

**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)  
Наталія ГРЕГІРЧАК  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2022р.

**«До захисту допущено»**  
Завідувач кафедри  
Віктор СТАБНІКОВ  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2022р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

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

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

на тему: Біосинтез триптофану *Corynebacterium glutamicum*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2

ШУЛЬГА Марта Олександрівна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2022 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)

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

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 2022 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ШУЛЬГА Марта Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез триптофану *Corynebacterium glutamicum*

керівник роботи СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна, асист.,  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи Штам *Corynebacterium glutamicum* KY9218  
продуктивність виходу цільового продукту-58 г\л клітин, просте та дешеве  
середовище для культивування час культивування - 80  
ГОД.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; РОЗДІЛ 1.Характеристика цільового продукту; РОЗДІЛ 2.Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента ; РОЗДІЛ 3.Техніко-економічне обґрунтування; РОЗДІЛ 4.Обґрунтування вибору технологічної схеми; РОЗДІЛ5. Специфікація обладнання;РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми;РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема 1 лист А1, Технологічна схема 1 лист А1

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	04.04.2022 - 08.04.2022	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	10.04.2022- 15.04.2022	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	17.04.2022- 22.04.2022	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	23.04.2022- 28.04.2022	
5	РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання	30.04.2022- 06.05.2022	
6	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	08.05.2022- 13.05.2022	
7	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	15.05.2022- 19.05.2022	
8	Виконання графічної частини проекту	13.05.2022- 20.05.2022	
9	Оформлення пояснювальної записки	23.05.2022- 01.06.2022	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Марта ШУЛЬГА** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Тетяна СУЛЕЙКО** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробленню технології біосинтезу триптофану з використанням продуцента *Corynebacterium glutamicum* KY9218.

Проект складається зі вступу, сіми розділів, графічної частини (технологічної та апаратурної схеми) та списку використаної літератури з 71 найменувань. Загальний обсяг проекту – 88 сторінок, 8 рисунків, 19 таблиць, 2 креслення формату А2.

У дипломному проекті викладено технологічний процес ділянки синтезу триптофану, який включає блок допоміжних робіт (підготовка і стерилізація поживних середовищ і тп.) та технологічний процес (вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, інокуляторах і виробничий біосинтез у ферментері).

Наведено склад поживного середовища для культивування *Corynebacterium glutamicum* KY9218. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації. Розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Наведено опис основних стадій технологічного процесу із зазначенням параметрів, точок контролю та матеріальних потоків. Складено карту постадійного контролю процесу на наведено методики визначення концентрації біомаси.

**Ключові слова:** біомаса, триптофан, *Corynebacterium glutamicum* KY9218, амінокислоти, культивування, біосинтез.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1.Характеристика цільового продукту.....	8
РОЗДІЛ 2.Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	11
2.1.Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	11
2.2.Розрахунок складу поживного середовища.....	16
2.3.Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента..	18
2.4.Таксономічний статус біологічного агента.....	21
РОЗДІЛ 3.Техніко-економічне обґрунтування.....	23
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	23
3.2.Розрахунок річної потреби.....	26
3.3.Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	27
РОЗДІЛ 4.Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	29
4.1.Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	29
4.2.Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	31
4.3.Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	34
4.4.Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	39
РОЗДІЛ5. Специфікація обладнання.....	53
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. ....	55
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	72
7.1. Мікробіологічний контроль .....	72
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	73
7.2.1. Концентрація біомаси.....	73
7.2.2. Концентрація джерела вуглецю .....	75
7.2.3.Концентрація азоту.....	76
7.2.4. Концентрація цільового продукту .....	78
ЛІТЕРАТУРА.....	81
Додатки.....	

## ВСТУП

Амінокислоти – органічні кислоти, що містять одну чи кілька аміногруп, найважливіші азотовмісні речовини в живій клітині. 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 гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан і валін. Незамінні амінокислоти повинні бути присутніми в їжі для підтримки необхідного азотистого балансу в організмі людини. Дефіцит незамінних амінокислот в організмі призводить до порушень обміну речовин, зупинки росту, зниження маси тіла [1].

Можливі три способи промислового отримання незамінних амінокислот: гідроліз білків рослинного і мікробного походження, мікробіологічний і хімічний синтез. Більше 70% усіх вироблених промисловістю чистих препаратів 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 біологічною активністю в організмі людини і тварин володіють лише L-ізомери [1, 2].

Технології одержання амінокислот за рахунок гідролізу білків економічно менш вигідні, тому не отримали широкого розповсюдження.

При мікробіологічному синтезі утворюються L-амінокислоти, що є продуктами життєдіяльності спеціально підібраних і відселекціонованих штамів мікроорганізмів, які здатні накопичувати в культуральній рідині необхідну кількість амінокислоти [1-4]. Звичайні мікроорганізми не здатні синтезувати необхідні амінокислоти в потрібній кількості, тому використовують генетичні мутанти мікроорганізмів, отримані за допомогою хімічних і фізичних мутагенів.

Досить часто для мікробіологічного синтезу амінокислот

використовують ауксотрофні мутантні штами, які одержують методами звичайної селекції або генної інженерії [5-6]. За допомогою мутагенних факторів у таких ауксотрофних штамів індукується мутація, в результаті якої припиняється або інгібується синтез одного з продуктів, що регулюють ферментні системи, каталізують утворення даної амінокислоти в клітинах мутанта і в культуральній рідині.

На теперішній час найбільше біотехнологічних розробок присвячено мікробіологічному синтезу лізину (продуценти родів *Brevibacterium* і *Corynebacterium*) [1-5], також запропоновано способи біотехнологічного отримання ізoleyцину, лейцину, триптофану і треоніну (за використання *E. coli*) [5-6].

За вартістю продукції мікробіологічне виробництво амінокислот поступається тільки виробництву антибіотиків проте займає перше місце в світі за тоннажем (на 2014 рік виробляли приблизно 1,1 млн. т триптофану) [6]. Потреби сільського господарства, харчової промисловості та медицини зумовлюють інтенсивний розвиток промислового виробництва амінокислот.

Для створення ефективної промислової (комерційної) технології виробництва амінокислот з максимальним накопиченням кінцевого продукту потрібно мати високопродуктивні штами-продуценти, знайти оптимальні умови культивування і використовувати дешеві субстрати. Окрім цих чинників, накопичення незамінних амінокислот можна також збільшити, змінивши метаболічні шляхи синтезу [4-7].

#### **Актуальність роботи.**

Широке використання триптофану, обумовлює **актуальність** вирощування нових активних вітчизняних штамів-продуцентів триптофану, дослідження їх біологічних властивостей, механізмів адаптації до засвоєння субстратів та можливості використання вказаних мікроорганізмів для біотехнології незамінних амінокислот в Україні.

#### **Новизна роботи.**

Вперше використано *Corynebacterium glutamicum* KY9218 синтезу

триптофану в порівнянні з іншими штамми, такі як *B. subtilis* IFBG M1, *C. glutamicum* BPS-13, *C. utilis* 295-t, та *E. coli* SV164 (pGH5), а також використано оптимізований склад поживного середовища та параметрів культивування (температури, рН середовища, ступеню аерації, кількості ростових речовин) мутантного штаму, що дозволили збільшити накопичення триптофану в культуральному середовищі (57 г/л) [4-5].

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Триптофан ( $\beta$ -( $\beta$ -індоліл)- $\alpha$ -амінопропіонова кислота) – незамінна амінокислота. Існує в двох оптично ізомерних формах, L і D, і у вигляді рацемата. L-триптофан є протеїногенною амінокислотою і входить до складу гамаглобулінів, фібриногену, казеїну та інших білків. Відноситься до ряду гідрофобних амінокислотів, що містить ароматичне ядро індола. Триптофан є провітаміном [8].

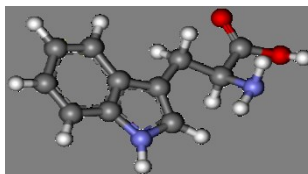


Рис. 1.1. Структурна формула триптофану

Триптофан був уперше виділений Ф. Гопкінсом і С. Коулом у 1901 році з казеїну. Унаслідок різноманіття пов'язаних з триптофаном метаболічних реакцій і продуктів він був однією з перших амінокислот, що були віднесені до незамінних. Дослідження, проведені на представниках роду (червона хлібна пліснява) і на бактеріях *Pseudomonas*, а також виділення метаболітів триптофану із сечі, надали неоціненну допомогу в з'ясуванні деталей його метаболізму [9].

Триптофан існує в оптично активних L- і D-, та рацемічній DL-формі. Добре розчинний у воді, обмежено – у спирті, не розчинний в діетиловому ефірі. Це гетероциклічна амінокислота й одна з найважливіших амінокислот із широким спектром дії. Триптофан використовують клітини ссавців для біосинтезу нікотинової кислоти (вітамін PP) і серотоніну, для створення м'язових білків, білків антитіл імунної системи, він бере участь у синтезі мелатоніну, є необхідним будівельним матеріалом для організму, нормалізує роботу нервової системи і травлення, має антидепресантну дію, підвищує опірність стресам, поліпшує сон.

					НУХТ БТЕК 04.02.26. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шульга М.О.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір. Консультант		Сулейко Т.Л.					8	88
Н.Контр.						Кафедра БТМ <sup>8</sup>		
Затвердив		Стабніков В.П.						

Недостатня кількість триптофану викликає погіршення стану шкіри й волосся, анемію, викликає безсоння [8-10].

*Способи отримання і виробництво триптофану:*

*Хімічний синтез*

Індол амінометилують формальдегідом і диметиламіном за методом Манних. Отриманий 3-діметіламінометіліндол конденсують з метиловим ефіром нітроуксусної кислоти, що призводить до Метилат-3-індолілінітропропіонової кислоти. Потім відновлюють нітрогрупу до аміногрупи. Після лужного гідролізу ефіру отримують D, L-триптофан зазвичай у формі натрієвої солі. [11] В триптофану, отриманому хімічним синтезом, виявляються домішки токсичних сполук. Синтетичний триптофан додають в комбікорми для тварин.

*Хіміко-ферментативний синтез*

У мікроорганізмів, в тому числі і у *Escherichia coli*, відомий піридоксальзалежний фермент триптофан-індол-ЛіАЗ (триптофаназа КФ 4.1.99.1). Функція цього ферменту полягає в підтримці рівноваги:

триптофан + вода  $\rightleftharpoons$  індол + піруват + амоній.

Завдяки цьому триптофан може бути отриманий ферментативною конденсацією індолу, піровиноградної кислоти і аміаку [8].

*Мікробіологічний синтез*

У промисловому виробництві L-триптофану зазвичай використовуються штами дріжджів *Candida utilis*, дефектні по аго-генам і, як наслідок, ауксотрофності по фенілаланіну і тирозину. Початковою сировиною зазвичай служить дешева синтетична антранілова кислота, що є доцільним з кількох причин. По-перше, це спрощує і здешевлює процес, а по-друге, дозволяє обійти механізми регуляторного контролю (цільової продукт триптофан інгібує антранілатсинтазу). У присутності мінімальних, які не викликають регуляторних ефектів, кількостей природних амінокислот мутанти *Candida utilis* переводить вводиться в культуральне середовище антранілову кислоту в L-триптофан [11].

Початковою сировиною в мікробіологічному виробництві триптофану може служити також синтетичний індол. Процес залежить від активності триптофан-інтази і доступності серину.

В організмах тварин L-триптофан піддається складним перетворенням, утворюючи низку життєво важливих сполук: із продуктів його розпаду в ссавців утворюється нікотинова кислота і серотонін, у комах – пігменти очей, у рослин – гетероауксин, індикан та низку алкалоїдів.

Триптофан регулює функцію ендокринної системи, що попереджає анемію, регулює кров'яний тиск, відповідає за синтез гемоглобіну. Споживання триптофану змушує гіпофіз виробляти більшу кількість гормону росту. Припускають, що ця амінокислота стимулює секрецію інсуліну, що у свою чергу активує синтез жирних кислот у печінці [8, 10].

Особливе значення ця амінокислота має у фармакології, де вона та її похідні застосовуються як інгредієнти багатьох лікарських препаратів. При таких захворюваннях, як рак, туберкульоз та діабет триптофан сприяє нормальному функціонуванню різних систем організму. Нестача його веде до розвитку пелагри, погіршення стану зубів, помутніння рогівки ока, катаракти. Під час вагітності підвищується необхідність жіночого організму у таких амінокислотах як триптофан і лізин, а для немовлят – триптофан та ізолейцин.

Триптофан, як попередник серотоніну, має антидепресантну дію на організм. Сприяє зняттю гіперактивності та нав'язливих станів у дітей, тривожності перед менструацією у жінок, фіброміалгії і синдрому хронічної втоми. Як попередник мелатоніну, сприяє хорошему засинанню і нормальному сну як у ранньому, так і у літньому віці [11-12].

Триптофан бере участь у виправленні помилок процесу подвоєння ДНК. Разом з лізином вони утворюють трипептид лізин-триптофан-лізин, який виправляє помилки, що виникають при подвоєнні ДНК. Ця властивість триптофану має першорядне значення під час вагітності та для запобігання утворення ракових клітин [12].

## РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Селекція штамів мікроорганізмів для продуцентів ароматичних амінокислот – триптофану, а також фенілаланіну та тирозину в останні роки знайшли широке практичне застосування у виробництві амінокислот [13].

У бактерій і багатьох інших організмів амінокислота триптофан утворюється з еритрозо-фосфату і фосфоенолпірвіноградної кислот через ряд послідовних реакцій, що включають утворення шикимової і хоризмової кислот, а безпосереднім попередником триптофану в процесі його синтезу є антранілова кислота. Синтез триптофану аллостерично інгібується кінцевими продуктами, які діють на ферменти, що каталізують початкові етапи перетворень, пов'язані з утворенням хоризмової кислоти. Для зсуву метаболічних реакцій по шляху переважного утворення триптофану необхідно блокувати перетворення хоризмової кислоти на префенову [14].

Для селекції по виділенню мутантів – продуцентів ароматичних амінокислот – використовуються представники чотирьох сімейств: *C. utilis*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* і *E. coli*. Для цих мікроорганізмів регуляція загальної частини шляху зосереджена на першому ферменті – 7-фосфатсинтетазі (ДАГФ), однак механізми регуляції активності цього ферменту відрізняються [13-15].

Фірма Куова Накко для отримання триптофану використовувала бактерії *C. glutamicum* BPS-1351. Ними було отримано 7 ауксотрофних мутантів, здатних накопичувати триптофан до 0,15 г/л і залежних по фенілаланіну і тирозину. Найбільш продуктивний штам був відібраний на резистентність до аналогам ароматичних амінокислот.

					НУХТ БТЕК 04.02.26. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шульга М.О.			РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір. Консультант		Сулейко Т.Л.					11	88
Н.Контр.					Кафедра БТМ			
Затвердив		Стабніков В.П.						

На перших чотирьох етапах використовували аналоги триптофану, в результаті чого було отримано штам, який дає 4,9 г/л. Потім використовували аналоги природних амінокислот і отримали штам *C. glutamicum* BPS-13 з продуктивністю триптофану до 20 г/л [13-15].

У *E. coli* SV164 (pGH5) і *B. subtilis* триптофанового гени об'єднані в оперон і знаходяться під контролем регуляторного *trpR* гена. Цей ген контролює також експресію гена *argH*, що кодує один з ізоферментів ключового ферменту ароматичного шляху - ДАГФ-синтазу. Внаслідок цього синтез триптофану у даних бактерій знаходиться під контролем репресії синтезу ДАГФ-синтази і деякими ароматичними амінокислотами. [16]. Найбільш продуктивний з отриманих таким чином продуцентів накопичував до 6,2 г/л триптофану.

Вчені Масато Ікеда та Рьойчі Кацумата взяли класичний штам *Corynebacterium glutamicum*, що продукує триптофан та значно вдосконалили як за допомогою плазмідно-опосередкованої ампліфікації генів ферментів, що обмежують швидкість, у кінцевих шляхах, так і шляхом побудови системи стабілізації плазміди, щоб він продукував більше триптофану. Цей розроблений штам, KY9218, що несе рKW9901, продукував до 58 г триптофану на літр через 80 год при періодичному культивуванні.

Успішно застосовувана в селекційній роботі культура *B. subtilis* IFBG M1 також має одну ДАГФ, синтез якої репресується тирозином і фенілаланіном, а активність інгібується хоризмовою і префеновою кислотами. Така складна система регуляції припускає при виділенні продуцента триптофану введення множинних мутацій, що приводять до дерепресії ДАГФ, десенсибілізації АС до інгібування триптофаном, дерепресії ферментів триптофанового оперона, десенсибілізації префенатдегідратази (ПДТ) фенілаланіном [16].

Біосинтез спороносних штамів мутантів бактерій *B. subtilis* IFBG M1 здійснюється за допомогою одноступінчастого способу, що синтезують до 10 г триптофану в 1 л культуральної рідини.

Зважаючи на різноманіття існуючих штамів, актуальним завданням на сьогодні залишається пошук найбільш ефективніших та економічно вигідних способів отримання триптофану. Для вибору біологічного агента для даного курсової роботи візьмемо для порівняння чотири штами *C. utilis* 295-t та *E. coli* SV164 (pGH5), *B. subtilis* IFBG M1 та *C. glutamicum* BPS-13, технологічна характеристика яких наведена у табл. 2.1. [14-16].

Таблиця 2.1

**Технологічна характеристика біосинтезу продуцентів триптофану**

Біологічний агент	Компоненти ПС	Трив-сть культу-вання, год	Концентр ація, г/л	Умови культивування	Література
<i>Bacillus subtilis</i> IFBG M1	Сахароза - 100 Кукурудзяний екстракт - 20 Сечовина - 5 MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O - 1 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 0,6 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .1,4 NaCl - 0,5 Піногасник - 1	48	10 г/л	Культивування у ферментері (рН-7,0±0,2, 37±2°C - 48 год)	Пат. № RU2111247C1 РФ, способ получения штамма микроорганизма, способ продуцирования триптофана/ Л. Гюнтер Вих[DE], Вальфред Ляйнфельдер[DE], Кейт Бэкман[US]– Оpubл. 20.05.1998.
<i>Candida utilis</i> 295-t	Меляса - 104 Сечовини - 5 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 0,1 MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O - 0,5 CaCl <sub>2</sub> - 0,1 Піногасник - 1	120	6 г/л	Культивування у ферментері (рН -7,5-8,0; 37±2°C-120 год)	<i>L B Lobyreva, E L Ruban</i> Effect of cysteine on the tryptophan synthetase activity of <i>Candida utilis</i> 295t// Mikrobiologiya. – 1971. – V. 40– P. 596-598.
<i>Corynebacterium glutamicum</i> BPS-13	сахароза – 63, кукурудзяний екстракт – 66, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,2, MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O– 1,7, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 17, FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 13 мг/л, MnSO <sub>4</sub> ×6H <sub>2</sub> O – 13 мг/л, CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O – 6 мг/л, тирозин – 310 мг/л, фенілаланін – 650 мг/л, біотин – 230 мг/л, тіамін – 450 мг/л	72	20 г/л	Культивування у ферментері (рН – 7,2 30 ±2°C – 72год)	Пат. № US5563052A USA Process for producing L-tryptophan/ Ryoichi KatsumataMasato Ikeda – Оpubл. 1996-10-08.
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KY9218	сахароза – 63, кукурудзяний екстракт – 66, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,2, MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O– 1,7, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 17, FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 13 мг/л, MnSO <sub>4</sub> ×6H <sub>2</sub> O – 13 мг/л, CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O – 6 мг/л, тирозин – 310 мг/л, фенілаланін – 650 мг/л, біотин – 230 мг/л, тіамін – 450 мг/л	80	58 г/л	Культивування у ферментері (рН – 7,2 30 ±2°C – 80 год)	M Ikeda, R Katsumata Hyperproduction of tryptophan by <i>Corynebacterium glutamicum</i> with the modified pentose phosphate pathway // APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. – 1999. – V. 65– P. 2497–2502
<i>Escherichia coli</i> SV164 (pGH5)	Глюкоза - 40 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 6, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 0,1, MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O - 1,0 FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O - 0,01 MnSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O - 0,01 Тіамін HCl - 0.0002 г/л дріжджовий екстракт - 2,0 Тирозин - 0.125 г/л, CaCO <sub>3</sub> - 20,0	48	6,2 г/л.	Ферментація в пробірках 20x200мм (рН – 7,2 37 ±2°C - 48 год)	Пат. № RU2111247C1 РФ, способ получения штамма микроорганизма, способ продуцирования триптофана/ Л. Гюнтер Вих[DE], Вальфред Ляйнфельдер[DE], Кейт Бэкман[US]– Оpubл. 20.05.1998.

Показники, наведені у табл. 2.1, свідчать, що приблизно однакову кількість амінокислоти синтезують штам *C. utilis* 295-t та *E. coli* SV164 (pGH5), але меншу ніж у *B. subtilis* IFBG M1 та *C. glutamicum* BPS-13, продуцент *C. glutamicum* KY9218 синтезує найбільшу кількість, однак умови культивування біологічних агентів, як і склад поживних середовищ є різними. Відповідно, на наступному етапі вибору продуцента розраховуємо вартість поживних середовищ для культивування вибраних мікроорганізмів [15-17].

Таблиця 2.2

**Вартість ПС для культивування продуцентів триптофану**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента грн./кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2)
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus subtilis</i> I FBG M1	Сахароза	100	22	2,2	1
	Кукурудзяний екстракт	20	25	0,5	1
	Сечовина	5	39	0,195	1
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	1	11	0,011	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6	49	0,0294	2
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,45	90	0,1305	2
	NaCl	0,5	3,84	0,00192	1
		Вартість 1 л середовища <b>3,06 грн</b>			
<i>Candida utilis</i> 295-t	Меляса	104	18	1,872	1
	Сечовина	50	39	1,95	1
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	90	0,009	2
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,55	11	0,00605	1
	CaCl <sub>2</sub>	0,1	9,05	0,000905	1
		Вартість 1 л середовища <b>3,83 грн</b>			
<i>Corynebacterium glutamicum</i> BPS-1	сахароза .	63 г\л	22	1,38	1
	кукурудзяний екстракт	66 г\л	25	1,65	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 г\л	49	0,098	1
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 г\л	90	0,108	1
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,7 г\л	11	0,0187	1
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KY9218	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17 г\л	16	0,272	1
	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	13 мг\л	35	0,000455	2
	MnSO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O	13 мг\л	29	0,000377	1
	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	6 мг\л	67	0,000402	1
	тирозин	310 мг\л	1358	0,42098	2
	фенілаланін	650 мг\л	750	0,4875	1
	біотин	230 мг\л	900	0,207	2
	тіамін	450 мг\л	1950	0,8775	1
		Вартість 1 л середовища <b>5,52 грн</b>			

Закінчення табл 2.2

1	2	3	4	5	6
<i>Escherichia coli</i> SV164 (pGH5)	Глюкоза	40,0	23,8	0,952	1
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0	16	0,096	1
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	90	0,009	2
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	1,0	11	0,011	1
	FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,01	26	0,00026	2
	MnSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0,01	19	0,00019	1
	Тіамін HCl	0,002	1950	0,0039	1
	дріжджовий екстракт	2	1100	2,2	2
	Тирозин	0,125	1 596	0,0001995	1
	CaCO <sub>3</sub>	20,0	22	0,44	1
		Вартість 1 л середовища <b>3,91 грн</b>			

Примітка\*- Ціни наведено на січень 2021р. 1- <https://flagma.ua/uk/> , 2- <https://prom.ua/ua/> .

Виходячи з проаналізованих даних, наведених у табл. 2.2, розглянуті середовища є відносно дешевими, але середовище для культивування *C. utilis* 295-t є дешевшим за середовище *C. glutamicum* BPS-13 та *C. glutamicum* KY9218 та відносно до інших штамів. Однак процес біосинтезу *C. utilis* 295-t є довший, ніж в штаму *C. glutamicum* BPS-13 та *C. glutamicum* KY9218, який синтезував найбільшу кількість триптофану за середню тривалість культивування.

Для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розраховуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл.2.3).

Таблиця 2.3

## Умовна вартість 1 г триптофану

Біологічний агент	Концентрація г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених триптофану за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн./л	Умовна вартість 1 г продукту, грн./г
<i>Bacillus subtilis</i> IFBG M1	10	48	0,2	3,06	0,306
<i>Candida utilis</i> 295-t	6	120	0,05	3,83	0,638
<i>Corynebacterium glutamicum</i> BPS-13	20	72	0,28	5,52	0,27
<i>Escherichia coli</i> SV164 (pGH5)	6,2	48	0,129	3,91	0,63
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KY9218	58	80	0,725	5,52	0,1

Дані, наведені у табл.2.3, свідчать, що умовна вартість триптофану, синтезованого штамом *C. glutamicum* KY9218, є найнижчою (0,1 грн./г) серед решти розглянутих штамів, тому, можна вважати, що мета вибрати найбільш

ефективнішого продуцента була виконана, тому для подальшого виконання курсової роботи зупинимось на виборі *C. glutamicum* KY9218 [12-14].

## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища для вирощування *C.*

### *glutamicum* KY9218 – продуцента триптофану

Тривалість культивування 80 год, концентрація триптофану становить 58 мг/л, а концентрація біомаси – 25 г/л.

*Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення*

*Потреби для синтезу триптофану.* Як джерело вуглецю для одержання триптофану використовується сахароза, а вона 100% вуглевод.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 58 г триптофану. Молекулярна маса триптофану  $C_{11}H_{12}N_2O_2$  становить 204. Отже, у 204 г триптофану 132 г вуглецю, а в 58 г триптофану  $(132 \times 58) / 204 = 37,5$  г вуглецю.

Далі розраховуємо, у скількох грамах вуглеводів міститься 37,5 г вуглецю, враховуючи, що вміст вуглецю у сахарозі (342 молекулярна маса) становить  $(342 \times 37,5) / 144 = 89$  г вуглеводів.

Отже, для одержання 37,5 г триптофану, вміст сахарози у середовищі має бути 89 г. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на сахарозі близько 40% субстрату окислюється до  $CO_2$  для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст сахарози в середовищі становитиме  $(89 \times 0,4) + 89 = 125$  г/л.

*Потреби для синтезу біомаси.* У біомасі міститься 50 % вуглецю, отже вміст вуглецю у 25 г біомаси становить  $25 \times 0,5 = 12,5$  г. Ця кількість вуглецю міститься 29,4 г/л сахарози (342 молекулярна маса)  $(342 \times 12,5) / 144 = 29,6$  г вуглеводів.

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 25 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(29,4 \times 0,4) + 29,4 = 41,2$  г/л сахарози

Отже, загальний вміст сахарози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (25 г/л) та триптофану (58 г/л), становить  $41,2 + 125 = 166,2$  г/л.

Потрібно мати на увазі, що така кількість субстрату (166,2 г/л) не може бути внесена у середовище одразу, початкова концентрація сахарози у середовищі буде становити, тобто 66,2 г/л сахарози, а решта субстрату (100 г/л) вноситься у процесі культивування порціями – дробно (так зване підживлення). Розрахунок кількості порцій підживлення та склад підживлювального розчину наведений нижче.

*Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.*

*Потреби для синтезу біомаси.* Припустимо, що у біомасі міститься 10% азоту. Таким чином, у 25 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 2,5 г.

Для одержання триптофану в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело мінерального азоту сульфат амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та кукурудзяний екстракт.

Розраховуємо кількість сульфату амонію, необхідну для одержання 25 г/л біомаси. Молекулярна маса  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  становить 132. Отже у 132 г сульфату амонію міститься 28 г азоту (N), а в середовище ми вносимо 17 г солі, це азоту  $(28 \times 17) / 132 = 3,6$  г, тоді як нам потрібно 2,5 г азоту. По факту потрібно  $(17 \times 2,5) / 3,6 = 12$  г солі

*Потреби для синтезу триптофану.* Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й триптофану. Розраховуємо вміст  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  у середовищі, необхідний для одержання 58 г/л триптофану. 19

Молекулярна маса триптофану становить 204. У 204 г триптофану міститься 28 г Нітрогену (N), тоді у 58 г триптофану вміст Нітрогену становить  $(58 \times 28) / 204 = 8$  г.

Далі розраховуємо, в якій кількості  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  міститься ці кількість Нітрогену. У 132 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 8 г Нітрогену буде міститись у  $(132 \times 8) / 28 = 38$  г солі.

Для одержання 58 г/л триптофану вміст сульфату амонію в середовищі повинен становити  $38 + 12 \text{ г/л} = 50 \text{ г/л}$ .

Слід мати на увазі, що така концентрація солі не може бути внесена у

середовище одразу. Як правило, початкова концентрація джерела мінерального азоту у середовищі культивування продуцента триптофану становить 2–3 % (20–30 г/л). Решта вноситься у вигляді підживлювального розчину разом з мелясою (сахарозно-сольове підживлення).

Наведені вище розрахунки щодо складу поживного середовища можна подати у вигляді таблиці 2.4.

Таблиця 2.4.

#### Уточнений склад ПС для культивування продуцента триптофану

Компонент поживного середовища	Концентрація згідно літературних даних , г/л (мг/л)	Концентрація згідно перерахунку, г/л (мг/л)	Дробне підживлення, г/л
сахароза	63	<b>166,2 з них-</b>	<b>100</b>
кукурудзяний екстракт	66	66	X
тирозин	310 мг/л	310 мг/л	
фенілаланін	650 мг/л	650 мг/л	
біотин	230 мкг/л	230 мкг/л	
тіамін	450 мкг/л	450 мкг/л	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	2	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2	1,2	
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,7	1,7	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17	<b>50 з них-</b>	
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	13 мг/л	13 мг/л	X
MnSO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O	13 мг/л	13 мг/л	
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	6 мг/л	6 мг/л	

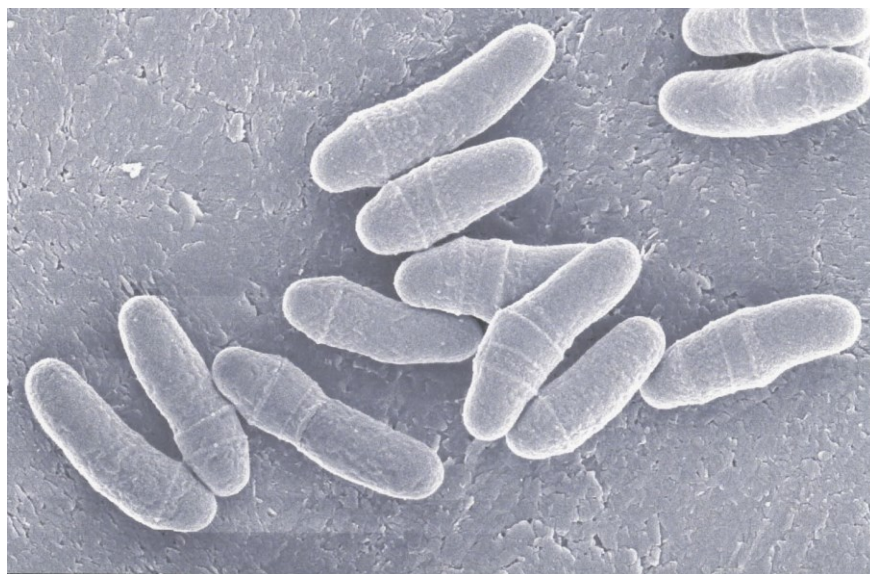
#### Розрахунок складу сахарозно-сольового підживлювального розчину

У вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести у процесі культивування продуцента триптофану 100 г/л сахарози та 30 г/л сульфату амонію (див. попередні розрахунки). Тривалість культивування становить 80 год. Прийmemo, що підживлення додається у середовище кожні 8 год. Тоді кількість порцій підживлення становить  $(80-8) / 8 = 9$ . Отже, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситься  $100 / 9 = 11,1$  г/л сахарози і  $30 / 9 = 3,3$  г/л сульфату амонію.

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

*Corynebacterium glutamicum* KY9218 - це бактерія, яка має паличкоподібну форму, вона має вигляд прямої або злегка вигнутої палички,

грампозитивна, розмір клітин не перевищує 2-3 мкм, необов'язкова анаеробна форма і присутня в ґрунті, воді, повітрі. Вона не утворює спор і не є патогенним, здатна до розгалуження (рис.2.1).



**Рис.2.1.**Зображення з електронного мікроскопа  
*Corynebacterium glutamicum* KY9218 [17]

У мазках, як правило, розташовуються поодинокі або у парах, ці мікроорганізми є нерухливі, клітинна стінка на 70% складається з пептидоглікану. Як і для інших грампозитивних бактерій для *C. glutamicum* характерна навніть тейхоєвих кислот. Цитоплазматична мембрана являє собою подвійний шар білків з зануреними у неї інтегральними білками. Периферійні білки розміщені на поверхні мембрани. Мезосоми розвинуті добре [18,19,20].

На м'ясо-пептонному агарі (МПА) через 3 доби після висіву, *C. glutamicum* утворює блискучі, жовтого кольору, з рівним краєм колонії, поверхні гладкі, діаметр яких не перевищує 5 мм. При рості на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) спостерігається рівномірне помутніння середовища(рис 3.2) У певних умовах середовища можуть накопичуватися речовини, які можуть розглядатися як запасні - полісахариди, жири, поліфосфати та сірка.



**Рис.2.2.** Колоні *C. glutamicum* на МПА [21]

*Corynebacterium glutamicum* KY9218 є - це факультативно-анаеробна бактерія, оскільки може рости в анаеробних умовах тільки в присутності таких термінальних акцепторів електронів, як нітрати, але високою клітинної щільності досягає тільки при культивуванні в аеробних умовах. Ростуть і розмножуються при температурі 24 - 40°C. Оптимальною температурою культивування є 30°C, це пояснюється тим, що даний мікроорганізм є мезофілом. Енергія отримується при перенесенні електронів по дихальному ланцюгу. За типом живлення *C. glutamicum* KY9218 є хемоорганотрофом. Ростовим субстратом для них є органічні речовини, адже вони для них являються джерелом вуглецю, електронів та енергії [22].

По відношенню до рН середовища вони являються нейтрофілами ( рН від 6 до 8,5 ), причому при зниженні кислотності середовища у них відразу спостерігається припинення росту, а при подальшому зниженні рН *C. glutamicum* KY9218 гинуть. Добре росте на глюкозі, сахарози, мальтози, фруктози, манозі, етанолі, оцтової кислоти. Не зростає на ксилозі, арабінозі, лактозі, раффінозі.

Розмноження. Для *C. glutamicum* KY9218 характерний бінарний поділ клітини навпіл. Також *C. glutamicum* KY9218 спостерігається і статеве розмноження. Статеве розмноження бактерій відрізняється від статевого

розмноження еукаріот тим, що у бактерій не утворюються гамети і не відбувається злиття кліток.

*C. glutamicum* KY9218 має кругову та плазмідну хромосому, що складається з 3 314 179 нуклеотидів. Цей геном походить від дикого типу *C. glutamicum* штаму KY9218. *C. glutamicum* KY9218. також містить одну спіральну плазмиду KY9218, pCGR1, яка містить 49 120 нуклеотидів. Може розщеплювати вуглеводи в процесі бродіння, яке може сприймати вуглець з різних джерел, таких як деякі ароматичні сполуки. За структурою клітинна стінка *C. glutamicum* KY9218 є унікальною. Окрім шару пептидоглікану, клітинна стінка складається з коротколанцюгових міколевих кислот, а також кількох інших жирів. За допомогою метаболізму *C. glutamicum* синтезує такі продукти, як серин, глутамат та лізин (амінокислота).

Штам несе мутацію стійкості до аналогу лізину S- (2-аміноетил) -L-цистеїну (АЕЦ) і мутацію стійкості до антибіотика стрептоміцину [23,24].

#### **2.4. Таксономічний статус біологічного агента**

Рід *Corynebacterium* був описаний у 1896 р. Lehmann і Neumann, до нього належать 75 видів морфологічно подібних споріднених мікроорганізмів. *C. glutamicum* вперше був виявлений як продуцент глутамату. Ще в 1950-х роках були виділені штами, що накопичують глутамат у живильному середовищі. Один з них, M534, раніше таксономічно названий “*Micrococcus glutamicus*” і депонований як АТСС 13032 та NCIMB 10025, був позначений як штам типу *C. glutamicum* [25].

Систематика *C. glutamicum* згідно з дев'ятим виданням керівництва Бергі з систематики бактерій *C. glutamicum* відноситься до відділу *Firmicutes*, класу *Thallobacneria*, роду *Corynebacterium*. Але у 80-х роках була складена філогенетична класифікація на основі аналізу 16S р-РНК [26].

Філогенетичній класифікації у *C. glutamicum*[26,28].

Надцарство: Procaryota

Царство: Bacteria

Відділ: Actinobacteria Cavalier-Smith  
Клас: Actinobacteria Stackebrandt et al  
Підклас: Actinobacteria Stackebrandt et al  
Порядок: Actinomycetales Buchanan (актиноміцети)  
Підпорядок: Corynebacterineae Stackebrandt et al.  
Родина: Corynebacteriaceae Lehmann et Neumann  
Рід: Corynebacteriaceae Lehmann et Neumann  
Вид: Corynebacterium glutamicum Abe et al.

## РОЗДІЛ 3 . ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1.Потреба у цільовому продукті

Сучасний розвиток тваринництва за останні десятиріччя вніс суттєві зміни у технологію виробництва свинини. Тенденції, які відмічаються у годівлі свиней, стосуються як розробки ефективних рецептів комбикормів, так і вдосконалення систем нормування живлення і оцінки поживності кормів. Ці зміни обумовлені впровадженням нових перспективних в економічному відношенні технологій виробництва свинини та суттєвим зростанням вимог до якості і безпеки продуктів харчування для здоров'я людини. Результати досліджень, проведених на свинях, свідчать про те, що найважливішим фактором підвищення продуктивності свинини є їх раціональна і збалансована годівля. Організм свиней вимагає оптимального надходження усіх необхідних поживних, мінеральних і біологічно активних речовин у легкодоступному вигляді [29].

На рівень м'ясної продуктивності, харчову і біологічну цінність продуктів тваринництва особливо суттєво впливає повноцінність та збалансованість протеїнового живлення. Потреба свиней у протеїні залежить від умов утримання, сезону року, типу раціону, калорійності кормів, віку, фізіологічного стану, породи, лінії та стресового стану, а кількісне споживання перебуває у прямій залежності від його вмісту в раціоні. Інтенсивність синтезу білків органів і тканин свиней знаходиться у прямій залежності від надходження повноцінного протеїну з кормом. При згодовуванні тваринам неповноцінних білків, особливо за нестачі у кормі, лізину, триптофану, метіоніну, аргініну, ізолейцину, лейцину, валіну, фенілаланіну і тирозину, порушується обмін речовин, сповільнюється ріст, різко знижується продуктивність, спостерігається погіршення набору маси [30].

					НУХТ БТЕК 04.02.26. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шульга М.О.			<i>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					23	88
Консультант						Кафедра БТМ <sup>23</sup>		
Н.Контр.								
Затвердив		Стабніков В.П.						

Про роль амінокислот в харчуванні свиней існує великий обсяг матеріалу, особливо щодо ефективності застосування добавок лізину, метіоніну, треоніну. В даному випадку докладно розглядається необхідність використання триптофану. Триптофан, подібно лізину, треоніну і метіоніну є незамінною критичної амінокислотою, яка не може синтезуватися в організмі тварини і тому повинна обов'язково надходити з кормом. Зростаючі тварини потребують триптофану для синтезу білка, а також для різних обмінних процесів. Триптофан залучений в різні метаболічні перетворення, бере участь в обміні нуклеїнових кислот, бере участь в синтезі нікотинаміду, гемоглобіну і утворення пігменту очей, покращує секрецію харчових ферментів [32].

Через гормони серотонін і тріптомін є попередником NAD. Крім того, L-триптофан регулює функцію ендокринного апарату, що попереджає анемію і регулює кров'яний тиск. Припускають, що ця амінокислота стимулює секрецію інсуліну, який в свою чергу активізує синтез жирних кислот в печінці. Одним з найбільш корисних властивостей триптофану при вирощуванні свиней є стимуляція апетиту. Разом з тим встановлено вплив триптофану на зростання тваринного і споживання корму.

Нестача триптофану в раціоні свиней призводить до погіршення апетиту, зниження швидкості росту, анемії, огрубіння і випадання волосяного покриву, викликає ожиріння печінки, розлад статевої системи, загибель ембріонів, підвищує збудливість нервової системи.

У результаті багаторічних досліджень доцільність використання у годівлі свиней повнораціонних комбікормів, збагачених препаратами незамінних амінокислот до меж, що забезпечують потребу в них. Доведено, що за важливістю рівень незамінних амінокислот у раціонах свиней є первинним, а рівень протеїну – вторинним [35-38].

На сьогодні найбільш популярним методом вирощування свиней є інтенсивна технологія виробництва свинини, суть полягає в наступному: поросят-сисунів вирощують із свиноматкою до 27 – 30-добового віку із подальшим поступовим переведенням у виробничу групу поросят 45 – 65-

добового віку із живою масою 13–20 кг та на годівлю спеціальними комбікормами, до складу яких обов'язково включають триптофан та інші незамінні амінокислоти [36, 39].

В 1 кг комбікорму СК-16 для поросят у віці 45 – 65 діб має міститися: обмінної енергії – не менше 11 МДж; сирого протеїну –180 г; лізину – 9 г; метіонін+цистину – 6 г, триптофану – 4 г; сирі клітковини –не більше 45 г; кухонної солі –9 г; кальцію – 11–13 г; фосфору –8–10 г [35-39].

Оскільки триптофан входить в різні найменування комбікормів, які мають дуже велику потребу у даних продуктах та різні господарства використовують різні технології відгодівлі та комбікорми, тому для розрахунку потреби виробництва будемо аналізувати найбільші за поголів'ям свиноферми України, серед них слід відзначити 5 найбільших: ТОВ «Агропромисловий комплекс Насташка», ТЗОВ «Еко Міт», ПП «Сігма», ПП «Колос», ТОВ «Чорнобайм'ясо». Згідно даних відкритого порталу <https://kurkul.com/> у даних підприємствах налічується 48700 голів молодих поросят у рік, у віці 45–65 діб.

Згідно інструкції по використанню комбікорму СК-16, витрати корму становлять 0,75 кг на голову в день до загального прикорму, тривалість годування даним комбікормом 30 днів.

З цього слідує, що на одне порося на курс відгодівлі потрібно:

$$0,75 \text{ кг} * 30 \text{ днів} = 22,5 \text{ кг комбікорму}$$

Враховуючи, що на 5-ти найбільших господарствах України на рік 48700 голів поросят, тому на весь курс відгодівлі потрібно:

$$22,5 \text{ кг комбікорму} * 48700 \text{ голів} = 1\,462\,221 \text{ кг комбікорму /курс відгодівлі.}$$

Отже, враховуючи, що в 1 кг комбікорму міститься 4 г триптофану, розрахуємо річну потребу в даній амінокислоті:

$$1 \text{ кг} - 0,004 \text{ кг триптофану}$$

$$1\,462\,221 - X \text{ триптофану.}$$

$$X = 5849 \text{ кг триптофану на рік.}$$

Узагальнена таблиця щодо вихідних даних для розрахунку річної потреби

триптофану наведена нижче.

Таблиця 3.1.

### Вихідні дані для розрахунку річної потреби триптофану

Назва ферми	Загальна кількість свиней, шт	Кількість молодих поросят у віці 45–65 діб, шт	Витрати корму на день, кг	Тривалість годування СК-16, днів	Річна потреба в комбікормі, кг	Загальна річна потреба в триптофані, кг
ТОВ «АПК Насташка»,	47068	18827,2	14120,4	30	423612	5849
ТзОВ «Еко Міт»,	17700	7080	5310		159300	
ПП «Сігма»,	31149	12459,6	9344,7		280341	
ПП «Колос»,	34417	13766,8	10325,1		309752	
ТОВ «Чорнобайм'ясо»	32135	12854	9640,5		289215	
Всього	162469	64987,6	48740,7		1462221	

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва та об'єму ферментера

З попереднього розрахунку бачимо, що для виробництва комбікорму для рекомендованого курсу відгодівлі свиней на 5-ти найбільших господарствах потрібно 5849 кг триптофану.

Відомо, що продуктивність *Corynebacterium glutamicum* KY9218 становить 57 г/л триптофану, виходячи з цього можна розрахувати скільки культуральної рідини потрібно для синтезу триптофану [4].

Застосувавши формулу можна знайти необхідний об'єм культуральної рідини:  $(5849 \text{ кг}) / 0,057 = 102\ 614 \text{ л}$ .

Враховуючи 20 % витрат культуральної рідини при виділенні продукту, загальний її об'єм повинен становити:  $(102\ 614 + 20\%) = 123\ 137 \text{ л}$ . Для зручності розрахунків візьмемо 124 000 л КР.

Розрахуємо кількість циклів виробництва та об'єм необхідного ферментера: час культивування продуцента становить 80 год, тобто 3 доби. Враховуємо також ще підготовку ферментера (мийка та огляд – 2 год, перевірка на герметичність – 1 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, вивантаження культуральної рідини – 1,5). Тобто загальний час виробничого біосинтезу становитиме 90 год.

Культивуватимемо 120 діб, тобто кількість циклів

$$N_{\text{циклів}} = (120 \times 24) / 90 = 32 \text{ циклів.}$$

На один цикл кількість культуральної рідини становить : $124\ 000/32 = 3875$  л ( $3,87\ \text{м}^3$ ) культуральної рідини. Прийmemo за  $3,9\ \text{м}^3$ . Враховуючи коефіцієнт заповнення  $0,65$  – об'єм ферментера відповідає  $6,3\ \text{м}^3$ .

Отже, згідно з розрахунку враховуючи всі витрати необхідно виготовляти  $3,9\ \text{м}^3$  культуральної рідини. Для цього доцільно використовувати 32 цикла на рік враховуючи час, що необхідний для ферментації та час на підготовку обладнання для ферментації. Тому, для культивування обрано ферментер на  $6,3\ \text{м}^3$  з коефіцієнтом заповнення  $= 0,6$ .

### 3.3. Розрахунок та вибір кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Синтез триптофану здійснюється у ферментері об'ємом  $6,3\ \text{м}^3$  з коефіцієнтом заповнення  $0,6$ .

Робочий об'єм ферментера ( $V_{\text{роб}}$ ) визначають за формулою:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{г.ф.}} \times K_{\text{зап}}$$

де:  $V_{\text{г.ф.}}$  - геометричний об'єм ферментера;  $K_{\text{зап}}$  - коефіцієнт заповнення,  $0,6$ .

$$V_{\text{роб}} = 6,3 \times 0,6 = 3,78\ \text{м}^3.$$

Визначаємо кількість стадій підготовки посівного матеріалу, для приготування  $3,78\ \text{м}^3$  культуральної рідини. Кількість посівного матеріалу становить близько  $10\ \%$  від загального об'єму поживного середовища [33].

Щоб приготувати  $3,78\ \text{м}^3$  культуральної рідини, потрібно:

$$3,78 \times 0,1 = 0,378\ \text{м}^3\ (378\ \text{л})\ \text{посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна приготувати у ферментері, об'ємом:  $V_{\text{роб}} = 0,63\ \text{м}^3$ , такий об'єм є стандартним для ферментера.

Для приготування  $378\ \text{л}$  культуральної рідини, нам потрібно:

$$378 \times 0,1 = 37,8\ \text{л}\ \text{посівного матеріалу.}$$

Цю кількість посівного матеріалу можна отримати у посівному апараті, об'ємом:  $V_{\text{роб}} = 0,05\ \text{м}^3$ .  $60\ \text{л}$  – це є стандартний об'єм посівного апарату.

Для приготування  $37,8\ \text{л}$  культуральної рідини, нам потрібно:

$$37,8 \times 0,1 = 3,78\ \text{л}\ \text{посівного матеріалу.}$$

Цю кількість посівного матеріалу можна отримати у посівному апараті,

об'ємом:  $V_{\text{роб}} = 0,005 \text{ м}^3 \cdot 5 \text{ л}$  – це є стандартний об'єм посівного апарату.

Щоб приготувати 3,78 л культуральної рідини, потрібно:

$$3,78 \times 0,1 = 0,378 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати під час культивування *C. glutamicum* KY9218 в 3-х колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл, при об'ємі поживного середовища 125 мл.

Для зручності висновки стосовно кількості стадій і об'ємів підготовки посівного матеріалу представимо у вигляді табл. 3.2:

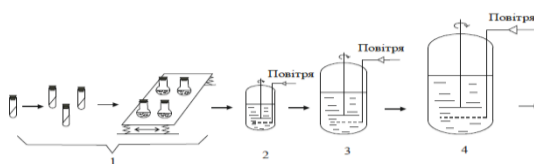
Таблиця 3.2.

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

Об'єм ферментера, м <sup>3</sup>	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, м <sup>3</sup>	Об'єм посівного матеріалу (10%), м <sup>3</sup>	Конденсат (10%), м <sup>3</sup>	Об'єм підготовки поживного середовища, м <sup>3</sup>
6,3	0,6	3,78	0,378	0,378	3,024
0,63	0,6	0,378	0,0378	0,0378	0,3024
0,06 (60 л)	0,63	0,0378 (37,8 л)	0,00378 (3,78 л)	0,00378 (3,78 л)	0,03024 (30,24 л)
0,005 (5 л)	0,75	0,00378 (3,78 л)	0,00378 (0,378 л)	-*	0,0034 (3,4 л)

\*Конденсат не враховано, оскільки стерилізація композицій поживного середовища відбуватиметься у колбах в автоклаві

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу триптофану у ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи (рис.3.1).



**Рис. 3.1. Схема приготування посівного матеріалу *C. glutamicum*:**

1 – вирощування в лабораторії (на скошеному агарі в пробірках і в колбах на качалці); 2–4 – вирощування в

інокуляторах об'ємом (м<sup>3</sup>): 2 – 0,005; 3 – 0,06; 4 – 0,63.

## РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

### 4.1. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Оскільки для росту продуцента *C. glutamicum* KY9218 необхідний кисень, дуже важливим етапом допоміжних робіт є правильна підготовка аераційного повітря, яке виступає потенційним джерелом контамінації культуральної рідини і відповідно всього виробничого процесу [40].

Оскільки найбільше мікроорганізмів знаходиться над поверхнею землі, то забір повітря будемо здійснювати на висоті приблизно 20-30 м, де їх кількість є сталою. Повітряний компресор засмоктує всередину навколишнє повітря і стискає його для подальшого використання в робочих процесах [41].

Для очистки (стерилізації) повітря, використовують методи фільтрування, а систему підготовки повітря конструюють ступінчастою.

На кожному рівні очищення слід передбачити штуцери з метою відбору проб повітря для визначення концентрації механічних часток до та після фільтрації.

У відповідності з існуючими стандартами фільтрувальні елементи класифікуються на групи і класи залежно від якості фільтрування (ефективності і проникності):

- фільтри грубої очистки;
- фільтри тонкої очистки;
- індивідуальні фільтри.

Повітряні фільтри використовуються для підтримки заданої чистоти повітря, відповідно до технологічних вимог.

					НУХТ БТЕК 04.02.26. КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Шульга М.О.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА			Літ.	Арк.	Аркушів
		Сулейко Т.Л.							29	88
Консультант					Кафедра БТМ <sup>29</sup>					
Н.Контр.										
Затвердив		Стабніков В.П.								

Перевір.

Після забору, повітря потрапляє на фільтр грубої очистки, де досягається ступінь його очищення 80 %. Фільтри грубого очищення застосовуються відразу після забірних решіток повітря та в якості попередньої очистки для систем кондиціонування повітря.

Фільтри грубої очистки можуть мати різну ефективність фільтрації від 65% до 90%, так звана перша ступінь фільтрації. Фільтри грубої очистки призначені для затримки великих механічних частинок розміром більше 5 мкм (пух, листя, волосся, цементний пил і т. ін.). Далі повітря вентилятором подається у теплообмінник, де відбувається його кондиціонування (стабілізуються термодинамічні показники).

Фільтри грубої очистки складаються з каркасу з нержавіючої сталі, в який встановлюється фільтруючий матеріал. На сьогодні у біотехнологічному синтезі активно використовують ячeyкові фільтри грубої очистки (зі ступенем очистки 80%) такі як, ФЯУ, ФЯП, ФЯР, ФЯВ, які відрізняються лише типом фільтруючого матеріалу, а саме: ультраскло, хімволокно, поліуретан, поліестер, мельтблоун або фільтрувальний папір тощо [42-43].

Фільтри для тонкого очищення повітря найбільш часто застосовують в якості другого ступеня очищення (доочищення). Зазвичай при підготовці повітря використовують модульні картриджні фільтри. Це ефективні фільтри, які мають компактну конструкцію і ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 3400 м<sup>3</sup>/год. Перевагами таких фільтрів є :

- безперервне автоматичне очищення фільтруючих картриджів стисненим повітрям;
- подвійна - дублююча один одного система очищення картриджів за допомогою часового таймера і датчика перепаду тиску;
- ефективність очищення до 99% для часток розміром до 0,5 мікрон;
- легкість в обслуговуванні - необхідно тільки спустошувати пилосбірники,

- в конструкції використовуються екологічно чисті матеріали;
- стійка конструкція, стійка до зовнішніх факторів, відмінні аеродинамічні властивості, висока пиломісткість [41].

В якості індивідуальних фільтри застосовують фільтр типу ЛАІК. Такі типи складаються з корпусу і фільтрувального матеріалу, який дає змогу уловлювати частинки розміром 0,04-0,06 мкм. Як фільтрувальний матеріал у ньому використовується ультратонке волокно з перхлоровінілової смоли. Цей матеріал гідрофобний, стійкий до хімічно агресивних середовищ і може експлуатуватися при температурі не вище 60 °С і відносній вологості до 100 %. Ступінь очистки 99,99%. Дані фільтри використовують на фінішних стадіях очистки повітря, тобто безпосередньо перед подачею у ферментаційне обладнання[43].

#### **4.2. Розрахунок складу поживного середовища для вирощування *S.***

##### ***glutamicum* KY9218 – продуцента триптофану**

Тривалість культивування 80 год, концентрація триптофану становить 58 г/л, а концентрація біомаси – 25 г/л.

*Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення*

*Потреби для синтезу триптофану.* Як джерело вуглецю для одержання триптофану використовується сахароза, а вона 100% вуглевод.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 57 г триптофану. Молекулярна маса триптофану  $C_{11}H_{12}N_2O_2$  становить 204. Отже, у 204 г триптофану 132 г вуглецю, а в 57 г триптофану  $(132 \times 57) / 204 = 37$  г вуглецю.

Далі розраховуємо, у скількох грамах вуглеводів міститься 37 г вуглецю, враховуючи, що вміст вуглецю у сахарозі (342 молекулярна маса) становить  $(342 \times 37) / 144 = 88$  г вуглеводів.

Отже, для одержання 37 г триптофану, вміст сахарози у середовищі має бути 89 г. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на сахарозі близько 40% субстрату окислюється до  $CO_2$  для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст сахарози в середовищі

становитиме  $(88 \times 0,4) + 88 = 123$  г/л.

*Потреби для синтезу біомаси.* У біомасі міститься 50 % вуглецю, отже вміст вуглецю у 25 г біомаси становить  $25 \times 0,5 = 12,5$  г. Ця кількість вуглецю міститься 29,4 г/л сахарози (342 молекулярна маса)  $(342 \times 12,5) / 144 = 29,6$  г вуглеводів.

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 25 г/л біомаси у середовище необхідно внести  $(29,4 \times 0,4) + 29,4 = 41,2$  г/л сахарози

Отже, загальний вміст сахарози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (25 г/л) та триптофану (57 г/л), становить  $41,2 + 123 = 164,2$  г/л.

Потрібно мати на увазі, що така кількість субстрату (164,2 г/л) не може бути внесена у середовище одразу, початкова концентрація сахарози у середовищі буде становити, тобто 64,2 г/л сахарози, а решта субстрату (100 г/л) вноситься у процесі культивування порціями – дробно (так зване підживлення). Розрахунок кількості порцій підживлення та склад підживлювального розчину наведений нижче.

*Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.*

*Потреби для синтезу біомаси.* Припустимо, що у біомасі міститься 10% азоту. Таким чином, у 25 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 2,5 г.

Для одержання триптофану в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело мінерального азоту сульфат амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та кукурудзяний екстракт.

Розраховуємо кількість сульфату амонію, необхідну для одержання 25 г/л біомаси. Молекулярна маса  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  становить 132. Отже у 132 г сульфату амонію міститься 28 г азоту (N), а в середовище ми вносимо 17 г солі, це азоту  $(28 \times 17) / 132 = 3,6$  г, тоді як нам потрібно 2,5 г азоту. По факту потрібно  $(17 \times 2,5) / 3,6 = 12$  г солі

*Потреби для синтезу триптофану.* Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а й триптофану. Розраховуємо вміст  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  у середовищі,

необхідний для одержання 57 г/л триптофану

Молекулярна маса триптофану становить 204. У 204 г триптофану міститься 28 г Нітрогену (N), тоді у 58 г триптофану вміст Нітрогену становить  $(57 \times 28) / 204 = 8$  г.

Далі розрахуємо, в якій кількості  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  міститься ці кількість Нітрогену. У 132 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 8 г Нітрогену буде міститись у  $(132 \times 8) / 28 = 38$  г солі.

Для одержання 57 г/л триптофану вміст сульфату амонію в середовищі повинен становити  $38+12\text{г/л} = 50$  г/л.

Слід мати на увазі, що така концентрація солі не може бути внесена у середовище одразу. Як правило, початкова концентрація джерела мінерального азоту у середовищі культивування продуцента триптофану становить 2–3 % (20–30 г/л). Решта вноситься у вигляді підживлювального розчину разом із сахарозою (сахарозно-сольове підживлення).

Наведені вище розрахунки щодо складу поживного середовища можна подати у вигляді таблиці 4.1.

Таблиця 4.1.

#### Уточнений склад ПС для культивування продуцента триптофану

Компонент поживного середовища	Концентрація згідно літературних даних, г/л (мг/л)	Концентрація згідно перерахунку, г/л (мг/л)	Дробне підживлення, г/л
сахароза	64	<b>164,2 з них-</b>	<b>100</b>
кукурудзяний екстракт	66	66	
тирозин	310 мг/л	310 мг/л	
фенілаланін	650 мг/л	650 мг/л	
біотин	230 мкг/л	230 мкг/л	
тіамін	450 мкг/л	450 мкг/л	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	2	
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,2	1,2	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,7	1,7	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	17	<b>50 з них-</b>	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13 мг/л	13 мг/л	
$\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	13 мг/л	13 мг/л	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6 мг/л	6 мг/л	

#### Розрахунок складу сахарозно-сольового підживлювального розчину

У вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести у процесі культивування продуцента триптофану 100 г/л сахарози та 30 г/л сульфату амонію (див. попередні розрахунки). Тривалість культивування становить 80 год. Прийmemo, що підживлення додається у середовище кожні 8 год. Тоді кількість порцій підживлення становить  $(80-8) / 8 = 9$ . Отже, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись  $100 / 9 = 11,1$  г/л сахарози і  $30 / 9 = 3,3$  г/л сульфату амонію.

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

В біотехнології широко використовуються термічні методи знезараження поживних середовищ чи їх окремих компонентів. Спори мікроорганізмів мають терморезистентність в рази більшу в порівнянні з вегетативними формами. Термічні методи стерилізації спрямовані саме на їх максимальне знищення. Окремі компоненти поживних середовищ по-різному реагують на термічну дію [40].

Переваги теплової обробки парою є:

- легке транспортування;
- здатність проникати в важкодоступні вузли стерилізаторів, трубопроводів і апаратури;
- велика тепловіддача при конденсації;
- нетоксичність.

Конденсат водяної пари зволожуючи спори, сприяє збільшенню швидкості їх загибелі в 10 - 1 000 разів.

Метою стерилізації є звільнення поживного середовища від живих мікроорганізмів або їх форм спокою. Стерилізація поживного середовища залежить від фізико-хімічних властивостей його компонентів.

У біотехнологічному виробництві всі операції з приготування поживного середовища відбуваються в спеціалізованому цеху, який обладнаний ємностями для зберігання рідких і твердих речовин, засобами їх

транспортування, апаратами з перемішувачими пристроями для приготування розчинів або суспензій. При цьому хімічні солі, які є компонентами поживних сумішей, зберігаються зазвичай у твердому стані.

При запуску біореактора приготування їх розчинів із заданим співвідношенням компонентів проводиться за наступною схемою. Кожний компонент поживного середовища в необхідній кількості згідно з рецептурою зважують на технічних терезах і окремо розчиняють у воді в спеціальних ємностях, постійно перемішуючи за допомогою мішалок. Приготовані розчини мінеральних солей по черзі вносять у реактор і ретельно перемішують [42].

Головними факторами, які впливають на стабільність поживного середовища, є природа його компонентів, здатність їх взаємодіяти один з одним, температура, рН, освітленість, забезпечення киснем [41].

Для одержання посівного матеріалу, необхідно приготувати і простерилізувати 0,378 л поживного середовища, що має такий склад (г/л): сахароза – 64, кукурудзяний екстракт – 66,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,7,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 17,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 13 мг/л,  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 13 мг/л,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 6 мг/л, тирозин – 310 мг/л, фенілаланін – 650 мг/л, біотин – 230 мкг/л, тіамін – 450 мкг/л.

Враховуючи невеликий об'єм поживного середовища для одержання посівного матеріалу, його необхідно готувати в колбах, а стерилізацію здійснювати в автоклаві.

Враховуючи різні режими та умови стерилізації компонентів поживного середовища, будемо готувати та змішувати речовини умовно розділивши їх на такі композиції:

**Композиція А:** сахарозу та кукурудзяний екстракт будемо готувати разом та тирозин – 310 мг/л, фенілаланін – 650 мг/л, біотин – 230 мкг/л, тіамін – 450 мкг/л., оскільки в композиції присутні біотин і тіамін в малій кількості, то для зручності окремо потрібно готувати запасний розчин для приготування композиції А для вирощування інокуляту в колбах на качалці

та вирощування інокляту в посівному апараті об'ємом 5 л та перед стерилізацією додавати до композиції А. (режим стерилізації: 112 °С, тиск – 0,05 МПа упродовж 30 хв.).

**Композиція Б:** дані солі  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 13 мг/л,  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 13 мг/л,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 6 мг/л оскільки в композиції присутні компоненти в малій кількості, то для зручності окремо потрібно готувати запасний розчин на етапі приготування поживного середовища для колб на качалці і додавати перед стерилізацією у композицію Б, перемішують і стерилізують, режим стерилізації (131 °С, тиск – 0,15 МПа упродовж 40 хв.);

**Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  будем готувати окремо на етапі вирощування інокуляту в колбах на качалках щоб попередити випадіння осаду з солями магнію, режим стерилізації (131 °С, тиск – 0,15 МПа упродовж 40 хв.).

Всі композиції стерилізують в автоклаві в окремих колбах, після закінчення процесу стерилізації всі компоненти поживного середовища охолоджують і зливають в стерильних умовах (в боксі) в одну колбу ( $V_{\text{колб}}=1\text{л}$ ).

### **Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 5л**

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 5 л, необхідно приготувати і простерилізувати 3,4 л поживного середовища. Враховуючи невеликий об'єм поживного середовища для одержання посівного матеріалу, його необхідно готувати в колбах, а стерилізацію здійснювати в автоклаві.

Дане середовище має різні режими та умови стерилізації компонентів поживного середовища, будемо готувати та змішувати речовини умовно розділивши їх на такі композиції:

**Композиція А:** сахарозу та кукурудзяний екстракт будемо готувати разом та тирозин, фенілаланін, біотин, тіамін, оскільки в композиції присутні

біотин і тіамін в малій кількості, то для зручності окремо потрібно готувати запасний розчин для приготування композиції А, і додавати перед стерилізацією у композицію А. (режим стерилізації: 112 °С, тиск – 0,05 МПа упродовж 30 хв.).

**Композиція Б:** дані солі  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  та  $(NH_4)_2 SO_4$  та  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  будемо стерилізувати разом через однаковий режим стерилізації, режим стерилізації (131 °С, тиск – 0,15 МПа упродовж 40 хв.) після стерилізації за допомогою розчину NaOH збільшують значення рН до 7;

**Композиція В:**  $KH_2PO_4$  та  $K_2HPO_4$  будемо готувати окремо на етапі вирощування інокуляту в інокуляторі 5 л щоб попередити випадіння осаду з солями магнію оскільки через малі об'єми стерилізація середовища проводиться в автоклаві, режим стерилізації (131 °С, тиск – 0,15 МПа упродовж 40 хв.).

Всі композиції стерилізують в автоклаві в окремих колбах, після закінчення процесу стерилізації всі компоненти поживного середовища охолоджують і зливають в стерильних умовах (в боксі) в одну колбу ( $V_{\text{колб}}=5$  л).

### **Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60л**

Приготування композицій для поживних середовищ здійснюється у спеціальних реакторах (збірниках), обладнаних мішалками, а стерилізують вже або безпосередньо у збірниках, або у підготовленому ферментері. Для отримання інокуляту *Corynebacterium glutamicum* KY9218, використовують середовище такого складу що й на попередніх етапах.

**Композиція А:** сахарозу та кукурудзяний екстракт, тирозин, фенілаланін, біотин та тіамін, будемо готувати і стерилізувати у збірнику (режим стерилізації: 112 °С, тиск – 0,05 МПа упродовж 30 хв.). Після стерилізації композицію А охолоджують та подають у асептичних умовах безпосередньо у ферментер об'ємом 60 л, де вже міститься простерилізована

композиція Б.

*Композицію Б:*  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  та  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  будемо готувати у збірнику а стерилізувати в інокуляторі, але при приготуванні даної композиції спочатку готують розчин фосфорних солей, потім за допомогою титрувальних агентів (6%  $\text{HCl}$ ) знижують значення рН до 4,5 та додають решту солей і перемішують та перекачують самопливом у стерильний інокулятор. Спочатку обов'язково подають глуху пару в сорочку, щоб прогріти конструкцію апарату, а потім подають гостру пару в середину ферментера і стерилізують при температурі 131 °С (0,15 МПа) упродовж 40 хв після стерилізації за допомогою розчину  $\text{NaOH}$  збільшують значення рН до 7.

**Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 630 л та основного біосинтезу у ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>**

Для отримання інокуляту та основної ферментації *Corynebacterium glutamicum* KY9218, використовують середовище такого складу, що й на попередніх етапах, порядок приготування композицій однаковий, як на етапі отримання інокуляту в інокуляторі об'ємом 630 л, так і на основному процесі біосинтезу.

*Композиція А:* сахарозу та кукурудзяний екстракт, тирозин, фенілаланін, біотин та тіамін будемо готувати і стерилізувати у збірнику (режим стерилізації: 112 °С, тиск – 0,05 МПа упродовж 30 хв.). Після стерилізації композицію А охолоджують та подають у асептичних умовах безпосередньо у ферментер, де вже міститься простерилізована композиція Б.

*Композицію Б:*  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  та  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  будемо готувати у збірнику, але при приготуванні даної композиції спочатку готують розчин фосфорних солей, потім за допомогою титрувальних агентів (6%  $\text{HCl}$ ) знижують значення рН до 4,5 та додають решту солей і перемішують та перекачують самопливом у стерильний ферментер. Спочатку обов'язково подають глуху

пару в сорочку, щоб прогріти конструкцію ферментера, а потім подають гостру пару в середину ферментера і стерилізують при температурі 131 °С (0,15 МПа) упродовж 40 хв після стерилізації за допомогою розчину NaOH збільшують значення рН до 7.

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

Санітарний режим підприємства передбачає: утримання в чистоті приміщень, інвентарю, обладнання; виконання персоналом правил особистої гігієни; дотримання послідовності і правил технологічної обробки харчових продуктів та інших виробничих процесів.

Санітарний режим забезпечується комплексом санітарних заходів: прибирання, миття, дезінфекція, дезінсекція, дератизація та дотримання особистої гігієни персоналу. Ефективність санітарного стану підприємств харчової промисловості багато в чому визначається використанням і вибором миючих і дезінфікуючих засобів.

При оцінюванні санітарного режиму харчового підприємства контролюють правильність використання миючих і дезінфікуючих засобів, температуру і своєчасну заміну води в мийних ваннах, концентрацію миючих і дезінфікуючих засобів у воді, вміст активного хлору, ступінь чистоти інвентарю, обладнання, рук персоналу і ін.

**Дезінфекція, або знезаражування** – комплекс заходів (дезінсекція, дератизація) щодо знищення у середовищі життєдіяльності людини збудників інфекційних хвороб (дезінфекція) та їхніх переносників – комах (дезінсекція) і гризунів (дератизація). Поняття «*дезінфекція*» включає в себе три розділи: власне **дезінфекцію** (або знезаражування), що забезпечує усунення патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, які є збудниками інфекцій, **дезінсекцію**, що забезпечує усунення членистоногих, які є переносниками інфекцій або збудниками інфекцій, і **дератизацію**, що забезпечує усунення гризунів, які є переносниками або джерелом збудників інфекції [44].

***Дезінфекційні заходи поділяються на такі види:***

- Профілактичні дезінфекційні заходи – заходи, що проводяться у житлових, виробничих, навчальних, санітарно-побутових та інших приміщеннях, будівлях і спорудах, на територіях населених пунктів, у місцях масового відпочинку населення та рекреаційних зонах, в інших можливих місцях розмноження переносників збудників інфекційних хвороб;
- Поточні дезінфекційні заходи – заходи, що систематично проводяться у закладах охорони здоров'я, на об'єктах громадського харчування та на підприємствах харчової промисловості, у приміщеннях масового перебування людей (підприємства побутового обслуговування населення, навчальні та культурно-освітні заклади тощо), а також у житлових приміщеннях під час перебування в них інфекційних хворих чи бактеріоносіїв;
- Прикінцеві дезінфекційні заходи – заходи, що проводяться в осередку інфекційної хвороби після видалення з нього джерела інфекції. Заключні дезінфекційні заходи проводяться установами та закладами державної санітарно-епідеміологічної служби;
- Фізичні методи дезінфекції проводять за допомогою механічних, термічних та променевих засобів. Фізичний метод дезінфекції забезпечує видалення мікроорганізмів з об'єктів шляхом дії таких фізичних чинників:
  - висушування;
  - високої температури;
  - гарячого повітря;
  - пари;
  - ультрафіолетових променів;
  - ультразвуку.
- Механічні засоби забезпечують видалення, але не знищення мікроорганізмів. Це чищення, протирання, миття, прання,

вигушування, підмітання, провітрювання. При використуванні пилотягів видаляється до 98 % мікроорганізмів. Вентиляція ефективна досить, коли її тривалість не менша, ніж 30–60 хв;

- Термічні засоби ґрунтуються на застосуванні високих та низьких температур, а саме: гаряче повітря, водяна пара, кип'ятіння, пастеризація, спалювання, пропалювання, заморожування, висушування. Прасування білизни є дезінфікуючим засобом, але він діє здебільшого поверхнево. Замороження не спричинює загибелі мікроорганізмів, а приводить із часом до зменшення їх кількості. Висушування тривалий час приводить до загибелі великої кількості мікробів;
- Променеві засоби знезаражування — це застосування сонячного світла, ультрафіолетових променів, радіоактивного випромінювання. Прямі сонячні промені згубно діють на багатьох збудників інфекційних захворювань. Проте цей метод залежить від пори року, погоди і він використовується, як допоміжний.
  - *Ультрафіолетове* опромінювання використовують для знезараження повітря в операційних, процедурних тощо. Для цього використовують бактерицидні лампи.
  - *Радіоактивне* випромінювання згубно діє на всі види мікроорганізмів та їх спори.
  - Найчастіше *іонізуючим* випромінюванням у заводських умовах стерилізують інструмент для одноразового використання. В деяких випадках для дезінфекції використовують ультразвук;
- Хімічні методи дезінфекції широко застосовують на практиці. В основі їх лежить використання різних хімічних речовин, які вбивають мікроорганізми. Хімічні речовини мають різну дію на мікроорганізми:
  - бактерицидну – здатність вбивати бактерії;

- бактеріостатичну – пригнічують їх життєдіяльність;
- віруліцидну – здатність вбивати віруси; фунгіцидну – здатність вбивати грибки;

До хімічних дезінфікуючих засобів належать:

- ❖ хлор і його сполуки (р-ни хлорного вапна, хлорамін);
- ❖ галогени (спиртйод, йодонат, розчин Люголя);
- ❖ окисники (перекис водню, перманганат калію);
- ❖ феноли (фенол, лізол), спирти (етиловий, метиловий);
- ❖ альдегіди (формалін, формальдегід);
- ❖ кислоти;
- ❖ луги;
- ❖ барвники;
- ❖ солі важких металів та інші.

Слід зазначити, що універсального дезінфікуючого засобу немає. Використання засобів визначається метою їх застосування. *При проведенні хімічної дезінфекції необхідно дотримуватися таких умов:*

- використовувати дезінфекційний препарат тільки в рідкому стані;
- забезпечити контакт хімічного препарату з мікроорганізмами;
- використовувати препарат у визначеній концентрації, протягом певного часу та за певної температури [45].

Миючі та дезінфікуючі засоби слід контролювати на мікробіологічну чистоту. Їх розчини потрібно зберігати у попередньо очищеній тарі та суворо дотримуватись строків зберігання. Дезінфікуючі засоби мають відповідати таким вимогам: володіти бактерицидною дією, бути хімічно стійкими та не ушкоджувати поверхні обладнання. До мийних засобів висуваються інші вимоги: повинні виявляти високу мийну здатність, забезпечувати повне змочування поверхонь різних конструкційних матеріалів, пом'якшувати жорсткість води, забезпечувати повне видалення механічного, білкового та жирового забруднень шляхом їх диспергування та емульгування, забезпечувати омилення жирів (для лужних мийних засобів), нейтралізувати

кислі забруднення та виявляти низьку агресивність щодо конструкційних матеріалів, які використовують для виготовлення технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю [46-47].

### **Миючі засоби**

*Мийний засіб* - будь-яка речовина або препарат, що містить мило та/або інші поверхнево-активні речовини, призначені для прання або очищення. Мийний засіб може бути у формі рідини, порошку, пасти, бруска, плитки, таблетки тощо [46].

*Синтетичні мийні засоби* (СМЗ) – складні хімічні композиції, інгредієнтами яких є поверхнево-активні речовини (ПАР), фосфати, ензими, підбілювачі, ферменти, барвники, абразивні речовини, ароматизатори. Основу сучасних СМЗ складають агресивні поверхнево-активні речовини (ПАР), зокрема аніонні ПАР (А-ПАР), які, потрапляючи в організм людини, викликають порушення діяльності мозку, нирок, легенів, печінки, алергічні реакції [47].

### **Класифікація миючих засобів**

*Синтетичні миючі засоби, призначені для прання виробів, поділяються за такими ознаками:*

- за агрегатним станом:
  - тверді (у вигляді шматків - мило господарське),
  - порошкоподібні,
  - різновид - гранульовані;
  - рідкі;
  - пастоподібні;
- за призначенням:
  - для різних видів волокон – універсальні;
  - для бавовняних, лляних тканин та виробів з них;
  - для виробів із шовку, вовни, штучних та синтетичних тканин; для замочування білизни та господарсько-побутових потреб;

- спеціального призначення. Синтетичні миючі засоби підлягають обов'язковій сертифікації;
- синтетичні миючі засоби комплексної дії (з підсинюванням, підкрохмалюванням, антистатичною обробкою тощо);
- за способом застосування:
  - з високим (ненормованим) піноутворенням для ручного прання та в пральних машинах активаторного типу;
  - зі зниженим піноутворенням - для прання в автоматичних та напівавтоматичних пральних машинах [48].

*Засоби для миття та дезінфекції також підрозділяються на:*

- ❖ безпінного, для СИП-мийки - рециркуляційної мийки трубопроводів, цистерн і установок харчової промисловості;
- ❖ пінні - для очищення поверхонь з використанням систем механізованої очистки та вручну.

*За хімічним складом миючі засоби поділяються на:*

- ❖ кислотні;
- ❖ лужні;
- ❖ нейтральні.

*Щоб миючий засіб ефективно удаляло забруднення, воно повинно мати такі властивості:*

- добре розчинятися у воді і змішуватися в будь-яких пропорціях;
- добре змиватися з оброблюваних поверхонь;
- зберігати ефективність в жорсткій воді, при низьких концентраціях і температурах;
- не чинити корозійного і руйнівної дії на метали і інші матеріали;
- мати високі емульгуючі властивості;
- зберігати високу хімічну стійкість у воді і повітрі, бути екологічно безпечними.

Всі миючі, чистячі і дезінфікуючі засоби, що використовуються при збиранні, повинні відповідати вимогам нормативної документації.

*Миючі засоби не повинні мати такі властивості:*

- кумулюватися (накопичуватися) в організмі людини;
- мати різкий і стійкий запах;
- впливати на якість продуктів;
- надавати шкідливої дії на миються об'єкти.

Перелік документів, що підтверджують можливість використання хімічних засобів на підприємствах харчової промисловості:

- сертифікат відповідності;
- санітарно-гігієнічний висновок;
- паспорт безпеки.

Очищення, мийка і дезінфекція обладнання та приміщень - це складна багатоступенева процедура. Щоб розробити ефективну Програму миття та дезінфекції, потрібно знати особливості обладнання і правила використання професійної хімії. Консультанти нашого магазину допоможуть підібрати хімічні препарати з урахуванням особливостей виробничого циклу і дотриманням вимог санітарно-епідеміологічного контролю [49].

### **Обґрунтувати вибір дезінфікуючого засобу для виробництва триптофану**

Так як для виробництва триптофану використовується ферментер об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>, а також інокулятори і збірники, тому доцільно використовувати циркуляційну СІР – мийку. Миття та ополіскування ферментерів та збірників проводиться паралельно та триває близько 1,5 години.

Будь яке сучасне біотехнологічне виробництво передбачає в собі підготовку виробничого обладнання, оскільки воно не повинно негативно впливати на якість кінцевої продукції. Частина або поверхні устаткування, що контактують з продукцією, повинні бути виготовлені з матеріалів, які не вступають з нею в реакцію, не мають абсорбційних властивостей тощо. Тому для забезпечення максимальної якості готового продукту технологічне

обладнання також повинно проходити певну підготовку.

Щоб забезпечити належне очищення обладнання необхідно дотримуватися затверджених на підприємстві методик по підготовці виробничого обладнання та комунікацій.

Обладнання, яке використовується для роботи у виробничих приміщеннях, має бути сконструйованим і розміщеним таким чином, щоб його експлуатацію, обслуговування та ремонт можна було б проводити за межами виробничого приміщення. Воно також повинно мати необхідні пристрої для контролю параметрів процесу [50].

Як підготовку обладнання розуміють очищення, миття та дезінфекційну обробку внутрішніх і зовнішніх його поверхонь. Підготовку обладнання проводять до початку або після закінчення технологічної операції, або в кінці зміни.

Для того, щоб обрати миючий та/або дезінфікувальний засіб, необхідно знати загальну площу миття, концентрацію робочого засобу та його витрати на оброблення потрібної площі виробничого приміщення. Окрім цього слід звернути увагу і на саму вартість цих засобів [51].

Першим етапом необхідно розрахувати витрати мийних та/або дезінфікуючих засобів. Приблизно на 1 м<sup>2</sup> витрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 № 502). Припустимо, що обладнання та комунікації потрібно мити перед кожним виробничим циклом, тобто 32 разів; підлога миється кожного робочого дня, тобто 120 разів; а стіни, вікна та двері – раз на місяць (4 рази). Загальна площа оброблюваних об'єктів за весь період виробництва вказана у *табл. 4.1* [51].

*Таблиця 4.2*

**Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва триптофану**

Об'єкт миття та/або	Площа (об'єм)	Кількість процесів миття	Загальна площа
---------------------	---------------	--------------------------	----------------

дезінфекції	оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> (л)	та/або дезінфекції за весь період виробництва	(об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (л)
Обладнання, інвентар, комунікації	5000	32	16000
Підлога	198	120	23760
Стіни, двері, вікна	110	4	440

Підготовку приміщень проводять після кожної зміни в наступній послідовності:

- в процесі роботи в разі необхідності видаляють виробничі відходи;
- прибирають розсипані порошки та інші речовини і механічні забруднення, витирають пролиті рідини, а в разі необхідності, застосовують засоби для знежирення;
- вносять в приміщення необхідний прибиральний інвентар, матеріали і теплу воду з мийним засобом в кількості, що необхідна для одного прибирання;
- проводять вологе прибирання в приміщенні, столи та інші поверхні приміщення миють поролоною губкою, яка добре змочена розчином мийного засобу, із розрахунку 100–150 мл/м<sup>2</sup>, потім промивають теплою водою, висушують або витирають досуха, проводять дезобробку;
- проводять миття стін, миють теплою водою з мийним засобом, потім промивають водою очищеною і витирають насухо;
- проводять підготовку технологічного обладнання та інвентарю відповідно до Методичних рекомендацій щодо підготовки технологічного обладнання затверджених наказом МОЗ України 14.12.2001 № 502;
- миють підлогу теплою водою з мийним засобом, потім промивають теплою водою, витирають досуха і проводять дезобробку, щоразу починаючи з віддаленої від дверей площі.

Рекомендується чергувати дезінфікуючі та антисептичні засоби кожні 1–3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких варіантів мікроорганізмів [52-53].

Миття ємнісного обладнання проводиться методами циркуляції робочого розчину в системі, заповнення резервуара (біореактора) робочим розчином засобу складатиме близько половини з відповідним об'ємом обладнання [54]. Дезінфекцію зовнішніх поверхонь проводять шляхом нанесенням або розпилення робочого розчину дезінфікуючого засобу на поверхню обладнання. Тривалість контакту дезінфікуючого засобу з поверхнею повинна складати не менше 20 хв. Після закінчення обробки залишки засобу змивають і промивають устаткування водою.

Як мийні засоби використовують лужні (кальцинована сода, каустична сода) та кислотні (азотна, фосфорна, соляна, оцтова, сульфамінова кислоти) мийні засоби, а також мийні засоби на основі синтетичних поверхнево-активних речовин (синтетичні порошки типу А, Б, В ТЕА–АБСК) і мийні засоби з протеолітичними ферментами («Біомой») [55-56].

Проаналізувавши вітчизняний ринок миючих та дезінфікуючих засобів, слід звернути увагу на ефективні, порівняно дешеві та найбільш вживані, серед таких засобів слід виділити каустичну і кальциновану соду, «Біомой», «Гембар», «Хлорантоін» та «Дезактін».

**«Біомой»** – багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом (ТУ У 22902465.005–96). Рекомендований Міністерством охорони здоров'я України.

Препарат являє собою порошок, світлих тонів (допускається присутність забарвлених включень ензимів). Добре розчиняється у воді (розчинність не менше 30 г/дм<sup>3</sup>); робочі розчини «Біомою» безбарвні, не ушкоджують оброблювані вироби і володіють вираженими емульгуючими і миючими властивостями, легко видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях.

Для приготування робочого розчину Біомою використовується концентрація 0,15–0,5%. Робочий розчин Біомою готують у тарі будь-якого матеріалу шляхом розчинення у питній воді.

Переваги даного миючого засобу: не пошкоджує об'єкти з нержавіючої

сталі, металу, полімерних матеріалів, кахлю, емалі; належить до мало небезпечних речовин (4 клас безпеки); не проявляє кумулятивні та алергічні властивості [54].

**Каустична сода** (їдкий натр, NaOH) являє собою безбарвну кристалічну речовину. Гігроскопічна. Добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчину мийні властивості засобу падають. Розчини каустичної соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас безпеки за ГОСТ 12.1.007). При потраплянні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів [54].

**Кальцинована сода** являє собою зневоднений вуглекислий натрій ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Гарячі ( $55 \pm 5$  °C) розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів до  $45 \pm 5$  °C їх мийна здатність різко падає.

Засіб належить до речовин 3-го класу безпеки за ГОСТ 2263-79. У нативному вигляді та концентрованих розчинах сильно подразнює шкіру і слизову оболонку очей [55].

Для проведення дезінфекційних заходів використовують дезінфекційні засоби, що містять в якості активно діючої речовини (АДР) окислювачі (перекис водню), глутаровий альдегід (корзолін іД), похідні гуанідину (гембар), та мийно-дезінфекційні засоби, які містять в якості АДР хлорпохідні гідантоїну [56].

При роботі із засобом персонал, що виконує дезінфекційні заходи, має бути забезпечений засобами індивідуального захисту, що забезпечують захист шкіри, органів дихання та очей – халат, шапочка, фартух з

прогумованої тканини, гумові рукавички, гумове взуття, захисні окуляри типу ПО–2, ПО–3 чи моноблок, респіратор типу РПГ–67 або РУ–60 М з патроном марки В чи «Пелюсток» [57].

**«Гембар»** - дезінфекційний засіб виробництва фірми НВЦ "Біоцид" (Україна). В якості АДР містить полігексаметиленгуанідин фосфат. Являє собою безбарвну або жовтувату прозору рідину. Не має запаху. Добре розчиняється у воді. Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з металу, скла, полімерних матеріалів та гуми. Після висихання розчину на оброблених поверхнях утворюється плівка.

Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки за ГОСТ 12.1.007), не подразнює шкіру, не виявляє сенсibiliзуючих, кумулятивних, мутагенних та канцерогенних властивостей, але подразнює слизову оболонку очей [54].

**«Дезактін»** – дезінфекційний засіб, що використовується для очищення і дезінфекції та одночасного миття твердих поверхонь приміщень, предметів та обладнання і комунікацій.

«Дезактін» являє собою порошок від білого до жовтуватого кольору з помірним запахом хлору. Розчинність у воді становить не менше 20 мг/дм<sup>3</sup>. Водні розчини прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору. Робочі розчини засобу не пошкоджують об'єкти, які виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни і устаткування з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують білкові забруднення на поверхні обладнання, добре змиваються, не залишають нальоту [55].

**«Хлорантоін»** – хлорактивний, багатокomпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом стабільний при зберіганні протягом 3-х років (ТУ У 22902465.004-95). Препарат являє собою: сипучий порошок, світлих тонів зі слабким запахом хлору. Розчинність у воді - не менше 20 г/дм<sup>3</sup>. Водні розчини «Хлорантоїну» прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору.

Робочі розчини засобу мають миючі, дезінфікуючі та передстерилізаційні властивості, перевищують в 5-10 разів звичайні дезінфікуючі засоби та виключають застосування лужних миючих засобів, не ушкоджують об'єкти, виготовлені з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу і поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовими, гальванічними і полімерними покриттями, добре емульгують жири, видаляють білково-жирову плівку з оброблюваних поверхонь, легко з них змиваються, не залишаючи нальоту.

Спектр антимікробної дії: «Хлорантоін» має бактерицидні, туберкульозні, спороцидні та фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, цвілевих грибів) властивості [55].

Варто відмітити, що усім наведеним засобам притаманні як високі миючі, так і дезінфікуючі властивості. Також слід зазначити, що «Хлорантоін» та «Біомой» належать до 4 класу небезпеки, тому це дозволяє використовувати їх у присутності персоналу, який не причетний до прибирання.

Перевагами усіх вище зазначених дезінфікуючих засобів є стабільність при зберіганні, зручне приготування робочих розчинів, повний спектр знезаражуючої дії, екологічна безпека та легкість змивання з поверхонь. Але при виборі дезінфікувальних засобів увагу слід звертати також і на їх вартість [54-55].

Таблиця 4.3

## Узагальнена характеристика витрат мийних та/або дезінфікуючих засобів для виробництва триптофану

Назва мийного/дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Кон-ція робочого розчину, %	Заг. площа миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва м <sup>2</sup> (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Витрата на 1 м <sup>2</sup> поверхні, л	Вартість 1 л (кг) мийного або дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Заг-на вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн	Джерело (1, 2, 3,4,5)*
Біомой	Обладнання, інвентар, комунікації	0,3	11100	5550	0,1	34	1,02	566	1
Кальцинована сода		2,0	11100	5550	0,5	9	0,18	999	2
Каустична сода		2,0	11100	5550	0,5	14	0,28	1990	3
«Дезактін»	Стіни, вікна, двері, підлога, тара, інвентар, обладнання, комунікації	0,2	9100	1800	0,1	135	2,7	245	1
«Гембар»		0,5	1835	910	0,5	150	0,75	550	4
Хлорантоїн		0,2	9100	910	0,1	110	0,22	198	5

Примітка: \* – ціни наведено станом на жовтень 2021:

- <http://www.farmakos.ua/ua/price> ;
- [http://kiev.prom.ua/Soda-kaltsinirovannaya.html?no\\_redirect=1](http://kiev.prom.ua/Soda-kaltsinirovannaya.html?no_redirect=1);
- <http://prom.ua/Soda-kausticheskaya.html> ;
- <http://biocide.kiev.ua/?Produkty:Gembar>;
- [http://dezmed.com.ua/ua/store/produkcija/disinfectants/chlorine-containing\\_agents/Cloratoin](http://dezmed.com.ua/ua/store/produkcija/disinfectants/chlorine-containing_agents/Cloratoin)

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу триптофану, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в *табл. 5.1.*

*Таблиця 5.1*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал – волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е = 90 %
К-3	Компресор	1	Компресор GX 7 фірми Atlas Copco (Швеція), потужність 14 л/с, робочий тиск 1 МПа
Т-4	Теплообмінник–охолоджувач	1	Теплообмінник–охолоджувач серії AFR 11 фірми «Уралкомпресормаш», продуктивність 66 м <sup>3</sup> /год
Р-5	Ресивер	1	Ресивер серії РВ 230/10 фірми «Урагткомпресормаш» (Росія), об'єм 230 л, робочий тиск 1 МПа
Т-6	Теплообмінник–нагрівач	1	Корпус теплообмінника В0П_Н фірми Airone (Росія) виготовлений із оцинкованої сталі товщиною 1,0 – 1,5 мм
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтруючий матеріал – фторопласт, Е – 99,996 %, швидкість фільтрування 0,01 м/с
Д-10, Д-13, Д-19, Д-26, Д-29, Д-34, Д-37,	Об'ємно-ваговий дозатор	7	Дозатор марки ДВСВ-50. Дозатор напівавтоматичний важільного (гравітаційного типу). Вироблено: м. Черкаси

					НУХТ БТЕК 04.02.26. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шульга М.О.			РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					53	88
Консультант						Кафедра БТМ <sup>53</sup>		
Н.Контр.								
Затвердив		Стабніков В.П.						

Закінчення табл 5.1

1	2	3	4
36–8 36–40	Реактор–змішувач для приготування розчину титрувального агенту	2	Реактор об'ємом 5 л, \перемішуючим пристроєм. «Техинсервіс», Загальний, швидкість перемішування 300 об/хв, сталь 12Х18Н10Т
Рз–11 Рз–14	Реактор–змішувач для приготування розчинів для підживлення	1	Реактор об'ємом 2000 л та 1000 л, \перемішуючим пристроєм. «Техинсервіс», Загальний, швидкість перемішування 500 об/хв, сталь 12Х18Н10Т
Рз–20 Рз–27 Рз–35	Реактор–змішувач для приготування та стерилізації Композиції А	3	Збірник із нержавіючої сталі (12Х18Н10Т) оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. об'ємом 25 л та 250 л 2500 л
Рз–22 Рз–30 Рз–38	Реактор–змішувач для приготування та стерилізації Композиції Б	3	Збірник із нержавіючої сталі (12Х18Н10Т) оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. об'ємом 15 л та 150 л 2000 л .
Н–9, Н–12 Н–15, Н–21 Н–23, Н–28, Н–31, Н–36, Н–39 Н–41, Н–44	Насос	11	Відцентровий, тип КRSH 32/160 Продуктивність до 30 м <sup>3</sup> /год, потужність двигуна 2,5 кВт
ЗП-17	Засівний бачок	1	Засівний бачок для посівного матеріалу об'ємом 3л.
Ін -16 Ін -25 Ін -32	Інокулятор	3	Інокулятор фірми «Біотехно» (Україна). Оснащений паровою сорочкою, пробовідбірником, барботером та трубою перетискування. Матеріал нержавіюча сталь. Об'ємом 5 л та 60 л 630 л
Ф-18 Ф-24 Ф-33 Ф-43	Фільтри індивідуальної очистки	4	Фільтри марки Vonесо А7014 (Швейцарія), Фільтруючий матеріал - фторопласт, Е = 99,999 %
Фр-42	Ферментер	1	Ферментер фірми «Біотехно» (Україна), об'ємом 6,3 м <sup>3</sup> , швидкість перемішування до 200 об/хв [19]

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу триптофану включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез). Технологічну схему біосинтезу триптофану наведено у графічній частині проекту.

### ДР 1. Підготовка стерильного технологічного повітря

Повітря, яке використовується для аерації у процесі культивування посівного матеріалу в інокуляторі та в процесі біосинтезу в ферментері, повинно бути стерильним та мати температуру 30–35°C.

#### ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря відбувається через повітрозбірник (ПЗ–1), який розташовується у зоні чистого повітря, віддаленої від зон технологічних шкідливих викидів або викидів систем витяжної вентиляції. Вхід повітря розміщується на висоті не менше 30 м від землі і закривається залізними ґратами. Повітря через повітрозабірну шахту під дією вентилятора потрапляє до фільтру грубого очищення [58].

#### ДР 1.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

Попередню очистку повітря здійснюють у чарунковому фільтрі. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення (Ф–2), пил та механічні частки з повітря осідають, а очищене повітря надходить у компресор (К–3). Ступінь очищення становить  $E = 80 \%$ .

#### ДР 1.3. Стиснення повітря

При стисканні повітря у компресорі (К–3) його температура підвищується з 15–25 °C на вході в повітродувку до 120–200 °C на виході з неї. Перед подачею в головний фільтр повітря охолоджують.

					НУХТ БТЕК 04.02.26. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шульга М.О.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
		Сулейко Т.Л.					55	88
Консультант					55			
Н.Контр.					Кафедра БТМ			
Затвердив		Стабніков В.П.						

Перевір. Після компресора повітря має наступні характеристики:  $P = 0,35-0,5$  МПа,  $w = 60 \%$ .

#### **ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи**

Після стискання у компресорі (К-3) повітря надходить до теплообмінника (Т-4) для охолодження до температури  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Після охолодження повітря подають у ресивер (Р-5) для відділення вологи та стабілізації термодинамічних показників. Щоб запобігти випаданню вологи в ресивері-вогловідділювачі, повітря «переохолоджують» до температури  $25-30 \text{ }^\circ\text{C}$  при тиску  $0,2$  МПа у теплообмінному апараті (Т-4). У ресивері-вогловідділювачі (Р-5) . Відбувається видалення вологи, після цього вологість повітря становить близько  $70 \%$ .

#### **ДР 1.5. Нагрівання повітря**

Для забезпечення надійної роботи фільтрів, повітря нагрівають до температури  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . З цією метою повітря після ресивера (Р-5) підігрівають у теплообміннику (Т-6), при цьому допускається часткове підмішування гарячого повітря після компресора. Кількість підмішуваних гарячого повітря визначається умовами відносної вологості, яка не повинна перевищувати  $50\%$ .

#### **ДР 1.6. Очищення в головному фільтрі**

Після охолодження очищення подається до головного фільтру (Ф-7) для забезпечення ефективності очищення  $95\%$ . Головний фільтр представляє собою циліндричну ємність з сферичним дном та кришкою. В середині фільтру знаходяться дві решітки, між якими розміщують фільтруючий матеріал. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

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

Заключна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах (Ф-25, Ф-32, Ф-40, Ф-48), які розташовані

безпосередньо біля ферментера.

Як фільтруючий матеріал використовують фторопластові втулки, товщиною 4 мм. Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном  $E=99,9\%$ . Заміну фільтра проводять раз в місяць.

## **ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів**

При біосинтезу триптофану, окрім стадій підготовки поживного середовища, технологічна схема включає такі додаткові стадії:

- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації;
- приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища перед початком культивування.

Розрахунок титрувальних агентів на різних стадіях наведений нижче.

*Таблиця 6.1*

### **Розрахунок вмісту титрувальних агентів**

<b>Об'єм ферментера, м<sup>3</sup></b>	<b>Об'єм композиції Б, л</b>	<b>Кількість HCl (6%), г</b>	<b>Кількість NaOH, г</b>
6,3	1024	2,8 л	2,8 л
0,63	102,4	280 мл	280 мл
0,06 (60 л)	10,24	28 мл	28 мл

#### *ДР 2.1 Підготовка титрувального агенту HCl для підкислення*

Розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з дистильованою водою. В асептичних умовах відміряють концентрованої 36% розчину HCl, та поміщають у збірник (ЗБ-12) об'ємом 5 л, і додають дистильованої води для отримання 6% розчину HCl, ретельно перемішують та самоплином подають до відповідної стадії.

#### *ДР 2.2 Приготування і стерилізація титрувального агенту NaOH для підлужнення*

##### *ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація титрувального агенту NaOH для підлужнення поживного середовища в інокуляторі 60 л*

На технічних вагах зважують 6 г NaOH наважку переносять у колбу

об'ємом 500 мл та додають 94 мл питної води, перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Готовий розчин подають до відповідної стадії.

*ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація титрувального агенту NaOH для підлужнення поживного середовища в інокуляторі 630 л*

На технічних вагах зважують 60 г NaOH наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл та додають 940 мл питної води, перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Готовий розчин подають до відповідної стадії.

*ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація титрувального агенту NaOH для підлужнення поживного середовища у ферментері*

На технічних вагах зважують NaOH. Наважку поміщають у збірник (ЗБ-14) об'ємом 5 л, і додають питної води, перемішують і стерилізують при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Готовий розчин самоплином подають до відповідної стадії.

### **ДР 3. Приготування запасних розчинів**

Оскільки у середовищі присутні компоненти в малих кількостях, то доцільно буде приготувати запасний розчин, який би покривав кількості даних компонентів на всіх стадіях підготовки поживних середовищ.

*ДР 3.1 Приготування запасних розчинів біотину та тіаміну*

Для вирощування підготовки поживного середовища (від приготування в колбах до ПС для інокулятора об'ємом 5 л) необхідно приготувати запасний розчин тіаміну та біотину. Вміст компонентів середовища наведено в *табл. 6.2*.

*Таблиця 6.2*

### Склад запасних розчинів тіаміну і біотину

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л (мг/л)	Вміст компонента у 378 мл середовища, г	Вміст компонента у 3,4 л середовища, г
біотин	230 мкг/л	0,00009	0,00078
тіамін	450 мкг/л	0,00017	0,00153

*ДР 3.1.1 Приготування запасних розчинів біотину та тіаміну для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці*

На технічних вагах зважують, 0,09 г біотину та 0,17 г тіаміну, наважки наважки переносять у колбу об'ємом 2500 мл, додають 1000 мл питної води, перемішують готовий розчин подають на стадію ДР 5.1.1

*ДР 3.1.2 Приготування запасних розчинів біотину та тіаміну для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 5 л*

На технічних вагах зважують, 0,78 г біотину та 1,53 г тіаміну, наважки наважки переносять у колбу об'ємом 2500 мл, додають 1000 мл питної води, перемішують та подають на стадію ДР 5.2.1

*ДР 3.2 Приготування запасних розчинів солей*

Для вирощування підготовки поживного середовища в колбах необхідно приготувати запасний розчин солей. Вміст компонентів середовища наведено в *табл. 6.3*.

*Таблиця 6.3*

### Склад запасних розчинів для приготування композиції

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л (мг/л)	Вміст компонента у 378 мл середовища, г
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	13 мг/л	0,005
MnSO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O	13 мг/л	0,005
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	6 мг/л	0,002

На технічних вагах зважують 5 г феруму сульфату, 5 г мангану сульфату та 2 г купруму сульфату, наважки наважки переносять у колбу об'ємом 2500 мл, додають 1000 мл питної води, перемішують та подають на стадію ДР 5.1.3

**ДР 4. Приготування та стерилізація підживлюючого розчину**

*ДР 4.1. Приготування та стерилізація підживлюючого розчину*

### *сахарози*

У вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести 100 г/л сахарози (див. попередні розрахунки). Тривалість культивування становить 80 год. Прийmemo, що підживлення додається у середовище кожні 8 год. Тоді кількість порцій підживлення становить  $(80-8) / 8 = 9$  Отже, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись  $100 / 9 = 11,1$  г/л сахарози, тобто для виробничого біосинтезу об'ємом 3780 л потрібно приготувати 378 кг сахарози, для цього через об'ємно-ваговий дозатор (ЗБ-18) зважують 378 кг сахарози, та подати у збірник (ЗБ-19) об'ємом 2000 л, додають через об'ємно-ваговий дозатор (ЗБ-18) 1000 л питної води, перемішують.

Стерилізують дану композицію з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку збірника при перемішуванні. Після охолодження підживлюючий за допомогою насосу (Н-20) подають у ферментер (Фр-49) до ТП 7.1. з розрахунку 11 г/л кожні 8 годин.

### *ДР 4.2. Приготування та стерилізація підживлюючого розчину амонію сульфату*

У вигляді підживлювального розчину в середовище необхідно внести 50 г/л амонію сульфату (див. попередні розрахунки). Тривалість культивування становить 80 год. Прийmemo, що підживлення додається у середовище кожні 8 год. Тоді кількість порцій підживлення становить  $(80-8) / 8 = 9$  Отже, з кожною порцією підживлення у середовище повинно вноситись  $50 / 9 = 3,33$  г/л сахарози, тобто для виробничого біосинтезу об'ємом 3780 л потрібно в нести 189 кг амонію сульфату, для цього через об'ємно-ваговий дозатор (Д-21) зважують 189 кг амонію сульфату, та подати у збірник (Зб-22) об'ємом 1000 л, додають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-21) 600 л питної води, перемішують.

Стерилізують дану композицію з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку збірника при перемішуванні. Після охолодження підживлюючий за допомогою насосу (Н-23) подають у ферментер (Фр-49) до ТП 7.1. з розрахунку 3,3 г/л кожні 8 годин.

### ДР 5 Приготування та стерилізація поживного середовища

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

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 0,378 л поживного середовища. Вміст компонентів середовища наведено в *табл. 6.4*.

*Таблиця 6.4*

#### Склад поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л (мг/л)	Вміст компонента у 378 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл	Кількість води, мл
сахароза	64	23,81	А	200	100,62
кукурудзяний екстракт	66	24,95			
тирозин	310 мг/л	0,12			
фенілаланін	650 мг/л	0,25			
біотин	230 мкг/л	0,00009			
тіамін	450 мкг/л	0,00017			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	0,75	Б	78	76
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2	0,45			
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,7	0,64			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17	6,43	В	100	95
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	13 мг/л	0,005			
MnSO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O	13 мг/л	0,005			
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	6 мг/л	0,002			

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

На технічних вагах зважують 23,81 г сахарози, 24,95 г кукурудзяного екстракту, 0,12 г тирозину та 0,25 г фенілаланіну наважки переносять у колбу об'ємом 750 мл та додають 1 мл запасного розчину біотину та тіаміну від ДР 3.1.1 потім додають 100,62 мл питної води, перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв.

*ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

Готують 78 мл розчину, для цього на технічних вагах зважують 0,75 г дигідрофосфату калію та 0,45 г гідроортофосфату калію. Наважки переносять у колбу об'ємом 200 мл, додавають 76 мл питної води, перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

*ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції В*

Готують 100 мл розчину, для цього на технічних вагах зважують 0,64 г сульфату магнію, 6,43 г сульфату амонію, Наважки переносять у колбу об'ємом 200 мл та додають 1 мл запасних розчинів солей від ДР3.2, потім додають 169,79 мл питної води, перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

*ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 5 л*

При вирощуванні посівного матеріалу поживне середовище ідентичне тому, що й для вирощування в колбах на качалці. Робочий об'єм апарата становить 3,78 л разом с посівним матеріалом. Враховуючи, що посівного матеріалу в нас вноситься 10% (0,378 л), тому будемо готувати 3,4 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в *табл. 6.5*.

*Таблиця 6.5*

**Склад поживного середовища для вирощування посівного матеріалу**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л (мг/л)	Вміст компонента у 3,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл	Кількість води, мл
сахароза	64	214,20	А	2000	1456
кукурудзяний екстракт	66	224,40			
тирозин	310 мг/л	1,05			

фенілаланін	650 мг/л	2,21			
біотин	230 мкг/л	0,00078			
тіамін	450 мкг/л	0,00153			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	6,80	Б	400	390
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2	4,08			
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,7	5,78			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17	57,80	В	1000	940
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	13 мг/л	0,04			
MnSO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O	13 мг/л	0,04			
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	6 мг/л	0,02			

#### *ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 214,2 г сахарози, 224,4 г кукурудзяного екстакту, 1,05 г тирозину та 2,21 г фенілаланіну наважки переносять у колбу об'ємом 5 л та додають 1 мл запасного розчину біотину та тіаміну від ДР 3.1.2 потім додають 1456 мл питної води, перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв. Після охолодження композицію за допомогою посівного бачка (ЗП-24) подають в інокулятор (Ін-26).

#### *ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

Готують 400 мл розчину, для цього на технічних вагах зважують 6,8 г дигідрофосфату калію та 4,08 г гідроортофосфату калію. Наважки переносять у колбу об'ємом 1000 мл, добавляють 390 мл питної води, перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після охолодження композицію за допомогою посівного бачка (ЗП-24) подають в інокулятор (Ін-26).

#### *ДР 5.2.3. Приготування і стерилізація композиції В*

Готують 1000 мл розчину, для цього на технічних вагах зважують 5,78 г сульфату магнію, 57,8 г сульфату амонію, 0,04 г феруму сульфату, 0,04 г мангану сульфату та 0,02 г купруму сульфату, Наважки переносять у колбу об'ємом 3л та додають 940 мл питної води, перемішують.

Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві

при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після охолодження композицію за допомогою посівного бачка (ЗП-24) подають в інокулятор (Ін-26).

*ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту 60 л*

При вирощуванні інокуляту поживне середовище ідентичне тому, що й для вирощування посівного матеріалу. Робочий об'єм апарата становить 37,8 л разом з посівним матеріалом. Враховуючи, що посівного матеріалу в нас вноситься 10% (3,78 л) та 10% утвориться конденсату під час стерилізації, тому будемо готувати 30,24 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в *табл. 6.6*.

*Таблиця 6.6*

**Склад поживного середовища для вирощування інокуляту**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л (мг/л)	Вміст компонента у 30,24 л середовища, кг (г)	Композиція	Об'єм композиції, л	Кількість води, л
сахароза	64	1,91	А	20	15,85
кукурудзяний екстракт	66	1,99			
тирозин	310 мг/л	9,4 г			
фенілаланін	650 мг/л	19,7 г			
біотин	230 мкг/л	0,01 г			
тіамін	450 мкг/л	0,013 г			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	61 г	Б	10,2	9,53
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2	36 г			
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,7	51 г			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17	514 г			
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	13 мг/л	0,39			
MnSO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O	13 мг/л	0,39			
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	6 мг/л	0,18			

*ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-27) зважують 1,91 кг сахарози, 1,99 кг кукурудзяного екстаку, та переносять в збірник (ЗБ-28) об'ємом 25 л, додають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-27) 15,85 л питної води, потім на технічних вагах 9,4 г тирозину, 19,7 г фенілаланіну, 0,01 г біотину та 0,013 г тіаміну, перемішують.

Стерилізують дану композицію з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку збірника при перемішуванні. Після охолодження композицію за допомогою насоса (Н-29) перекачують в інокулятор (Ін-33).

#### *ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

Готують 10,24 л розчину, для цього на технічних вагах зважують 61 г дигідрофосфату калію та 36 г гідроортофосфату калію та переносять у збірник (ЗБ-30) об'ємом 15 л, додають 9,53 л питної води, перемішують.

Потім додають розчин соляної кислоти (ЗБ-12) від ДР 3.1 до доведення до значення рН 4,5. Після чого додають 51 г сульфату магнію, 514 г сульфату амонію та 0,39 г феруму сульфату, 0,39 г мангану сульфату та 0,18 г купрум сульфату, перемішують, після перемішування дану композицію за допомогою насоса (Н-31) перекачують до інокулятора (Ін-33) де дану композицію стерилізують, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру в апарат. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку інокулятора при перемішуванні та додають розчин гідроксиду натрію від (ЗБ-14) для отримання значення рН 7.

#### *ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту 630 л*

При вирощуванні інокуляту поживне середовище ідентичне тому, що й для вирощування посівного матеріалу. Робочий об'єм апарата становить 378 л разом з посівним матеріалом. Враховуючи, що посівного матеріалу в нас вноситься 10% (37,8 л) та 10% утвориться конденсату під час стерилізації, тому будемо готувати 302,4 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в *табл. 6.7*.

*Таблиця 6.7*

### Склад поживного середовища для вирощування інокуляту

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л (мг/л)	Вміст компонента у 302,4 л середовища, кг (г)	Композиція	Об'єм композиції, л	Кількість води, л
сахароза	64	19,05	А	200	158,5
кукурудзяний екстракт	66	19,96			
тирозин	310 мг/л	94 г			
фенілаланін	650 мг/л	197 г			
біотин	230 мкг/л	0,07г			
тіамін	450 мкг/л	0,13 г			
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	610 г	Б	102,4	95,3
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,2	360 г			
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,7	510 г			
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	17	5,14 кг			
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13 мг/л	3,93			
$\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	13 мг/л	3,93			
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6 мг/л	1,81			

#### *ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-34) зважують 19,05 кг сахарози, 19,96 кг кукурудзяного екстаку, та завантажують в збірник (ЗБ-35) об'ємом 250 л, додають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-34) 158,5 л питної води, потім на технічних вагах 94 г тирозину, 197 г фенілаланіну, 0,07 г біотину та 0,13 г тіаміну, перемішують. .

Стерилізують дану композицію з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку збірника при перемішуванні. Після охолодження композицію за допомогою насоса (Н-36) перекачують в інокулятор (Ін-41).

#### *ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

Готують 102,4 л розчину, для цього за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-37) зважують 0,610 кг дигідрофосфату калію та 0,360 кг гідроортофосфату калію та переносять у збірник (ЗБ-38) об'ємом 150 л, добавляють 95,3 л питної води, перемішують.

Потім додають розчин соляної кислоти (ЗБ-12) від ДР 3.1 до доведення

до значення рН 4,5. Після чого додають 0,510 кг сульфату магнію, 5,14 кг сульфату амонію та 3,93 г феруму сульфату, 3,93 г мангану сульфату та 1,81 г купруму сульфату, перемішують, після перемішування дану композицію за допомогою насоса (Н-39) перекачують до інокулятора (Ін-41) де дану композицію стерилізують, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру в апарат. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку інокулятора при перемішуванні та додають розчин гідроксиду натрію від (ЗБ-14) для отримання значення рН 7.

*ДР 5.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для промислового культивування 6,3 м<sup>3</sup>*

При промисловому культивуванні поживне середовище ідентичне тому, що й для вирощування інокуляту. Робочий об'єм апарата становить 3,78 м<sup>3</sup> разом з посівним матеріалом. Враховуючи, що посівного матеріалу в нас вноситься 10% (0,378 м<sup>3</sup>) та 10% утвориться конденсату під час стерилізації, тому будемо готувати 3,024 м<sup>3</sup> поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в *табл. 6.8*.

*Таблиця 6.8*

#### Склад поживного середовища для основної ферментації

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л (мг/л)	Вміст компонента у 3024 л середовища, кг (г)	Композиція	Об'єм композиції, л	Кількість води, л
сахароза	64	190,5	А	2000	1585
кукурудзяний екстракт	66	199,6			
тирозин	310 мг/л	0,94			
фенілаланін	650 мг/л	1,97			
біотин	230 мкг/л	0,7 г			
тіамін	450 мкг/л	1,36 г			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	6,10	Б	1024	953
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2	3,60			
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,7	5,10			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17	51,4			
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	13 мг/л	39,31 г			
MnSO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O	13 мг/л	39,31 г			
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	6 мг/л	18,14 г			

### *ДР 5.5.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-42) зважують 190,51 кг сахарози, 199,58 кг кукурудзяного екстакту в збірник (ЗБ-43) об'ємом 2500 л, додають через об'ємно-ваговий дозатор (Д-42) 1585 л питної води, потім на технічних вагах м 940 г тирозину, 1970 г фенілаланіну, 0,7 г біотину та 1,3 г тіаміну, перемішують.

Стерилізують дану композицію з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у збірник. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку збірника при перемішуванні. Після охолодження композицію за допомогою насоса (Н-44) перекачують у ферментер (Фр-49).

### *ДР 5.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

Готують 1024 л розчину, для цього за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-45) зважують 6,10 кг дигідрофосфату калію та 3,60 кг гідроортофосфату калію та переносять у збірник (ЗБ-46) об'ємом 2000 л, добавляють 953 л питної води, перемішують. Потім додають розчин соляної кислоти (ЗБ-12) від ДР 3.1 до доведення до значення рН 4,5. Після чого додають 5,10 кг сульфату магнію, 51,4 кг сульфату амонію та на технічних вагах сважують 39,31 г феруму сульфату, 3,931 г мангану сульфату та 18,14 г купруму сульфату, перемішують, після перемішування дану композицію за допомогою насоса (Н-47) перекачують до ферментера (Фр-49) де дану композицію стерилізують, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру в апарат. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку ферментера при перемішуванні та додають розчин гідроксиду натрію від (ЗБ-14) для отримання значення рН 7.

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

### *ТП 6.1. Підтримання колекційної культури*

Колекційну культуру *Corynebacterium glutamicum* KY9218 зберігають у

пробірках при температурі 4-6°C зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА). Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

#### *ТП 6.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають мікробіологічною петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 30°C упродовж 24 год. [59-62]

#### *ТП 6.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах*

Отримані ізолювані колонії (від ТП 6.2) 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. Готуємо 3 пробірки, з розрахунку 1 пробірка на 1 колбу. Температура культивування – 30±2°C, тривалість вирощування – 24 год.

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

Для вирощування посівного матеріалу у колбу об'ємом 750 мл (в якій попередньо простерилізовано композицію А (від ДР 5.1.1) додаємо в асептичних умовах розчин композиції Б (від ДР 5.1.2) та В(від ДР 5.1.3). Перемішують і розливають в 3 стерильні колби Ерленмейєра об'ємом 750 мл по 125 мл у кожному.

У пробірку з робочою культурою *C. glutamicum* KY9218, вирощену на МПА, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки. Колби ставлять на вирощування на качалку (180±10 об/хв) при температурі 30-32 °C упродовж 48год. Після вирощування у стерильних умовах усі колби зливають у засівну колбу і передають на стадію ТП.6.5 [63-67].

#### *ТП 6.5. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л*

В боксі в асептичних умовах у спеціальний засівний бачок (ЗП-24) для

асептичної передачі зливають Композицію А (від ДР 5.2.1.), Композицію Б (від ДР 5.2.2.) та Композицію В (від ДР 5.2.3.) перемішують і отриманий розчин асептично через конектор передають у інокулятор (*Ін-26*). Вмикають перемішуючий пристрій. Через засівну колбу вносять 0,378 л посівного матеріалу від ТП 6.4. Культивують при  $t = 30 \pm 2$  °С з частотою обертів перемішуючого пристрою  $220 \pm 10$  об/хв. і постійною аерацією (значення  $pO_2 = 20\text{--}30$  % від насиченого повітря) впродовж 80 год. Проби відбирають кожні 8 год. і перевіряють накопичення рівня біомаси. Отриманий посівний матеріал подається на наступну стадію ТП 6.6.

*ТП 6.6. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 60 л*

В інокулятор (*Ін-33*) об'ємом 60 л з готовою композицією Б (від ДР 5.3.2.) за допомогою насоса (*Н-33*) перекачують розчин композиції А (від ДР 5.3.1.). В інокулятор за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал, вирощений в інокуляторі (*Ін-26*) об'ємом 5 л (від ТП 6.5). Вирощування в інокуляторі (*Ін-33*) здійснюють упродовж 80 год при перемішуванні ( $160 \pm 10$  об/хв). Здійснюється температурний контроль ( $30 \pm 2$  °С), контроль аерації (значення  $pO_2 = 40\text{--}50$  % від насиченого повітря). Для регулювання температури вирощування посівного метеріалу в рубашку подається холодна вода чи глуха пара. Проби відбирають кожні 8 год і перевіряють накопичення рівня біомаси. Посівний матеріал подається на наступну стадію ТП 6.7.

*ТП 6.7. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 630 л*

В інокулятор (*Ін-41*) об'ємом 630 л з готовою композицією Б (від ДР 5.4.2.) за допомогою насоса (*Н-36*) перекачують розчин композиції А (від ДР 5.4.1.) В інокулятор за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал, вирощений в інокуляторі (*Ін-33*) об'ємом 60 л (від ТП 6.6). Вирощування в інокуляторі (*Ін-41*) здійснюють упродовж 80 год при перемішуванні ( $160 \pm 10$  об/хв). Здійснюється температурний контроль ( $30 \pm 2$  °С), контроль аерації (значення  $pO_2 = 40\text{--}50$  % від насиченого повітря). Для регулювання температури вирощування посівного метеріалу в рубашку

подається холодна вода чи глуха пара. Проби відбирають кожні 8 год і перевіряють накопичення рівня біомаси. Посівний матеріал подається на наступну стадію ТП 7.1.

## **ТП 7. Біосинтез триптофану**

### *ТП 7.1. Виробниче культивування*

Вирощування основної культури продуцента проводять в ферментері (*Фр-49*) загальним об'ємом  $6,3 \text{ м}^3$  (робочий об'єм  $3,78 \text{ м}^3$ ).

У ферментері (*Фр-49*) вже міститься підготовленої і простерилізованої композиції Б (від ДР 5.5.2). потім за допомогою насоса (*Н-44*) перекачують розчини композиції А (від ДР 5.5.1.). В апарат за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал, вирощений в інокуляторі (*Ін-41*) об'ємом 630 л (від ТП 6.7).

Вмикають перемішуючий пристрій і подають на початку процесу культивування стиснене стерильне повітря зі швидкістю перемішування  $160 \pm 10$  об/хв, витрати повітря 0,2 л/л-хв. Температура культивування підтримується на рівні  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Далі автоматично кожні 8 год подається від ДР 5.1. підживлюючий розчин сахарози та амонію сульфату від ДР 5.2. за допомогою насосу (*Н-20*, *Н-23*) подають у ферментер (*Фр-49*) з розрахунку 11 г/л та 3,3 г/л відповідно кожні 8 годин. Тривалість процесу становить 80 год. Проби відбирають кожні 8 год і перевіряють накопичення рівня біомаси та концентрацію триптофану, процес ферментації вважається завершеним, якщо продуцент насинтезував достатню концентрацію триптофану (58 г/л) і якщо час ферментації наблизився до 80 годин.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ БІОСИНТЕЗУ

Упродовж культивування періодично (кожні 8 год.) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси і триптофану, а також вмісту джерела вуглецю, вміст азоту.

### 7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль проводять за допомогою розсіву зразків відповідного розведення культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованими середовищами різного складу та мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають петлею на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром для виявлення бактерій, з сусло-агаром або глюкозо-картопляним агаром для виявлення грибів та дріжджів. Чашки Петрі поміщають у термостат (30°C) на 24 год до одержання ізольованих колоній бактерій, грибів та дріжджів. Після цього отримані зразки колоній аналізують мікроскопіюванням [68].



Рис. 7.1. Колонії *C. glutamicum* KY9218 на селективному поживному середовищі

На м'ясопептонному агарі (МПА) колонії діаметром (2,0–5,0) мм, плескаті, матові, непрозорі, від світло-бежевого до бежевого кольору, край нерівний, центр незначно вищий. Структура зерниста, середньозерниста [14].

					НУХТ БТЕК 04.02.26. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шульга М.О.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркушів
		Сулейко ТЛ.					72	88
Консультант					Кафедра БТМ <sup>72</sup>			
Н.Контр.								
Затвердив		Стабніков В.П.						

Для мікроскопіювання використовують препарати «роздавлена крапля». Приготування препарату «роздавлена крапля». Препарат готується на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю дистильованої води. З дотриманням правил асептики бактеріологічною петлею у воду вносять невелику кількість культуральної рідини, розмішують і накривають покривним скельцем. Не слід вносити велику кількість культури, оскільки препарат буде густим і малопридатним для спостереження. Не можна допускати утворення бульбашок повітря під покривним склом. За надлишку води її видаляють фільтрувальним папером. Мікроскопування здійснюють без імерсії, збільшення 90х [68].

При відсутності у зразку сторонньої мікрофлори можна побачити клітини *C. glutamicum* KY9218 (рис. 7.2). Клітини мають видовжену форму, розміром  $(0,7-1,0) \times (1,0-3,0)$  мкм (рис. 7.2) [68].

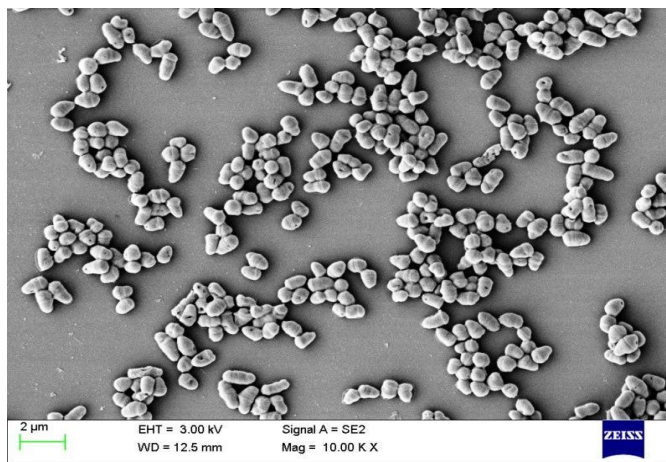


Рис.7.2. Мікрофотографія *C. glutamicum* KY9218

## 7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

### 7.2.1. Концентрація біомаси

Біомаса визначалася гравіметрично. Цей метод використовується для оцінки зростання мікроорганізмів у рідких середовищах.

Для визначення біомаси проводять три послідовні операції: доводять масу центрифужної пробірки до постійного значення, відділяють мікробні клітини від культуральної рідини та визначають їхню масу.. Біомаса виявляється у грамах та міліграмах на літр культуральної води. [68-70].

### Хід виконання роботи

### *Виділення мікроорганізмів центрифугуванням або фільтрацією.*

Доведення маси пробірок до постійного значення. З цією метою фільтри, заздалегідь встановлені у центрифужні пробірки поміщують в сушильну шафу і висушують протягом 1-2 год. при температурі 80-85°C і 90-100°C відповідно. Потім чашку Петрі з фільтрами або центрифужні пробірки виймають з сушильної шафи і переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм ( $\text{CaCl}_2$ ) або концентрованою сірчаною кислотою. Ексикатор ставлять біля аналітичних вагів, на яких проводитиметься зважування. За годину фільтри (центрифужні пробірки) зважують з точністю до 0,0001 г. Висушування і зважування повторюють, дотримуючи вказану послідовність операцій, поки маса не досягне постійного значення, тобто коливання в її визначеннях не перевищать  $\pm 0,0001$  г [70].

Відділення мікроорганізмів від середовища можливо здійснити завдяки фільтруванню або центрифугуванню, для цього точно вимірний об'єм культуральної рідини 5-10 мл, фільтрують через фільтр. Підкисленою дистильованою водою промивають осад на фільтрі. Мембранні фільтри використовуються для відділення бактерій. Для того щоб зрозуміти, який фільтр використовувати, нам потрібно визначити біомасу клітинми.. Цей фільтр поміщають на пористу пластинку утримувача, вставленого в колбу. Для того щоб прискорити фільтрування, колбу підключають до водоструменевого насосу. Осад кілька разів промивають підкисленою дистильованою водою [69].

### **Результати роботи**

#### *Визначення біомаси.*

Для того, щоб визначити кількість біомаси беруть центрифужну пробірку з осадом клітин поміщають в сушильну шафу, висушують і далі зважують. Режим висушування і зважування такий, який використовували і при визначенні маси пробірок або фільтрів. Суху біомасу визначають по формулі 5.1:

$$M = \frac{(A - B)1000}{V} \quad (5.1.)$$

де М – суха біомаса в г/л; А – маса центрифужної пробірки (фільтру) з осадом в г; В – маса центрифужної пробірки (фільтру) без осаду в г;

V – об'єм культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) в мл.

Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища і ретельністю зважування [68].

### **7.2.2. Концентрація джерела вуглецю**

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування триптофану є сахароза. Концентрацію сахарози визначають у сернатанті, одержаному центрифугуванням культуральної рідини.

**Визначення концентрації сахарози** здійснюється за допомогою прискореного фотоколориметричного методу на основі хлористого трифенілтетразолійхлориду (ТТХ).

*Принцип методу* заснований на відновленні цукром безбарвного трифенілтетразолійхлориду (ТТХ) з утворенням червоного формаза. Інтенсивність забарвлення пропорційне концентрації сахарози в пробі [68].

Визначення починають з побудови калібрувального графіка. Готують стандартний розчин, який містить 500 мкг безводної глюкози в 1 мл. Із нього роблять серію розведень, з яких беруть по 1 мл у чисті пробірки, додають по 0,5 мл води, 1 мл 1 н. розчину NaOH та по 0,5 мл ТТХ. Пробірки поміщають у киплячу водяну баню на 3 хв, далі швидко охолоджують у воді із льодом і відразу додають 3 мл бутанолу, збовтують, потім після розшарування рідини із верхнього забарвленого шару відбирають 0,5 мл і переносять у пробірку з 3 мл чистого бутанолу. Пробу колориметрують на фотоелектроколориметрі з зеленим світлофільтром (довжина хвилі 610-750 нм) у кюветах шириною 3 мм. У кювету з контролем наливають чистий бутанол.

За отриманими точками будують калібрувальний графік відкладаючи на горизонтальній осі концентрацію розчину глюкози у мкг, на вертикальній

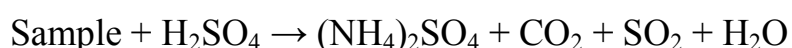
осі величину екстинкції.

*Хід визначення.* Пробу відділяють від бактерій шляхом центрифугування. Для цього у суху пробірку вносять від 0,1 до 0,8 мл проби (кількість залежить від того, скільки очікується цукру у середовищі у даний момент), доводять об'єм проби до 0,8 мл дистильованою водою (якщо беруть на аналіз 0,8 мл, воду не добавляють) та вносять 0,2 мл 10 % сірчаної кислоти. Пробірку поміщають у киплячу водяну баню на 5 хв, охолоджують у воді зі льодом, нейтралізують 0,35 мл 5 % розчином NaOH, доводять об'єм дистильованою водою до 1,5 мл. Потім доливають 1 мл 1 н. розчину NaOH та 0,5 мл 0,5 % водного розчину ТТХ, перемішують, нагрівають у киплячій водяній бані протягом 5 хв. Потім пробу швидко охолоджують у воді зі льодом і відразу добавляють 3 мл бутанолу. Пробірку енергійно збовтують, після розшарування рідини з верхнього забарвленого шару відбирають 0,5 мл та переносять у пробірку з 3 мл чистого бутанолу. Пробу збовтують, щоб перемішати її вміст, та колориметрують на фотоелектроколориметрі із зеленим світлофільтром (довжина хвилі 610-750 нм) у кюветах шириною 3 мм (у кюветі з контролем знаходиться чистий бутанол).

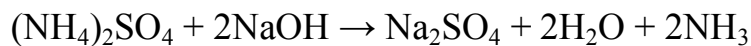
По отриманій величині екстинкції за калібрувальним графіком знаходять вміст глюкози в мкг. При визначенні сахарози отриману величину слід помножити на коефіцієнт 0,95, щоб отримати вміст сахарози [68].

### **7.2.3. Концентрація джерела азоту**

Найчастіше використовуваним методом кількісного визначення аміаку як у водних, так і в неводних середовищах є пряме титрування після поглинання аміаку надлишком кислоти. Титрування проводять із індикаторами, для яких рН переходу знаходиться в інтервалі 4-5. Найбільш поширений титриметричний метод був запропонований К'ельдалем в 1883 р. Відповідно до цього методу пробу, що містить органічні та неорганічні сполуки азоту, розкладають кип'ятінням із сірчаною кислотою в присутності каталізатора, азот переходить у сульфат амонію [69].

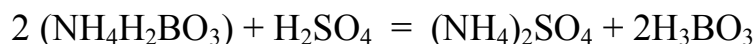


Потім суміш додають луг і відганяють аміак, що утворився, який поглинається надлишком титрованої сірчаної кислоти. Надлишок кислоти відтитрують лугом. Як поглинаючий аміак розчину зручно використовувати 4%-ний розчин борної кислоти.



Зручність обумовлена тим, що розчин борної кислоти не змінюється при зберіганні в посуді зі скла, при поглинанні аміаку не потрібно точно відмірювати об'єм розчину, що поглинає, і використовувати титрований розчин лугу.

При взаємодії аміаку з борною кислотою утворюється борат, який потім титрують кислотою. Аміак, кількісно перегнаний з парою, збирається в поглинаючому розчині. Вміст азоту в зразку визначається кількістю поглинутого аміаку. Титрування проводять із використанням кольорових індикаторів або потенціометричним методом. Існує два методи титрування: пряме (використовують борну кислоту) і зворотне (використовують сірчану і соляну кислоту):



Для лабораторій, у яких відбувається постійний аналіз великої кількості зразків, ми будемо використовувати автоматичний аналізатор K1100F з блоком розкладання SH220N.



*Рис. 7.3.* Автоматичний аналізатор амонійного азоту методом Кьельдаля Nanon K1100F з блоком розкладання SH220N.

Така система забезпечить автоматизований точний аналіз з мінімальними трудовитратами [70].

#### **7.2.4. Концентрація цільового продукту**

Для визначення триптофану в кормових концентратах найчастіше використовується метод високоефективної рідинної хроматографії, який вимагає високочистих реактивів, хроматографічних колонок, що є доволі затратним.

Метод капілярного зонального електрофорезу традиційно порівнюють з високоефективною рідинною хроматографією, оскільки в обох методах розділення проходить в обмеженому просторі (капілярі або колонці) з участю рухомої рідкої фази (буферного розчину або елюента) і для реєстрації сигналів використовують подібні принципи детектування і програмної обробки даних.

Перевагами капілярного методу електрофорезу є: висока ефективність розділення зразка; невеликий об'єм аналізованої проби і буферів, при цьому практично непотрібне застосування високочистих, дорогих органічних розчинників; відсутність колонки, сорбента, швидкість досліджень.

Метод капілярного електрофорезу, в основі якого закладено електрокінетичні явища - електроміграція іонів та інших заряджених частинок і електроосмос. Якщо розчин знаходиться в тонкому капілярі то електричне поле, яке знаходиться вздовж капіляра, викликає в ньому рух заряджених частинок і пасивний потік рідини, в результаті чого проба розділяється на індивідуальні компоненти, так як параметри електроміграції специфічні для кожного виду заряджених частинок.

Дослідження проводили за допомогою системи капілярного електрофорезу «Капель-105/105М» із позитивною полярністю джерела високої напруги (внутрішній діаметр капіляру 50 мкм, повна довжина капіляру 75 см, ефективна довжина 65 см), оснащена спеціальним програмним забезпеченням на основі персонального комп'ютера [71] .



Рис. 7.4. «Капель-105/105М»

Згідно з методикою випробувань, було проведено підготовку капіляра до роботи, шляхом почергового промивання його розчинами кислоти, лугу, бідистильованої води і буферу. Досліджуваний розчин попередньо фільтрували через целюлозо-ацетатний фільтр з розміром пор 0,2 мкм і діаметром 25 мм, виробництва фірми «SARTORIUS STEDIUM». Для калібрування приладу застосовували стандартний зразок триптофану із вмістом діючої речовини не менше 99,0 %, виробництва фірми «Sigma», США. Перевірку стабільності калібрувального графіку проводили за допомогою контрольного розчину, аналізуючи його три рази в умовах, відповідних аналізу.

Зразки культуральної рідини суспендували бідистильованою водою, підігрітою до 40 °С, струшуючи 10 хв. за допомогою шутель-апарату, а також застосовували додаткове розведення.

Аналіз зразків проводили за відповідних параметрів приладу, які наведено нижче.

#### Параметри приладу «Капель-105/105М»

<b>Вихідні компоненти (в порядку виходу)</b>	триптофан
<b>Введення проби</b>	30 мбар, 10 сек
<b>Довжина хвилі, нм</b>	200
<b>Напруга кВ</b>	25
<b>Температура, °С</b>	30
<b>Ведучий електроліт</b>	Буферний розчин

Для визначення вмісту триптофану у КР за результатами вимірювань стандартних розчинів триптофану з різною концентрацією треба побудувати калібрувальний графік та перевірено його стабільність за допомогою

контрольного розчину, аналізуючи не менше двох разів в умовах, відповідних аналізу градуйованого розчину [71].

## ЛІТЕРАТУРА

1. *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.
2. *Hermann T.* Industrial Production of amino acid by coryneform bacteria / Т. Hermann // *J. Biotechnol.* – 2003. – V. 104 – P. 155-172.
3. *Жданова Н. И.* Методы селекции и свойства штаммов микроорганизмов – продуцентов амінокислот / Н. И. Жданова, М. М. Гусятинер // *Обзор. информ. ВНИИ СЭНТИ*, 1985. – 64 с.
4. *S. Shulga, A. Tkachenko, N. Beyko, A. Khomenko, G. Andriiash* Tryptophan production by *Corynebacterium glutamicum*// *New Biotechnology*. – 2012. – V. 29 – P. 63.
5. *Veldmann KH, Dachwitz S, Risse JM, Lee J-H, Sewald N and Wendisch VF* Bromination of L-tryptophan in a Fermentative Process With *Corynebacterium glutamicum*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2019. – V. 7– P. 219.
6. *Новіцька О. В.* Біотехнологія у ветеринарній медицині. Посібник для підготовки студентів та магістрантів в аграрних ВНЗ 3-4 рівнів акредитації з напрямку «Ветеринарна медицина», Національного університету біоресурсів і природокористування / О. В. Новіцька // 2009. – 1096 с.
7. *Ібатулін І.І., Бащенко М.І., Жукорський О.М., Мельник Ю.Ф.* Довідник з повноцінної годівлі сільськогосподарських тварин – К.: Аграрна наука. – 2016. – 332 с.
8. *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.
9. *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

10. *Підгорський В. С.* Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В. С. Підгорський, Г. О. Іутинська, Т. П. Пирог // К.: Наук. думка, 2010. – 328 с.
11. *Hermann T.* Industrial Production of amino acid by coryneform bacteria / Т. Hermann // J. Biotechnol. – 2003. – V. 104 – P. 155-172.
12. *Жданова Н. И.* Методы селекции и свойства штаммов микроорганизмов – продуцентов аминокислот / Н. И. Жданова, М. М. Гусятинер // Обзор. информ. ВНИИ СЭНТИ, 1985. – 64 с.
13. *Коломиец Э.И., Лобанок А.Г.* Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: Логвин, 2007. – 402 с.
14. *S. Shulga, A. Tkachenko, N. Beyko, A. Khomenko, G. Andriiash* Tryptophan production by *Corynebacterium glutamicum*// New Biotechnology. – 2012. – V. 29 – P. 63.
15. *Иззатизаде К. Ф.* Нарушение обмена серотонина в патогенезе заболеваний нервной системы / К. Ф. Иззатизаде, А. В. Баша, Н. Демчук // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2004. – № 9. – С. 62 – 70.
16. *Киричек Л. Т.* Перспективы клинического применения стресспротекторов / Л. Т. Киричек, Е. Г. Дубенко, А. В. Перепелица [и др.] // Клиническая фармакология. – 2009. – № 2. – С. 116-119.
17. *Katsumata, R., Ikeda, M.* Hyperproduction of Tryptophan in *Corynebacterium glutamicum* by Pathway Engineering//Nat Biotechnol. – 1993. – V. 11– P. 921–925.
18. *Masato Ikeda & Ryoichi Katsumata* Tryptophan Production by Transport Mutants of *Corynebacterium glutamicum*,// Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 1995. – V. 59– P. 1600-1602
19. *Veldmann KH, Dachwitz S, Risse JM, Lee J-H, Sewald N and Wendisch VF* Bromination of L-tryptophan in a Fermentative Process With *Corynebacterium glutamicum*. Front. Bioeng. Biotechnol. – 2019. – V. 7– P. 219.

20. Пат. № RU2111247C1 РФ, способ получения штамма микроорганизма, способ продуцирования триптофана/ Л. Гюнтер Вих[DE], Вальфред Ляйнфельдер[DE], Кейт Бэкман[US]– Оpubл. 20.05.1998.
21. *L B Lobyreva, E L Ruban* Effect of cysteine on the tryptophan synthetase activity of *Candida utilis* 295t// *Mikrobiologiya*. – 1971. – V. 40– P. 596-598
22. Пат. № US5563052A USA Process for producing L-tryptophan/ Ryoichi Katsumata Masato Ikeda – Оpubл. 1996-10-08.
23. *Пирог Т.П.* Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – С. 262
24. Научный журнал открытого доступа «Thpanorama» [Электронный ресурс]. Режим доступа : <https://lt.thpanorama.com/articles/biologa/corynebacterium-glutamicum-charactersticas-taxonoma-morfologa-cultivo.html>
25. *Ебігейл Кох Керфгес Ніна Пфельцер Лаура Платцен Марко Олдіге с Майкл Ботт*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetica*, Том 1827, выпуск 6 , червень 2013 , сторінки 699-708
26. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.actino.jp/DigitalAtlas/subwin.cgi?target=1-2>  
*Corynebacterium glutamicum ATCC 13032*
27. Научный журнал открытого доступа: <https://whymashen.wordpress.com/2011/03/28/corynebacterium-glutamicum/>
28. Научный журнал открытого доступа «BacDive» The Bacterial Diversity Metadatabase [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://bacdive.dsmz.de/strain/3092>
29. *Горшкова Н. В.*, «Разработка эффективных методов интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому метилотрофных бактерий и коринебактерий на основе системы транспозиции фага *mu*»- Москва 2018

30. Константиновой А. А. «исследование влияния концентрации глюкозы на рост и развитие *Corynebacterium glutamicum*»- Университет БГНИК. ,Белгород, 2017
31. «US National Library of Medicine National Institutes of Health» Науковий журнал відкритого доступу [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5310272/>
32. Науковий журнал відкритого доступу [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://bvi.rusf.ru/taksa/s0037/s0037118.htm>
33. S. Shulga, A. Tkachenko, N. Beyko, A. Khomenko, G. Andriiash Tryptophan production by *Corynebacterium glutamicum*// New Biotechnology. – 2012. – V. 29 – P. 63.
34. Veldmann KH, Dachwitz S, Risse JM, Lee J-H, Sewald N and Wendisch VF Bromination of L-tryptophan in a Fermentative Process With *Corynebacterium glutamicum*. Front. Bioeng. Biotechnol. – 2019. – V. 7– P. 219.
35. Новіцька О. В. Біотехнологія у ветеринарній медицині. Посібник для підготовки студентів та магістрантів в аграрних ВНЗ 3-4 рівнів акредитації з напрямку «Ветеринарна медицина», Національного університету біоресурсів і природокористування / О. В. Новіцька // 2009. – 1096 с.
36. Ібатулін І.І., Бащенко М.І., Жуковський О.М., Мельник Ю.Ф. Довідник з повноцінної годівлі сільськогосподарських тварин – К.: Аграрна наука. – 2016. – 332 с.
37. Різничук І.Ф. Продуктивність поросят при використанні комбікорму зі зниженою концентрацією кальцію і фосфору/І.Ф. Різничук//Хранение и переработка зерна. – 2016. – № 1 (198). – С. 65–67
38. Римбак М., Хаммер Й. Усвояемые аминокислоты – строительный материал для поддержки и продуктивности// Успех в хлеву. – 2003. – № 7. – С. 3-6.
39. Церенюк О.М. Повноцінна годівля свиней // Агробізнес сьогодні. – 2015. – № 6. – С. 56 – 58.

40. Навчальна дисципліна – санітарія і гігієна [Електронний ресурс] // Режим доступу:

[https://www.lnu.edu.ua/life-safety/wp-content/uploads/2020/03/SG\\_PR-4\\_SR\\_2020.pdf](https://www.lnu.edu.ua/life-safety/wp-content/uploads/2020/03/SG_PR-4_SR_2020.pdf)

41. Дезінфекція : метод. вказ. для самост. роботи студентів 5-го курсу мед. фак-ту з дисципліни «Епідеміологія» / упоряд. Т. О. Чумаченко, М. В. Райлян, Ю. І. Поливянна та ін. – Харків : ХНМУ, 2020. – 12 с

42. *Хлорантоин* - дезинфекционное средство [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.farmakos.ua/hlor.html>.

43. *Люлина Н. В.* Стандарты подготовки помещений // Чистые помещения и технологические среды. – 2014. – №1 (53).

44. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://ips.ligazakon.net/document/TM034894>

45. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.bsmu.edu.ua/blog/4296-miyni-zasobi-za-i-proti/>

46. Класифікація миючих засобів: миючі та дезінфікуючі засоби. Правила застосування миючих та дезінфекційних засобів, умови та терміни їх зберігання. Види миючих засобів Як діляться синтетичні миючі засоби за призначенням. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://craftstationshop.ru/uk/the-state/klassifikaciya-moyushchih-sredstv-moyushchie-i-dezinficiruyushchie.html>

47. Використання профхімії на підприємствах відповідно до стандарту хасп. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://officem.com.ua/uk/eksperty-rekomendujut/vikoristannja-profhimii-na-pidprijemstvah-vidpovidno-do-standartu-hassp>

48. *Изучение* фармакологических свойств нового комбинированного лекарственного средства трипто фана с тиотри-азолином / Л. И. Кучеренко, И.Ф. Бе леничев, И. А. Мазур [и др.] // Рецепт. – 2016. – Т. 19, No 6. – С. 696–703.

49. *Біологія клітин* [Електронний ресурс]. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання / уклад.: В.О. Красінько, І.М. Волошина. – К.: НУХТ, 2014. – 147 с.
50. *Люлина Н. В.* Стандарти подготовки помещений // Чистые помещения и технологические среды. – 2014. – №1 (53).
51. *Винаров А.Ю., Кухаренко А.А., Панфилов В.И.* Лабораторные и промышленные ферментеры. – М.: РХТУ, 2004. – 487 с.
52. *Пилотные ферментеры | Пилотная ферментация – БИОТЕХНО* [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://biotechno.ru/catalog/pilotnie-fermentery/>
53. *Биомой – предстерилизационное средство* [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.farmakos.ua/bimoj.html>.
54. *Божков А.И.* Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты. – Харьков, 2005. – 364 с.
55. *Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів»* від 14.12.2001. – № 502.
56. *Люлина Н. В.* Стандарти подготовки помещений // Чистые помещения и технологические среды. – 2014. – №1
57. *Продукция НПО "Фармакос".* [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.farmakos.ua/prod.html>
58. *Біологія клітин* [Електронний ресурс]. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання / уклад.: В.О. Красінько, І.М. Волошина. – К.: НУХТ, 2014. – 147 с.
59. *.Церенюк О.М.* Повноцінна годівля свиней // Агробізнес сьогодні. – 2015. – № 6. – С. 56 – 58.
60. *Пирог Т.П., Ігнатова О.А.* Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336с

61. ФЯП – воздушный фильтр грубой очистки [Электронный ресурс] // Вентиляторный завод «Укрвентсистемы» – Режим доступа: <http://www.ukrvent.com/fyay.html>.

62. Калганова, Т. Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии: лабораторные работы / Т. Н. Калганова. – Южно-Сахалинск: СахГУ, 2011. – 56 с..

63. *Біологія клітин* [Електронний ресурс]. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання / уклад.: В.О. Красінько, І.М. Волошина. – К.: НУХТ, 2014. – 147 с.

64. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ., 2010. – 632 с.

65. BE2100 – датчик определения оптической плотности биомассы [Электронный ресурс] // Абтек – Режим доступа: <http://abtek.ru/product/monitoring-bioprocenza-i-kontrol-kachestva/datchiki-dlya-bioprocenza/be2100-datchik-opredeleniya-opticheskoy-plotnosti-biomassy/>

66. *Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації «Фармацевтична хімія. Аналіз препаратів біотехнологічного виробництва»* / За загальною редакцією професора В.А. Георгіянци. – Харків: 2013. – 215 с.

67. *Загальні харчові технології* [Електронний ресурс]: лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051301 «Хімічна технологія» ден. форми навч. / уклад. Н.І. Сабадаш. О.В. Грабовська. О.В. Подобій – К.: НУХТ, 2014. – 122 с.

68.Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: консп. лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч форм навч. – К.: НУХТ, 2019. 60 с

69.Бакушинская О. А., Белова Л. Д., Буканова В. И., Лозенко М. Ф., Семихатова Н. М. Контроль производства хлебопекарных дрожжей. – М., 1978. – 165 с.

70. *Межгосударственный* стандарт ГОСТ 32195–2013 (ISO 13903:2005).  
Корма, комбикорма. Метод определения содержания азота.– М.:  
Стандартинформ. – 2014.

71. *Межгосударственный* стандарт ГОСТ 13496.21-87. Корма,  
комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения лизина и  
триптофана.– М.: Стандартинформ. – 2011.