речовини, завдяки чому відпадає необхідність попереднього фільтрування суспензії, яка містить екстракт. Це забезпечує багато технологічних переваг, такі як безперервність процесу, його спрощення, зниження втрат цільового продукту, який залишається в залишку при фільтрації, збільшення загального виходу лізину, тому що культуральна рідина не розводиться водою при регенерації мембран фільтрів, зменшення забрудненості екстракту, зниження об'єму стічних вод, скорочення експлуатаційних витрат і енерговитрат, зниження виробничих площ, трудоемності процесу, його амортизаційних витрат.

Здійснення процесу реекстракції лізину при підвищеній температурі і тиску сприятливо виявляється на кінетиці самого процесу, тому що знижує в'язкість розчину і збільшує парціальний тиск аміаку, що збільшує швидкість процесу реекстракції і продуктивність процесу.

Використання для реекстракції культуральної рідини газоподібного аміаку замість аміачної води (його розчину у воді), дозволить значно скоротити витрату пари в технології вилучення лізину за рахунок виключення процесу упарювання реекстракта, використання більш дешевого реагенту, тому що газоподібний аміак дешевше, ніж аміачна вода в перерахуванні на чистий аміак, що знизить енерговитрати, підвищить економічність.

При концентруванні твердого продукту, який вилучився на відцентрових сепараторах відбувається часткове відділення екстрагента від лізину. Концентрат містить лізин 30 - 60% і залишки екстрагента. Для їх розподілу в цю суміш додають воду. В результаті чого лізин переходить у водяну фазу. Потім водяну та органічну фазу розділяють. Це виключить промивання твердого лізину органічним розчинником і дозволить отримати лізин у готовій формі, яка найбільш часто використовується у світі.

Проводячи процес реекстракції у присутності невеликої кількості води, отримують 30 - 60% розчин лізину основи, після чого відділяють розчин лізину на сепараторі для розподілу рідин. При концентруванні лізину в розчині менше 30% при додаванні води виникають емульсії, які важко розруйнуються, тому вода у маслі через надмір органічної фази, а концентрування вище 60% спричиняє перевитрату електроенергії і збільшення потужності обладнання.

Також можливий варіант реекстракції лізину газоподібним аміаком у відсутності води, в результаті чого отримують твердий продукт, який потім відділяють на саморозвантажувальних сепараторах і центрифугах з промиванням центрифугата органічним розчинником. Це дозволяє отримати твердий продукт, придатний для подальшої переробки та очищення для отримання лізину фармацевтичної та харчової якості.

На фіг. подана схема реалізації способу.

Схема вилучення лізину з культуральної рідини продуцента містить екстракційний декантер 1 і

декантер 2, пристрій для барботування аміаку 3, підключене до системи рециркуляції аміаку 4, сепаратор для згущення кристалізованого лізину 5, сполучене з емкістю для змішування концентрату лізину з водою 6 і емкістю для екстрагента 7, сепаратор 8 для розподілу розчину лізину та екстрагента

Культуральна рідина із ферментера подається на екстракційний декантер 1, де відбувається екстракція лізину. Виходячи з екстракційного декантера 1 КР подається на декантер 2, в якому екстрагується залишковий лізін. Екстрагент подається спочатку в декантер 2, а на виході з нього в декантер 1 для забезпечення протитоку КР і екстрагента. Отриманий екстракт лізину в екстрагенті на виході із декантера 1 подається у пристрій для реекстракції газоподібним аміаком 3 (барботер або скруббер), в якому лізін випадає в осад в результаті взаємодії з газоподібним аміаком. Отримана суспензія із скрубера 3 подається на сепаратор 5, де відбувається згущення лізину до вмісту 30 - 60%. Аміак циркулює в системі рециркуляції 4. Отриманий концентрат лізину в екстрагенті із сепаратора 5 подається в емкість для змішування концентрату з водою 6. Регенований екстрагент із сепаратора 4 подається в емкість для екстрагента 7. Суміш екстрагента з розчином лізину із емкості 5 подається на сепаратор для розподілу рідин 8, де відбувається відділення концентрованого розчину лізину, який відвантажується як товарна форма, а регенований екстрагент із сепаратора 8, подається в емкість для екстрагента 7.

В якості екстрагента використовують органічну сульфокислоту, відібрану з групи, що складається із органічних сульфокислот, які мають формулу ** STR11 **, де R 5 і R 6 - аліфатичні вуглеводневі групи, та які дивідуально мають від 6 до приблизно 22 вуглецевих атома, де R 5 і R 6 разом містять принаймні 18 вуглецевих атомів, і органічні сульфокислоти, які мають структурну формулу ** STR12 **, де R 7 і R 8 - аліфатичні вуглеводневі групи, які містять від 4 до приблизно 22 вуглецевих атома, де R 7, R 8, або сульфогрупа може знаходитись у положеннях 1 - 8 на ароматичних кільцях, і де R 7 і R 8 разом має принаймні 18 вуглецевих атомів.

В якості розчинника для екстрагента можна використовувати будь-яку нерозчинну у воді рідину. Аліфатичні вуглеці типу алканів, включаючи циклоалкани і галогеновані алкани. Аלקали, які застосовуються, мають мінімум п'ять вуглецевих атомів. Галогеновані алкани, які застосовуються, мають мінімум два вуглецевих атома, ароматичні вуглеводні, які можуть бути використані, включаючи бензол, і похідні типу толуолу, ксилолу і кумолу. Також підходять нерозчинні в воді ефіри, кетони, спирти. Крім того, підходять будь-які суміші цих речовин, нерозчинні у воді і всі рідкі фракції нафти. До сумішей можуть бути додані модифікатори для зміни або поліпшення вилучення лізину. Це можуть бути спирти, які містять від 10 до 13 вуглецевих атомів, алкіліровані феноли.

В якості екстрагента використовують органічну сульфокислоту, відібрану з групи, що складається із органічних сульфокислот, які мають формулу ** STR11 **, де R 5 і R 6 - аліфатичні вуглеводневі групи, які

індивідуально мають від 6 до 22 вуглецевих атома, де R 5 і R 6 разом містять принаймні 18 вуглецевих атомів, і органічні сульфокислоти, які мають структурну формулу ** STR12 **, де R 7 і R 8 - аліфатичні вуглеводневі групи, які

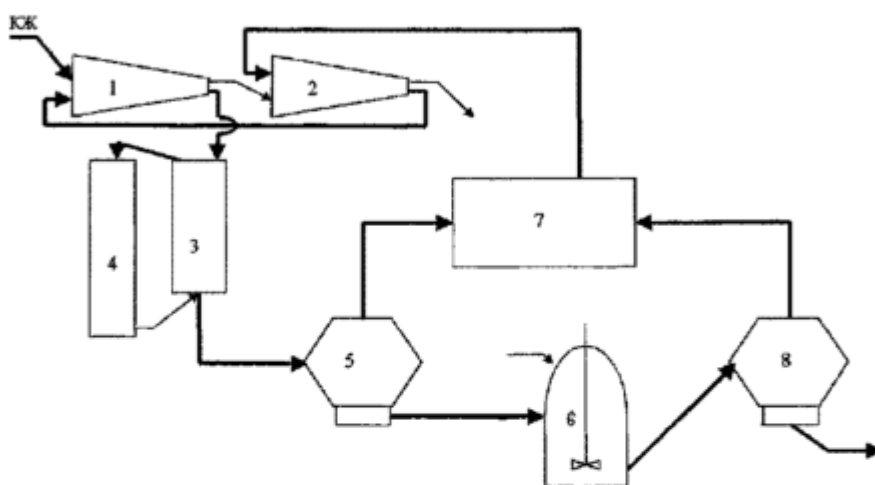
містять від 4 до приблизно 22 вуглецевих атома, де R 7, R 8, або сульфогрупа може знаходитись у положеннях 1 - 8 на ароматичних кільцях, і де R 7 і R 8 разом має принаймні 18 вуглецевих атомів.

Приклади здійснення способу

Приклад 1. Культуральну рідину підкислюють сірчаною кислотою до pH 1.8 і піддають екстракції розчином діноніпнафтаїну сульфокислоти в аміачній формі в екстракційних декантерах з шнековим вивантаженням твердих осадів. Екстракція здійснюється протитоком. Використовують два послідовно з'єднаних декантера, при цьому підкислена культуральна рідина і екстрагент рухаються протитоком один до одного. Знелізінену культуральну рідину передають на утилізацію, а екстрагент додатково освітлюють у сепараторі, який саморозвантажуються, для відділення залишків і культуральної рідини. Освітлений екстрагент змішують з невеликою кількістю води (2 - 10%), нагрівають до 70°C і подають зверху у скруббер. Знизу у скруббер подають нагрітий до 70°C аміак під тиском 2 - 20атм. При їх взаємодії відбувається перехід (екстракція) лізину із органічної фази у водяну. На виході із скрубера аміак відділяється від парів органічного розчинника і повертається на рециркуляцію. Емульсія, яка складається із регенованого екстрагента і водяного розчину лізину основи розділяють у відцентровому сепараторі і екстрагент знову повертають у виробництво, а 50% розчин лізину основи відвантажують як товарний продукт. Вихід продукту збільшується на 18%. Економиться приблизно 3,5 т пари на кожну тонну лізину.

Приклад 2. Підкислена сірчаною кислотою культуральна рідина подається на сепаратор, який саморозвантажуються, де відбувається відділення біомаси і зв'язаних речовин. Для більш повного відділення лізину відділена біомаса розводиться водою і повторно піддається сепарації. Процес повторюється до повного вилучення лізину. Освітлена культуральна рідина подається на екстракцію. Екстракція здійснюється у відцентрових екстракторах. Для повного вилучення лізину культуральна рідина і екстрагент рухаються протитоком один до одного. Екстракцію проводимо на 2 - 4 послідовно з'єднаних екстракторах, причому в перший подається культуральна рідина, а в останній - екстрагент. В результаті на виході з першого екстрактора ми отримуємо максимально насичений екстракт лізину, а на виході з останнього максимально знелізінену культуральну рідину. Екстракт, який містить лізін, піддаємо реекстракції газоподібним аміаком. Для цього екстракт подаємо зверху у колонну, через яку знизу пропускається нагрітий газоподібний аміак під тиском 2 - 20атм. Подачу екстракту здійснюємо через розливаючий пристрій для забезпечення максимального контакту рідкої і газоподібних фаз. Аміак на виході із колонни відділяємо від парів розчинника і повертаємо в процес. В результаті обробки аміаком лі-

Таким чином, в результаті реалізації заявлено-
ного способу значно спрощується технологія ви-
пущання лизину, підвищується економічність про-
цесу Використання заявленого способу дозволить
отримати економічний ефект у 0,5 - 1 млн грн. на
рік на одну установку потужністю 5 тис. тонн лизину
на рік



ТСВ "Міжнародний науковий комітет"
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40762 (13) A

(51) 7 C12P13/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КОМПЛЕКСНОЇ ПЕРЕРОБКИ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ПРОДУЦЕНТА L-ЛІЗИНУ

(21) 99074281

(22) 23.07.1999

(24) 15.08.2001

(72) Рискаль Володимир Олегович, Куваєва Зоя Іванівна (BY), Салдатов Уладзімір Сяргеевіч (BY), Роговер Валерій Семенович, Лужков Олександр Михайлович, Русіх Анна Миколаївна, Кузьміна Ельвіра Петрівна, Мікуліч Авенарій Васильєвіч (BY), Скрипчанка Аляксандр Сяргеевіч (BY)

(46) 15.08.2001, Бюл. № 7, 2001 р.

(73) ВІДКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "ТРИПІЛЬСЬКИЙ БІОХІМІЧНИЙ ЗАВОД"

(57) 1. Спосіб комплексної переробки культуральної рідини продуцента L-лізину, який включає відділення біомаси продуцента, іонообмінне виділення L-лізину, упарювання, кристалізацію, сушіння, що дозволяє отримувати дві і більше товарних форм лізингмісних продуктів з концентрацією L-лізину гідрохлориду від 3 до 98,5%, який відрізняється тим, що відділення біомаси продуценту проводять на відцентрових сепараторах і/чи шляхом баромембранної обробки куль-

туральної рідини на мікро-, ультра- та нано-фільтраційних установках, при цьому поряд з біомасою відділяються молекули білків та інших високомолекулярних сполук, і отриманий в результаті цієї обробки білковосамінокислотний концентрат використовують для виробництва високоефективної лізингпротейнової кормової домішки з концентрацією L-лізину гідрохлориду (3-50)%, а пермеат – для отримання висококонцентрованих лізингмісних продуктів з концентрацією L-лізину гідрохлориду (50-98,5)%.

2. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що іонообмінне виділення L-лізину проводять методом іонообмінної екстракції з використанням як іоніту (екстрагенту) розчину амонійної солі полінонілнафталінсульфофосфатів в середовищі органічного розчинника, що не змішується з водою, при мольному співвідношенні L-лізін/екстрагент 0,2-0,75 і рН 1,5-3,0 з наступним переводом L-лізину в водну фазу розчину аміаку при рН 10-11.

Винахід відноситься до мікробіологічної промисловості і стосується безпосередньо технології отримання лізингмісних продуктів.

Відомі способи отримання L-лізину гідрохлориду з культуральної рідини у вигляді кормових концентратів з вмістом L-лізину гідрохлориду (7-20) % і кристалічного L-лізину гідрохлориду з вмістом основної речовини (95-98,5) %: при цьому при отриманні кристалічного L-лізину гідрохлориду основними технологічними стадіями є: відділення біомаси продуценту, іонообмінне виділення L-лізину з використанням твердих іонітів, упарювання елюату, кристалізація, перекристалізація, сушіння [1, 2, 3].

Велике значення в процесі отримання L-лізину полягає в стадії іонообмінного виділення, і питанню вдосконалення цієї стадії приділялася велика увага вчених і виробників [4, 5]. Однак, до цього часу спосіб виділення і очищення L-лізину з культуральної рідини залишається складним, багатостадійним, потребує використання значної кількості реагентів при іонообмінному виділенні і

супроводжується великою кількістю виробничих стоків.

Поставлену мету підвищення ефективності процесу переробки культуральної рідини продуценту L-лізину досягають шляхом реалізації багатопродуктової маловідходної схеми отримання лізингмісних продуктів з використанням більш прогресивних технологічних процесів на окремих стадіях виробництва.

Нижче наводиться стисла характеристика нових технологічних процесів.

1. Баромембранну обробку культуральної рідини проводять на мікро-, ультра-, нанофільтраційних установках, на яких відділяють з культуральної рідини не тільки біомасу продуценту, але й розчинені білки та високомолекулярні сполуки (домішки). В результаті такої обробки отримують щонайменше два лізингмісних потоки, вміст лізину в одному з них більший, а в другому менший, ніж у вихідному розчині. Очищений від домішок розчин L-лізину використовують для отримання лізингмісного готового продукту з концентрацією

Зоя

(13) A

(11) 40762

(19) UA

L-лізину (у розрахуванні на L-лізин гідрохлорид) більше 50 % (продукт В). Більш збагачений домішками розчин використовують для отримання низькоконцентрованої товарної форми лізинамішучого продукту з концентрацією L-лізину (у розрахуванні на L-лізин гідрохлорид) (3-50) % (продукт А).

Склад продукту А завдяки наявності в ньому крім L-лізину інших амінокислот, біомаси продуценту, розчинних білків, бетайну, мікроелементів та інших корисних компонентів забезпечує більш високу ефективність збалансованого ним за L-лізином корму на основі зернових культур у порівнянні з кормом, збалансованим L-лізином гідрохлоридом 98,5 % вмісту.

Попередньою стадією перед баромембранною обробкою може бути стадія відділення завислих речовин на відцентрових сепараторах.

2. Для отримання концентрованих товарних форм лізинамішучих продуктів з концентрацією L-лізину гідрохлориду більше 85 % після баромембранної обробки культуральної рідини проводять вилучення L-лізину з очищеного розчину методом іонообмінної екстракції з використанням в якості екстрагенту розчину амонійної солі полінонілфталісульфокислоти в середовищі органічного розчинника, що не змішується з водою. Мольне співвідношення L-лізин/екстрагент 0,2-0,75; pH 1,5-3,0. Перевод L-лізину в водну фазу здійснюють розчином аміаку при pH 10-11.

Іонообмінне виділення L-лізину проводять на відцентрових екстракторах-сепараторах, які дозволяють забезпечити високу швидкість і необхідний ступінь вилучення цільового продукту.

Пропонується метод іонообмінного виділення L-лізину знижує витрату промивної води, реагентів, різко зменшує кількість виробничих стоків і простий для реалізації.

Із отриманого на стадії іонообмінного виділення реекстракту після упарювання і сушіння отримують лізинамішучий готовий продукт з концентрацією L-лізину гідрохлориду (85-98) % (продукт Г), або після стадії кристалізації і сушіння отримують продукт з концентрацією L-лізину гідрохлориду 98,5 % (продукт Д).

Рафінат після іонообмінного вилучення L-лізину використовують для отримання продукту А.

В залежності від умов виробництва та бажання споживача іонообмінне виділення L-лізину проводять також безпосередньо із культуральної рідини з подальшим упарюванням і сушінням реекстракту та отриманням продукту з вмістом L-лізину гідрохлориду (70-85) % (продукт Б).

Таким чином, в результаті, реалізації запропонованого способу переробки культуральної рідини продуценту L-лізину в залежності від умов виробництва та бажання споживача для використання в кормовиробництві отримують 5 товарних форм лізинамішучих продуктів з концентрацією L-лізину гідрохлориду від 3 до 98,5 % з забезпеченням високої ефективності кормів, приготуваних з використанням цих продуктів (продукти А, Б, В, Г, Д).

Приклад 1.

4,8 л культуральної рідини продуценту L-лізину (КР), отриманої в результаті культивування штаму *Brevibacterium flavum* ВНДІ-генетика-90Н з

використанням в якості вуглеводного компоненту поживного середовища – цукру, підкислюють соляною кислотою до pH 5 і мікрофільтрують в тангенціальному потоці на установці марки АРБ-0,06 СН з трубчастими керамічними мембранними елементами (розмір пор 0,2 мкм). В результаті фільтрації з КР отримують пермеат і концентрат з характеристиками, що наведені в таблиці 1.

2 л пермеату упарюють під вакуумом на роторному випарнику марки ІР-10 до концентрації сухих речовин 60 %, після чого упарений розчин висушують в киплячому шарі на нестандартній сушарці.

Отриманий продукт має наступні характеристики: CP=98 %, $C_{Lys\text{ нс}}/CP=65,1$ % - продукт В.

Концентрат упарюють під вакуумом на роторному випарнику марки ІР-10 до концентрації сухих речовин 55,2 %, після чого ретельно змішують з 250 г попередньо підсушених до залишкової вологості 4 % пшеничних висівок і, продавивши суміш крізь фільтри з діаметром отворів 4 мм, висушують отримані гранули на сітці в потоці нагрітого повітря на нестандартній сушарці. Отриманий продукт має наступні характеристики:

CP=95 %, $C_{Lys\text{ нс}}/CP=15$ % - продукт А.

Приклад 2.

2 л пермеату, отриманого як описано в попередньому прикладі, підкислюють при перемішуванні концентрованою соляною кислотою до pH розчину 1,8. Отриманий розчин переносять в скляний реактор, додають 2 л 0,5 н розчину амонійної солі полінонілфталісульфокислоти (ПНСК) в октані у співвідношенні 1 об'єм розчину лізину до 1,5 об'єму ПНСК і перемішують на протязі 5 хвилин. Після руйнування емульсії органічну фазу відділяють від рафінату і додають до неї 7 % розчин аміаку в воді, після перемішування емульсії на протязі 5 хвилин фази знову поділяють, при цьому лізин переходить у водну фазу - елюат.

3 метою більш повного вилучення L-лізину екстракційну обробку отриманого рафінату проводять ще 2 рази способом, описаним вище. Характеристики отриманих розчинів наведені в таблиці 2.

Для відгонки аміаку елюат упарюють до об'єму 0,6 л, після чого підкислюють соляною кислотою до pH 5 і упарюють до вмісту сухих речовин 59,2 %. Упарений розчин висушують на сушарці в киплячому шарі.

Отриманий продукт має наступні характеристики: CP=98,4 %, $C_{Lys\text{ нс}}/CP=90,7$ % - продукт Г.

Приклад 3.

2 л КР, отриманої в результаті біосинтезу з використанням в якості вуглеводного компоненту поживного середовища - меласи, підкислюють при перемішуванні концентрованою соляною кислотою до pH 1,9 і двічі проводять цикли екстракції-реекстракції, як описано в прикладі 2.

Характеристики отриманих розчинів наведені в таблиці 3.

3 елюату відгоняють аміак і після підкислення концентрованою соляною кислотою до pH 5 упарюють до концентрації сухих речовин 58,7 %, після чого упарений розчин висушують на сушарці в киплячому шарі.

Отриманий продукт має наступні характеристики: $CP=98,3\%$, $C_{Lизин}/CP=81,2\%$ - продукт Б.

Рафінат змішують з 2,5 л вихідної КР і упарюють до вмісту сухих речовин 56,4 %. Упарений розчин змішують з 628 г підсушених до залишкової вологості 4 % пшеничних висівок і після грануляції отриманої пасти крізь фільтри висушують, як в прикладі 1.

Отриманий продукт має наступні характеристики: $CP=96,1\%$, $C_{Lизин}/CP=15,8\%$ - продукт А.

Приклад 4.

4 л КР, отриманої як описано в попередньому прикладі, підкислюють при перемішуванні концентрованою соляною кислотою до pH 5 і проводять мікрофільтрацію, як описано в прикладі 1. Отриманий пермеат 1 ультрафільтрують в тангенціальному потоці крізь синтетичні мембрани, поверхня яких спеціально модифікована так, що молекулярно-масова межа затримання становить близько 1000 дальтон.

Характеристики отриманих розчинів наведені в таблиці 4.

Пермеат 2 підкислюють при перемішуванні концентрованою соляною кислотою до pH 1,9 і тричі проводять цикли екстракції-реекстракції, як описано в прикладі 2.

Характеристики отриманих розчинів наведені в таблиці 5.

3 елюату відгоняють аміак і після підкислення концентрованою соляною кислотою до pH 5 упарюють до концентрації сухих речовин 65 %.

Потім колбу з упареним розчином обладнують механічною мішалкою і розміщують в холодильнику. Розчин при постійному перемішуванні

охолоджують до температури 6 °C і витримують 8 годин.

Отриману суспензію з кристалами L-лізину гідрохлориду розділяють на фільтруючій центрифугі (фактор розділення близько 6000).

Отримані кристали промивають 50 мл охолодженої до +6 °C знесоленої води і після віджиму на фільтруючій центрифугі висушують в сушильній шафі при температурі 105 °C. При цьому отримують 16,6 г продукту з вологістю 1,2 % і вмістом L-лізину гідрохлориду в сухих речовинах 98,8 %.

Маточник після кристалізації змішують з рафінатом від третього циклу екстракції-реекстракції і з концентратами після проведення мікро- та ультрафільтрації. Отримують розчин із наступними характеристиками:

$M_{розчину}=5,32$ кг, $CP=17,54\%$, $C_{Lизин}/CP=40,1$ г/л.

Потім даний розчин упарюють до вмісту сухих речовин 55 %, змішують з 7000 г підсушених до залишкової вологості 4 % пшеничних висівок і після грануляції отриманої пасти крізь фільтри висушують, як в прикладі 1.

Отриманий продукт має наступні характеристики: $CP=97,0\%$, $C_{Lизин}/CP=12,0\%$ - продукт А.

Джерела інформації

1. Окумура С., Иосинага, Иосихара Я. Патент 440848, 1974, JP.
2. А.с. 171727 СССР, МКИ С12Р 13/08, 1965.
3. Р.Ю. Аре, Я.Я. Лаукевич, У.С. Виестур. Микробные концентраты, их свойства и применение. Научный обзор. Известия Академии наук Латвии, 1980.
4. А.с. 1112779 СССР, МКИ С12Р13/08, 1982.

Таблиця 1

Найменування	Об'єм, л	Концентрація		
		Лізин гідрохлорид, г/л	Сухі речовини, %	Біомаса (завислі речовини), %
Підкислена КР	4,8	95	15,6	3
Пермеат	4	98,5	13,06	0
Концентрат	0,8	77,5	27,61	17,2

Таблиця 2

Найменування	Об'єм, л	Концентрація	
		Лізин гідрохлорид, г/л	Сухі речовини, %
Підкислений пермеат	2,14	92,1	14,4
Рафінат після 3 циклу	2,14	2,2	5,87
Об'єднаний елюат	3	62,8	5,38

Таблиця 3

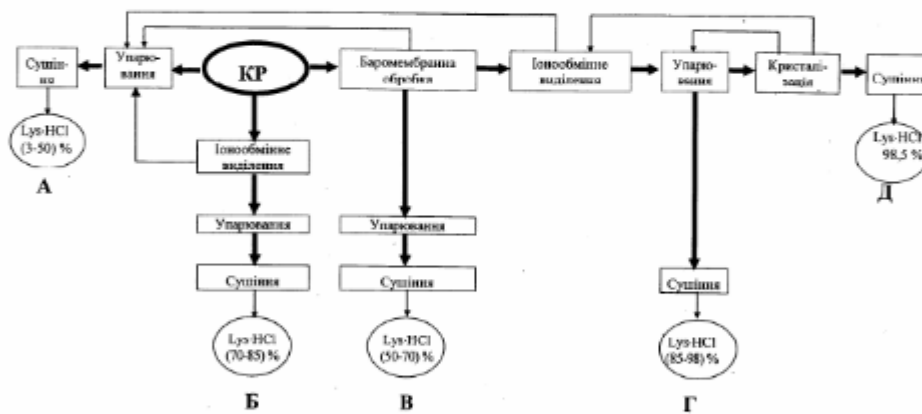
Найменування	Об'єм, л	Концентрація	
		Лізин гідрохлорид, г/л	Сухі речовини, %
КР	2,0	80	20
Підкислена КР	2,12	75,5	20,7
Рафінат після 2 циклу	2,12	19,8	15,0
Об'єднаний елюат	2,0	57,9	5,62

Таблиця 4

Найменування	Об'єм, л	Концентрація		
		Лізин гідрохлорид, г/л	Сухі речовини,%	Біомаса (завислі речовини), %
Мікрофільтрація				
Підкислена КР	4,65	79	19,8	3
Пермеат 1	3,88	83,4	17,4	0
Концентрат 1	0,77	56,9	31,3.	
Ультрафільтрація				
Пермеат 2	2,91	79,2	143,0	
Концентрат 2	0,97	95,9	27,2	

Таблиця 5

Найменування	Об'єм, л	Концентрація	
		Лізин гідрохлорид, г/л	Сухі речовини, %
Пермеат 2	2,91	79,2	14,0
Підкислений пермеат 2	3,11	74,1	15,2
Рафінат після 3 циклу	3,11	1,7	9,1
Об'єднаний елюат	4,5	48,9	4,55



Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
 Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
 (03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03