

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)

(ім'я та прізвище)

« » лютого 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНИКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« » лютого 2025 р.

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 лізину *Corynebacterium glutamicum*

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

НАБІГУЗ Валерія Олегівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник ЛИЧ Інна Валентинівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Валентин МОЦАР

(ім'я та прізвище)

(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 – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” листопада 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

НАБІГУЗ Валерії Олегівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи « Біосинтез лізину *Corynebacterium glutamicum* »

керівник роботи ЛИЧ Інна Валентинівна, к.б.н., доц.,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05 листопада 2024 року № 932-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 07.01.2025

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Corynebacterium glutamicum*, цільовий продукт:
лізин, об'єм ферментера: 63 м³, коефіцієнт заповнення: 0,5

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):

Реферат, Вступ, РОЗДІЛ 1. Характеристика лізину. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4.
Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис
технологічної схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу лізину - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу лізину - 2 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика лізину</i>	<i>01.11.2024-02.11.2024</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>03.11.2024-10.11.2024</i>	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>11.11.2024-20.11.2024</i>	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>21.11.2024-30.11.2024</i>	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>01.12.2024-11.12.2024</i>	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>12.12.2024-22.12.2024</i>	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>23.12.2024-05.01.2025</i>	
8.	<i>Охорона довкілля</i>	<i>06.01.2025-20.01.2025</i>	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>21.01.2025-07.02.2025</i>	

Здобувач

(підпис)

Валерія НАБІГУЗ

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Інна ЛИЧ

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схеми біосинтезу лізину з використанням у якості продуцента *Corynebacterium glutamicum* К-8, котрий після 40 год синтезує лізин у концентрації 221,3 г/л. Лізин планується використовувати у якості кормової добавки при вирощуванні свиней для підвищення приросту тварин. Теоретично-розрахована потужність виробництва лізину – 294 515 кг на рік.

Технологічний процес охоплює як допоміжні операції (підготовка аераційного повітря, титрувальних агентів, запасних розчинів мікроелементів, попередня обробка бурякової патоки, стерилізація поживних середовищ), так і основний процес, що включає п'ять етапів вирощування посівного матеріалу і подальший біосинтез у ферментері об'ємом 63 м³, з коефіцієнтом заповнення 0,5. Технологія виробництва лізину базується на одностадійному глибинному періодичному способі культивування. Розроблено карту постадійного контролю допоміжних робіт та технологічного процесу з наведенням методів контролю концентрації біомаси, джерела азотного та вуглецевого живлення, а також методик визначення концентрації лізину.

Кваліфікаційна робота викладена на 104 сторінках, містить 16 таблиць, 7 рисунків, складається зі вступу, 8 розділів, списку використаної літератури (53 найменувань), 6 додатків, технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 2 аркуші) схем.

Ключові слова: лізин, біосинтез, *Corynebacterium glutamicum* К-8, кормова добавка, технологічна схема

ABSTRACT

The diploma is devoted to the development of a technological and hardware scheme for the biosynthesis of lysine using *Corynebacterium glutamicum* K-8 as a biological agent, which synthesizes lysine at a concentration of 221.3 g/l after 40 hours of cultivation. Lysine is planned to be used as a feed additive in pig farming to increase animal growth. The theoretically calculated capacity of lysine production is 294,515 kg per year.

The technological process includes both auxiliary operations (preparation of aeration, titration agents, stock solutions of trace elements, pre-treatment of beet molasses, sterilization of nutrient media), and the main process, which includes five stages of seed cultivation and subsequent biosynthesis in a fermenter with a volume of 63 m³, with a filling factor of 0.5. The technology for the production of lysine is based on a single-stage periodic cultivation method. A map of stage-by-stage control of auxiliary works and the technological process, indicating methods for controlling the concentration of biomass, sources of nitrogen and carbon nutrition have been developed, as well as methods for determining the concentration of lysine.

The qualification work is presented on 104 pages, contains 16 tables, 7 figures, consists of an introduction, 8 chapters, a list of used literature (53 items), 6 appendices, technological (format A1, 1 sheet) and hardware (format A1, 2 sheets) schemes.

Key words: Lysine, biosynthesis, *Corynebacterium glutamicum* K-8, feed additive, technological scheme

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІЗИНУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента.....	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки продуцента	19
2.2.1. Морфолого-культуральні ознаки.....	19
2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	20
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	22
3.1. Потреба у лізині.....	22
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	23
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів і геометричного об'єму ферментера.....	24
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу.....	25
3.5. Біосинтез цільового продукту.....	26
3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	26
3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт...	28
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	32
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	32
4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря для одержання лізину.....	34
4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування <i>Corynebacterium glutamicum</i> К-8.....	35
4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту.....	37
4.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	37

4.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах в інокуляторі об'ємом 6,3 л..	38
4.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах в інокуляторі об'ємом 63 л..	39
4.4.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах в інокуляторі об'ємом 630 л..	40
4.4.5. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах в інокуляторі об'ємом 6,3 м ³ ..	41
4.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу лізину у ферментері об'ємом 63 м ³	42
4.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника.....	43
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	45
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	51
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	61
7.1. Мікробіологічний контроль.....	61
7.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю.....	62
7.2.1. Визначення вмісту вуглецю.....	62
7.2.2. Визначення вмісту азоту.....	63
7.3. Визначення концентрації біомаси та лізину.....	64
7.3.1. Визначення концентрації біомаси.....	64
7.3.2. Визначення концентрації лізину.....	64
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	70
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва на місця емісії рідких, твердих та газоподібних відходів.....	70
8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	72
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	72
8.2.2. Системи знешкодження газоподібних відходів.....	73
8.2.3. Системи знешкодження та утилізації твердих відходів.....	74
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	77
ДОДАТКИ.....	84

ВСТУП

Лізин є однією з найважливіших незамінних амінокислот, необхідних для нормального функціонування організму як людини, так і тварин. Оскільки лізин не синтезується ендогенно, він має надходити з раціону, що особливо важливо для сільськогосподарських тварин, яким потрібне повноцінне харчування для підтримання високої продуктивності. Лізин є ключовою амінокислотою, яка сприяє синтезу білків, зміцненню імунної системи, утворенню гормонів та ферментів. Його дефіцит у кормах призводить до порушень обміну речовин, затримки росту та погіршення продуктивності у тваринництві.

Актуальність роботи полягає у необхідності забезпечення глобального попиту на лізин у зв'язку зі збільшенням інтенсивності сільського господарства. Сучасні породи свиней, птиці та інших сільськогосподарських тварин мають високі вимоги до рівня амінокислот у раціоні, зокрема лізину, який є першою лімітуючою амінокислотою у кормах, що базуються на зернових культурах. Використання лізинових добавок дає змогу збільшити ефективність конверсії корму, підвищити прирости ваги та знизити витрати на протеїнові джерела. Додавання цієї амінокислоти до кормів сприяє зниженню використання білкових джерел, що мають високу вартість, таких як соєвий шрот, і дозволяє скоротити екологічний вплив тваринництва за рахунок зменшення викидів азоту.

Новизна полягає у вдосконаленні біотехнологічних методів біосинтезу лізину. Сьогодні широко використовуються мікроорганізми, такі як *Corynebacterium glutamicum*, які завдяки генетичній модифікації здатні виробляти лізин із високою ефективністю [1]. Задля підвищення ефективності виробництва лізину зі змішаного цукру, були розроблені системи метаболізму вуглеводів, щоб підвищити ефективність використання цукру. Виробництво лізину було додатково збільшено завдяки заміні фосфоенолпіруват-залежної системи поглинання глюкози та фруктози інозитолпермеазами та АТФ-залежною глюкокіназою.

					НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Набігуз В.О.			ВСТУП	Лім.	Арк.	Акрушів
Консульт.							8	2
Керівник		Лич І.В.				8		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

Сучасні підходи включають оптимізацію метаболічних шляхів, використання відновлюваних сировинних джерел, таких як меляса або кукурудзяний екстракт, а також автоматизацію процесів культивування.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІЗИНУ

Лізин є однією з найважливіших амінокислот, які входять до складу білків [7]. Він відрізняється наявністю ω -аміногрупи, яка надає молекулі позитивного заряду у нейтральних розчинах. Будучи незамінною амінокислотою, лізин не може бути синтезований багатоклітинними організмами, такими як людина чи тварини, що робить його отримання ззовні життєво важливим. Існують два основні біосинтетичні шляхи лізину: через α -аміноадипінову кислоту і діамінопімелінову кислоту, кожен з яких характеризується певними ферментативними реакціями і проміжними продуктами [2,3].

З хімічної точки зору, лізин має брутто-формулу $C_6H_{14}N_2O_2$ (рис. 1), а його молярна маса складає 146 г/моль. Лізин має високу температуру плавлення, яка дорівнює $260\text{ }^\circ\text{C}$, і температуру кипіння - $368\text{ }^\circ\text{C}$. Він добре розчиняється у воді (14,87 г/100 мл при $20\text{ }^\circ\text{C}$), що робить його доступним для біохімічних процесів, проте є слабо розчинним в етанолі та нерозчинним в етиловому ефірі. Ці фізико-хімічні властивості визначають його поведінку у різних середовищах і процесах [2].

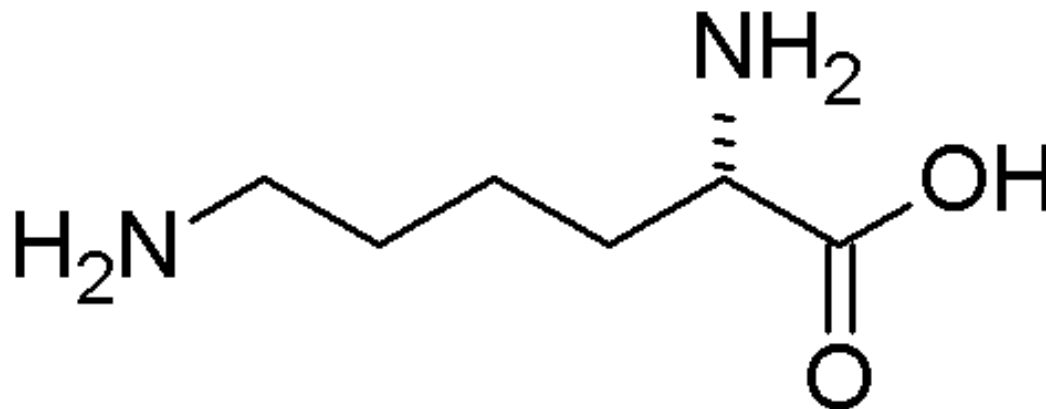


Рис. 1. Будова лізину

L-форма лізину є біологічно активною і відіграє важливу роль у метаболізмі людини та тварин, тоді як D-форма є біологічно неактивною і може бути токсичною. Лізин сприяє абсорбції кальцію, підтримує баланс азоту в організмі, сприяє утворенню колагену, відновленню тканин і бере участь у синтезі алкалоїдів,

					НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Набігуз В.О.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІЗИНУ	Лім.	Арк.	Акрушів
Консульт.							10	2
Керівник		Лич І.В.				10		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

аналогічних нікотину. Він також знижує рівень тригліцеридів у крові [2].

Медичне значення лізину є надзвичайно важливим через його численні функції в організмі людини. Він служить важливим субстратом для синтезу оксиду азоту (NO), молекули, яка має широкий спектр біологічних дій. NO відіграє ключову роль у регуляції судинного тонуусу, що впливає на артеріальний тиск, а також бере участь у процесах імунної відповіді, сприяючи знищенню патогенів і пухлинних клітин. Крім того, NO регулює нейротрансмісію, що має значення для функціонування нервової системи [2,3].

Недостатність лізину в організмі може призводити до різних захворювань, таких як головний біль, запаморочення, підвищена чутливість до шуму, зниження апетиту, нудота, блювота, порушення ферментативної активності, анемія, лейкемія, виснаження та проблеми з репродуктивною функцією. Дефіцит лізину також може проявлятися в почервонінні очей, випадінні волосся, дратівливості та загальній слабкості [2].

Актуальність дослідження методів виробництва лізину визначається його необхідністю для нормального функціонування людського організму. Лізин важливий не тільки для людей, але й для рослинних організмів і тварин. У тваринництві лізин використовується як кормова добавка, що сприяє збільшенню продуктивності тварин і покращенню якості продукції [2,3].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента

Мікробіологічні методи синтезу амінокислот засновані на тому, що багато мікроорганізмів мають здатність накопичувати значні кількості таких продуктів. Мікроорганізми, що накопичують амінокислоти, широко використовуються, але не багато з них є економічно вигідними продуцентами. Зазвичай їх отримують шляхом застосування різних мутагенних чинників. У більшості випадків, необхідно, щоб продуцент накопичував переважно один вид амінокислоти. За одночасної наявності декількох амінокислот, особливо якщо вони мають схожі фізико-хімічні властивості, їх виділення та очищення ускладнюється [4].

На сьогоднішній день для промислового виробництва L-лізину використовують різні види мікроорганізмів, такі як: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium lilium*, *Brevibacterium divaricatum* та *Escherichia coli*.

Corynebacterium glutamicum К-8 – цей штам відомий своїм високим виходом лізину, адже дозволяє отримати найбільшу кількість лізину (221,3 г/л) серед розглянутих продуцентів після 48 год культивування, проте потребує складного середовища з факторами росту, таких як біотин та тіамін [1]. В той же час було розглянуто *Corynebacterium glutamicum* АНР-3 – також відомий своїм потенціалом для виробництва лізину. Він може бути підданий генетичній модифікації для поліпшення виходу лізину та оптимізації виробничих процесів. Продукує лізин при 40°C, кінцевий титр якого складає 85 г/л через 28 год [5].

Corynebacterium glutamicum ХQ-5 – ще один представник корінебактерій, здатних до продуктивного синтезу лізину (189 г/л). Проте серед розглянутих продуцентів даний потребує найтривалішого культивування – 72 год [6].

					НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Набігуз В.О.			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						12	10
Керівник		Лич І.В.			Кафедра БТМ 12		
Н. Контр.							
Зав.каф.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА							

На додаток до цього наявний штам *Corynebacterium glutamicum* JL-6, що продукує лізин у кількості 181,5 г/л після 48 год культивування [7].

Цих даних недостатньо для остаточного визначення оптимального продуцента, тому у табл. 2.2. наведено аналіз вартості поживних середовищ, а також умовну вартість 1 г амінокислоти (табл. 2.3).

Порівняльна характеристика продуцентів лізину

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація амінокислоти, г/л	Параметри культивування	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
<i>Corynebacterium glutamicum</i> К-8	Глюкоза Меляса Кукурудзяний екстракт (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ ×7H ₂ O FeSO ₄ MnSO ₄ L-метіонін Біотин Тіамін-НСІ Полісорбат-80	80 40 30 50 1,5 1 0,02 0,02 0,5 0,0024 0,4 0,002	48	221,3	Культивування у колбах на качалках при 220 об/хв, 30°C, рН 7,2	Xu, J. Z., Ruan, H. Z., Yu, H. B., Liu, L. M., & Zhang, W. (2020). Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in <i>Corynebacterium glutamicum</i> for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar. <i>Microbial Cell Factories</i> , 19, 1-15.
<i>Corynebacterium glutamicum</i> АНР-3	Глюкоза CaCl ₂ ×2H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ ×7H ₂ O NaCl FeSO ₄ ×7H ₂ O MnSO ₄ ×4H ₂ O L-серин Біотин	100 1 20 0,4 0,05 0,01 0,01 0,0001 0,0005	28	85	Культивування у колбах на качалках при 140 об/хв, 40°C, рН 7	Liu, J., Xu, J. Z., Rao, Z. M., & Zhang, W. G. (2022). Industrial production of L-lysine in <i>Corynebacterium glutamicum</i> : Progress and prospects. <i>Microbiological Research</i> , 262, 127101.

Закінчення табл. 2.1

<i>Corynebacterium glutamicum</i> XQ-5	Глюкоза Меляса Кукурудзяний екстракт (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ SO ₄ MgSO ₄ ×7H ₂ O FeSO ₄ MnSO ₄ Біотин Тіамін-НСІ	70 50 20 50 2 1,5 0,03 0,02 0,6 0,3	72	189	Культивування у біореакторі на 5 л при 220 об/хв, 30°C, рН 7,0	Liu, N., Zhang, T. T., Rao, Z. M., Zhang, W. G., & Xu, J. Z. (2021). Reconstruction of the diaminopimelic acid pathway to promote L-lysine production in <i>Corynebacterium glutamicum</i> . <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 22(16), 9065
<i>Corynebacterium glutamicum</i> JL-6	Глюкоза Меляса Кукурудзяний екстракт (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ ×7H ₂ O FeSO ₄ MnSO ₄ L-метіонін Біотин Тіамін-НСІ Полісорбат-80	80 40 30 50 1,5 1 0,02 0,02 0,5 0,0024 0,4 0,002	48	181,5	Культивування у колбах на качалках при 220 об/хв, 30°C, рН 7,0	Xu, J. Z., Wu, Z. H., Gao, S. J., & Zhang, W. (2018). Rational modification of tricarboxylic acid cycle for improving L-lysine production in <i>Corynebacterium glutamicum</i> . <i>Microbial cell factories</i> , 17, 1-13.

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів лізину

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Corynebacterium glutamicum</i> К-8	Глюкоза	80	100	8	1
	Меляса	40	160	6,4	2
	Кукурудзяний екстракт	30	35	1,05	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	50	65	3,25	4
	KH ₂ SO ₄	1,5	117	0,1755	5
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1	70	0,07	6
	FeSO ₄	0,02	48	0,00096	7
	MnSO ₄	0,02	208	0,00416	8
	L-метіонін	0,5	107	0,0535	9
	Гліцин-бетаїн	0,05	250	0,0125	10
	Біотин	0,0024	1000	0,0024	11
	Тіаміну хлорид	0,4	3600	1,44	12
	Полісорбат-80	0,002	320	0,00064	13
Вартість 1 л середовища – 20,45966 грн					
<i>Corynebacterium glutamicum</i> АНР-3	Глюкоза	100	100	10	1
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	1	80	0,08	14
	(NH ₄) ₂ SO ₄	20	65	1,3	4
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	70	0,028	6
	NaCl	0,05	44	0,0022	15
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	48	0,00048	7
	MnSO ₄ ×4H ₂ O	0,01	208	0,00208	8
	L-серин	0,0001	2440	0,000244	16
	Біотин	0,0005	1000	0,0005	11
Вартість 1 л середовища – 11,413654 грн					

Закінчення табл. 2.2

<i>Corynebacterium glutamicum</i> XQ-5	Глюкоза	70	100	7	1
	Меляса	50	160	8	2
	Кукурудзяний екстракт	20	35	0,7	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	50	65	3,25	4
	KH ₂ SO ₄	2	117	0,234	5
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,5	70	0,105	6
	FeSO ₄	0,03	48	0,00144	7
	MnSO ₄	0,02	208	0,00416	8
	Біотин	0,6	1000	0,6	11
	Тіаміну хлорид	0,3	3600	1,08	12
	Вартість 1 л середовища – 20,975 грн				
<i>Corynebacterium glutamicum</i> JL-6	Глюкоза	80	100	8	1
	Меляса	40	160	6,4	2
	Кукурудзяний екстракт	30	35	1,05	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	50	65	3,25	4
	KH ₂ SO ₄	1,5	117	0,1755	5
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	1	70	0,07	6
	FeSO ₄	0,02	48	0,00096	7
	MnSO ₄	0,02	208	0,00416	8
	L-метіонін	0,5	107	0,0535	9
	Гліцин-бетаїн	0,05	250	0,0125	10
	Біотин	0,0024	1000	0,0024	11
	Тіаміну хлорид	0,4	3600	1,44	12
	Полісорбат-80	0,002	320	0,00064	13
Вартість 1 л середовища – 20,45966 грн					

Примітка: * - Ціни вказано станом на червень 2024 р.:

- https://prom.ua/p1559560315-glyukoza-fasovka-1kg.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_produkty_pitaniya&gad_source=1&gclid=EAlaIqobChMIi7i87YnWhgMV6xiiAx2TKQxpEAYQBCABEGKI7vD_BwE.
- https://ribanuti.com/melasa-naturalna-3k-baits-1000ml-003424?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiA19e8BhCVARIsALpFMgF2BjmW6d3KiN2EpCLhJZWAKP_edKNIEd_KrpzAKv_0HLMVoGmWraAaAuetEALw_wcB.
- https://prom.ua/p1310282824-ekstrakt-kukurudzyanijlitriv.html?token=v2%3A4hrHB2aht1H9MAmYXP0N20NZ3HEguphiJbWwFtSnnvw8cd7JaFmnNDanvVig5c_2ZjNd1rilyE8bnZ_b8KZ1WeFm2imiC9_g2iOPQMsvRjX-UnW7kyZ2-

wDNnav2ESz&campaign_id=2133948&product_id=1310282824&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=ru&category_ids=11308&primelead=MS4yNzU&from_spa=true.

4. https://prom.ua/ua/p1756705032-sulfat-amoniyuamonij.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_b2b_265945592&gad_source=1&gclid=EAIAIqobChMIInsqxhKPWhgMVdEZBAh05AgKREAYYBiABEGLxsfD_BwE.

5. <https://prom.ua/ua/p384762451-monokalijfosfat-kalij-fosfornokislyj.html?&primelead=MC44NQ>.

6. https://green-chief.com.ua/ru/sulfat-magniya-1kg/?gad_source=1&gclid=EAIAIqobChMI7pzixaTWhgMVRBiiAx281Aj6EAQYCCABEGJfvd_BwE.

7. https://together.biz.ua/p/1750749?gad_source=1&gclid=EAIAIqobChMIo4G8_aTWhgMVo1SRBR1MogPUEAYYAiaABEGltY_D_BwE.

8. <https://flagma.ua/marganec-hloristy-4-h-vodny-o3316899.html>.

9. <https://flagma.ua/uk/metionin-o11450325.html>.

10. <https://flagma.ua/uk/betain-organichniy-kormoviy-96-vid-1kg-o13770724.html>.

11. <https://flagma.ua/uk/biotyn-kormoviy-vitamin-v7-o16392112.html>.

12. https://profiprot.com.ua/p1802034946-vitamin-tiaminprofiprot.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=EAIAIqobChMI0OCF2ajWh.

13. <https://prom.ua/ua/p1091935103-polisorbat.html>.

14. https://prom.ua/p1740408918-kaltsij-hloristyj-1kg.html?token=v2%3AR5dy3UKx3C0hi6hc7XtcB_xKcKb_xAbcULx7Tt6_fOSiHGLirgejvW3m3IHhRpF1MNVrLgYfnUUpRzir7dANd7U24jhSFreQfSlcBg_jJtrqk36RMRkZsOD4oY4CKgJ&campaign_id=25226886&product_id=1740408918&source=prom%3Asearch%3Atag%3Aserp&locale=ru&category_ids=8020313&from_spa=true.

15. https://klebrig.com.ua/ua/p1855737967-sol-ekstraklebrig.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gad_source=1&gclid=EAIAIqobChMIjdpgqvWhgMV2mWRBR3XdAD5EAQYASABEGIVAvD_BwE.

16. https://prom.ua/p617652512-serin-ser-100g.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_sport_i_otdykh&gad_source=1&gclid=EAIAIqobChMIuMDH9avWhgMVnAMGAB11AguYEAQYAiABEGIGdPD_Bw.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г лізину

Біологічний агент	Концентрація амінокислоти, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної амінокислоти за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Corynebacterium glutamicum</i> К-8	221,3	40	5,5325	20,45966	0,092
<i>Corynebacterium glutamicum</i> АНР-3	85	28	3,0357	11,413654	0,134
<i>Corynebacterium glutamicum</i> XQ-5	189	72	2,7	20,975	0,111
<i>Corynebacterium glutamicum</i> JL-6	181,5	40	4,5375	20,45966	0,112

З даних, наведених у таблиці 2.2, зрозуміло що *Corynebacterium glutamicum* К-8 має вищу ціну за 1 л поживного середовища (22,782 грн) у порівнянні з *Corynebacterium glutamicum* АНР-3 (11,41 грн), однак і продуктивність у штаму К-8 більша, ніж у АНР-3, до того ж умовна вартість 1 г лізину, синтезованого з використанням даного штаму, є у 1,2 рази нижчою, порівняно з *Corynebacterium*

glutamicum JL-6 та у 1,45 разів нижча ніж за *Corynebacterium glutamicum* АНР-3. Зважаючи на вище згадані аргументи, у якості основного продуцента лізину будемо використовувати *Corynebacterium glutamicum* К-8.

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки продуцента

2.2.1. Морфолого-культуральні ознаки

Corynebacterium glutamicum є грам-позитивною, непатогенною бактерією з паличкоподібними клітинами. Вони мають розміри 1.0-3.0 мкм у довжину та 0.5-1.0 мкм в діаметрі. Клітини часто формують короткі ланцюжки або скупчення, що нагадують "V"-подібні фігури або китайську букву (рис. 3.1). Ця морфологічна ознака є характерною для представників роду *Corynebacterium* і дозволяє легко ідентифікувати цей вид під мікроскопом [8].

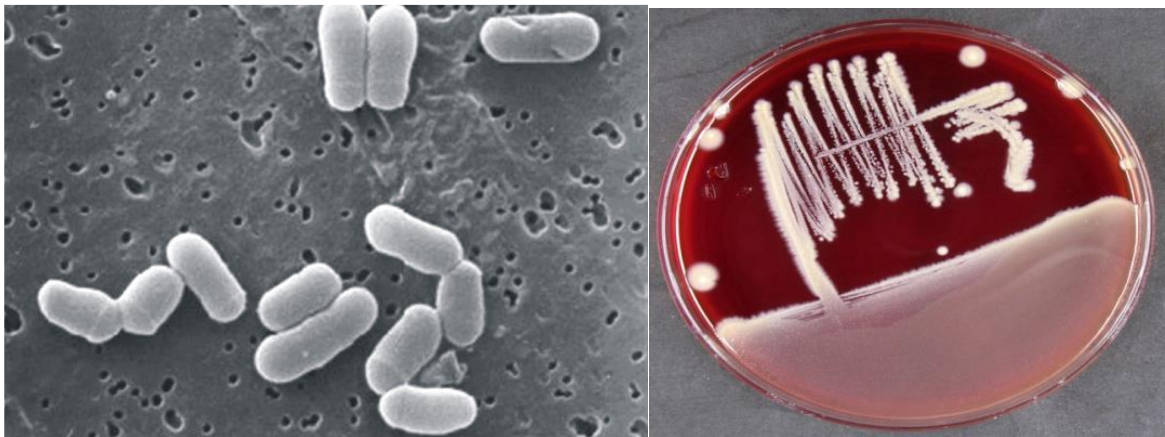


Рис. 2.1. Морфологічні (зліва) та культуральні (справа) ознаки *Corynebacterium glutamicum* К-8

На твердих поживних середовищах, таких як агаризоване середовище М9 або LB-агар, колонії *C. glutamicum* зростають повільно. Вони досягають розміру 1-3 мм у діаметрі після 48 годин інкубації при температурі 30°C. Колонії мають круглу форму, гладку поверхню і рівні краї. Колір колоній варіює від білого до кремового, що є типовим для даного виду [1,8].

Для оцінки культуральних ознак було використано різні середовища. На агарі Чапека колонії мають діаметр 2-3 мм, кремовий колір та гладку поверхню. Це середовище дозволяє оцінити загальні морфологічні характеристики колоній. На мальц-агарі колонії досягають діаметру 1-2 мм після 48 годин інкубації, вони є більш пігментованими порівняно з колоніями на інших середовищах, що свідчить про

різницю в метаболічній активності на різних поживних середовищах. У рідких культуральних середовищах, таких як М9 або LB-бульйон, клітини формують рівномірну суспензію. Оптимальна аерація забезпечує максимальний ріст і продуктивність біосинтезу лізину [1,8,9].

Оптимальні умови для росту *C. glutamicum* К-8 включають температуру 30°C і рівень рН 7.0-7.4. Цей мікроорганізм є факультативним анаеробом, тому для його росту необхідна присутність кисню. Відповідні фізіолого-біохімічні умови забезпечують ефективне використання субстратів, таких як глюкоза, що перетворюється на лізин через біосинтетичний шлях. Крім того, даний мікроорганізм здатний використовувати інші вуглеводи, такі як сахароза та лактоза, як джерела енергії, що свідчить про його високий метаболічний потенціал [8,9].

Таким чином, *Corynebacterium glutamicum* К-8 демонструє характерні морфолого-культуральні ознаки, які дозволяють ідентифікувати цей штам і використовувати його для промислового біосинтезу лізину. Вибір цього штаму обґрунтовано його високою продуктивністю, стійкістю до умов культивування та ефективним використанням різних субстратів, що робить його ідеальним кандидатом для біотехнологічних процесів [8,9].

2.2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки

Corynebacterium glutamicum К-8 є факультативним анаеробом, тобто він може рости як в умовах наявності кисню (аеробні умови), так і в його відсутності (анаеробні умови). Цей мікроорганізм є гетеротрофним, що означає, що для отримання енергії і вуглецю він використовує органічні сполуки. Для ефективного росту і продукції лізину необхідно підтримувати певні фізіологічні умови. Оптимальна температура для росту *C. glutamicum* К-8 становить 30°C. Підтримання температури здійснюється за допомогою термостатичних систем, що забезпечують стабільність умов культивування. Оптимальний рівень рН для росту мікроорганізму становить 7.0-7.4. Для підтримки цього рівня використовуються буферні розчини або автоматичні системи додавання кислоти чи лугу [10].

Розчинений кисень підтримується на оптимальному рівні за допомогою контролю аерації та перемішування. Це забезпечує достатнє постачання кисню для

метаболічних процесів. Висока концентрація джерела вуглецю (наприклад, глюкози) та джерела азоту (наприклад, амонію) є необхідними для максимального росту і продукції лізину. Концентрація поживних речовин регулярно моніториться і підтримується шляхом додавання підживлювальних розчинів [9,10].

C. glutamicum К-8 активно асимілює різні вуглеводи, такі як глюкоза, фруктоза, лактоза, сахароза, та інші. Це свідчить про високий метаболічний потенціал цього штаму. Основні процеси включають гліколіз, пентозофосфатний шлях та цикл трикарбонових кислот (ЦТК), які забезпечують енергію та попередники для біосинтезу лізину. Біосинтез лізину у *C. glutamicum* К-8 відбувається ефективніше в періодичному процесі культивування, оскільки максимальне утворення амінокислот досягається у стаціонарній фазі росту мікроорганізмів. Тривалість культивування становить близько 48 годин, при цьому вихід лізину може досягати 100 г/л за оптимальних умов [10,11].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Таксономічне положення *Corynebacterium glutamicum* К-8 [12]:

Домен - *Bacteria*

Відділ - *Actinobacteria*

Клас - *Actinobacteria*

Порядок - *Mycobacteriales*

Родина - *Corynebacteriaceae*

Рід - *Corynebacterium*

Вид - *Corynebacterium glutamicum*

Штам - *Corynebacterium glutamicum* К-8

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у лізині

Лізин є однією з найважливіших незамінних амінокислот, що широко застосовується як кормова добавка у тваринництві. Білки є важливими компонентами корму. Вони складаються з 20 протеїногенних амінокислот, які виділяються під час перетравлення білків корму. З цих будівельних блоків тварина синтезує свої типові білки, тобто свійська птиця, свині тощо, усі вони мають власний видоспецифічний спектр амінокислот. Багато амінокислот тварина може синтезувати самостійно. У випадку інших, так званих незамінних амінокислот, тварина покладається на амінокислоти, які надходять з їжею. Рослинні корми також мають власний характерний спектр амінокислот, який відрізняється від тваринного. Загалом встановлено, що незамінні амінокислоти, метіонін, лізин і треонін присутні лише в обмежених кількостях у сирих кормових матеріалах [13].

Лізин додається до кормових раціонів для птиці, молочних корів, свиней і риби, особливо коли рівень білка з інших джерел, таких як соєвий шрот і кукурудза, недостатній. Як амінокислота, яка бере участь у синтезі білка, вона допомагає оптимізувати ріст тварин або збільшити виробництво молока. Також зміцнює імунітет тварин. Крім того, лізин у кормах зменшує тяжкість, тривалість лікування та рецидиви герпесу у тварин [14].

Сучасні підходи до годівлі тварин передбачають постійне оновлення вимог до поживності раціонів, зокрема щодо амінокислотного складу. Для забезпечення ефективного засвоєння кормів і задоволення потреб тварин сучасних порід у незамінних амінокислотах важливо точно визначати їхній вміст у комбікормах, враховуючи специфічні потреби в різні періоди росту [15].

Вирощування свиней є перспективною галуззю в Україні завдяки високому попиту на свинину та швидкому циклу виробництва. Використання лізину як кормової добавки сприяє підвищенню приросту тварин [15].

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Набігуз В.О.</i>			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							22	10
<i>Керівник</i>		<i>Лич І.В.</i>				22		
<i>Н. Контр.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Зав.каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Лізин додається до раціону тварин у відносно невеликих кількостях, зазвичай складаючи близько 1-2% від добової норми корму, хоча рекомендовані дози можуть відрізнятися залежно від виробника. Кількість лізину також варіюється з віком тварини — молодим свиням під час інтенсивної відгодівлі необхідно більше. Тому розглянемо середньодобове споживання корму при відгодовуванні свиней, як показано в таблиці 3.1 [15].

Таблиця 3.1

Середньодобове споживання корму свинею в залежності від віку

Вік	Денна норма корму на добу	Всього (г)
5 місяців	2 250 г	67 500
6 місяців	2 550 г	76 500
7 місяців	3 200 г	96 000
8 місяців	3 350 г	100 500
Всього:		340,5 кг

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Станом на 2024 рік у Київській області утримується приблизно 620,4 тисячі голів свиней. Це один із найвищих показників серед усіх регіонів України [16]. Припустивши, що з даної кількості приблизно 90 % вирощуються на забій, отже загальна кількість свиней для розрахунку становитиме:

$$620,4 \text{ тис.} \times 0,9 = 588,4 \text{ тис. голів}$$

Тобто кількість корму для свиней на відгодовуванні становитиме:

$$340,5 \text{ кг} \times 588,4 \text{ тис. голів} = 200\,350\,200 \text{ кг}$$

За даними середньостатистичних рекомендацій виробників кормових добавок, у період відгодовування свиней до раціону слід включати 1,0–1,5% кормової добавки з лізином [17] від загальної маси споживаного корму, отже

$$200\,350\,200 \text{ кг} \times 0,015 = 3\,005\,253 \text{ кг}$$

Врахуємо, що в кормових добавках вміст лізину становить приблизно 98-99 % від загального об'єму [18], тому для даної кількості необхідно виробити наступну кількість лізину:

$$3\,005\,253 \text{ кг} \times 0,98 = 2\,945\,148 \text{ кг}$$

На сьогоднішній день в Україні немає масштабного виробництва лізину, здатного повністю покрити потреби внутрішнього ринку. Лізин, як важливу кормову добавку, Україна здебільшого імпортує з інших країн, зокрема з Китаю, США, Європейського Союзу, має високу виробничу потужність для випуску амінокислот. Тому прийmemo, що частка лізину вітчизняного виробництва становитиме 10 % від загального обсягу ринку:

$$2\,945\,148 \text{ кг} \times 0,10 = 294\,515 \text{ кг}$$

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

Для розрахунку кількості виробничих циклів потрібно знати кількість робочих днів та тривалість виробничого циклу:

$$N_{\text{цк}} = 24 \times T_{\text{рд}} / T_{\text{цф}}$$

Отже прийmemo, що $T_{\text{рд}} = 110$ днів.

Тривалість виробничого циклу становитиме: $T_{\text{цф}} = 50$ год (40 год культивування [1] + 10 год обслуговування ферментера). Тобто,

$$N_{\text{цк}} = 24 \times 110 / 50 = 53 \text{ цикли}$$

Розрахувавши кількість виробничих циклів, дізнаємося кількість біомаси, яка вироблятиметься за один цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{гп}} / N_{\text{цк}} = 294\,515 / 53 = 5557 \text{ кг/цикл}$$

Розрахувавши кількість продукту яка отримується за один цикл, врахуємо кількість культуральної рідини з врахуванням втрат при виділенні, необхідної для отримання даної кількості продукту:

$$V_{\text{кр}} = K_1 \times G_{\text{цк}} \times C_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \times 5557 \times 0,9 / (221,3 \times (1 - 0,1)) = 28 \text{ м}^3$$

де: K_1 - коефіцієнт запасу нестерильних операцій; $C_{\text{гп}}$ - частка сухих речовин в готовому продукті; $P_{\text{кр}}$ - концентрація лізину; $E_{\text{св}}$ - втрата продукту при виділенні.

За один виробничий цикл отримують 28 м³ культуральної рідини, так як під час ферментації відбуваються втрати культуральної рідини в результаті краплиносу (10%), кількість культуральної рідини з врахуванням даних втрат, становитиме:

$$V_{\phi} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\phi}) = 28 / (1 - 0,1) = 31 \text{ м}^3,$$

де E_{ϕ} - втрата культуральної рідини при краплиносі.

З врахуванням коефіцієнту заповнення, приблизний геометричний об'єм ферментера становитиме:

$$V_{\text{пф}} = V_{\phi} / K_3 = 31 / 0,5 = 62 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий ферментер з стандартним геометричним об'ємом 63 м³, тоді дійсний коефіцієнт заповнення становитиме:

$$K_{3\phi} = V_{\text{кр}} / V_{\text{пф}} = 31 / 63 = 0,49$$

Дане значення коефіцієнту заповнення, знаходиться в допустимих межах для аеробного процесу ферментації, отже, обраний ферментер задовольняє наші вимоги.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу

Виробниче культивування *Corynebacterium glutamicum* К-8 для отримання лізину проводиться у ферментері об'ємом 63 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5. Робочий об'єм ферментера складає:

$$V_{\text{роб}} = 63 \times 0,5 = 31,5 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 31,5 м³ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб1}} = 31,5 \times 0,1 = 3,15 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті об'ємом 6,3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5.

Для засіву посівного апарату (одержання 3,15 м³ культуральної рідини) необхідно:

$$V_{\text{роб2}} = 3,15 \times 0,1 = 0,315 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у посівному апараті об'ємом 0,63 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5.

0,315 м³ (315 л) культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб3}} = 315 \times 0,1 = 31,5 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом 0,063 м³ (63 л) з коефіцієнтом заповнення 0,5.

Для одержання 31,5 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб4}} = 31,5 \times 0,1 = 3,15 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість посівного матеріалу одержують культивуванням біологічного агента в інокуляторі об'ємом 6,3 л.

Для отримання 3,15 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб5}} = 0,315 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням бактерій в трьох качалочних колбах об'ємом 500 мл по 105 мл поживного середовища в кожній.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу лізину у ферментері об'ємом 63 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде проходити у п'ять етапів.

3.5. Біосинтез цільового продукту

3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Для вирощування бактерій *Corynebacterium glutamicum* К-8 джерелом енергії та вуглецю є глюкоза [1]. Зважаючи на те, що у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [19] схему катаболізму глюкози у *Corynebacterium glutamicum* К-8 не наведено, для побудови шляху метаболізму глюкози обираємо найбільш спорідненого організму – *Corynebacterium glutamicum* ATCC-13032.

Згідно з припущенням та використанням як основи для створення шляху катаболізму глюкози гліколіз, або ж шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса, котрий представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, наводимо схему перетворення глюкози.

Глюкоза за участі ферменту глюкокінази (КФ.2.7.1.2) перетворюється на глюкозо-6-фосфат, котра в свою чергу під дією глюкозо-6-фосфатізомераз (КФ.5.3.1.9) перетворюється на фруктозо-6-фосфат. За допомогою 6-фосфотруктокінази (КФ.2.7.1.11) відбувається активація перетворення фруктозо-6-фосфату у фруктозо-1,6-дифосфат. Фруктозодифосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13) каталізує утворення дигідроксиацетонфосфату та гліцеральдегід-3-фосфату з

фруктозо-1,6-дифосфату. Дигідроксиацетонфосфат під дією триозофосфатізомерази (КФ. 5.3.1.1) перетворюється у гліцеральдегід-3-фосфат, останній далі переходить у 1,3-дифосфогліцерат за допомогою ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ.1.2.1.12).

У подальшому 1,3-дифосфогліцерат під дією фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат, із якого в свою чергу утворюється 2-фосфогліцерат під дією 2,3-дифосфогліцерат-залежної фосфогліцератмутази (КФ. 5.4.2.11). Енолаза (4.2.1.11) каталізує перетворення 2-фосфогліцерату на фосфоенолпіруват. Процес закінчується перетворенням фосфоенолпірувати у пірувати за участі піруваткінази (КФ.2.7.1.40).

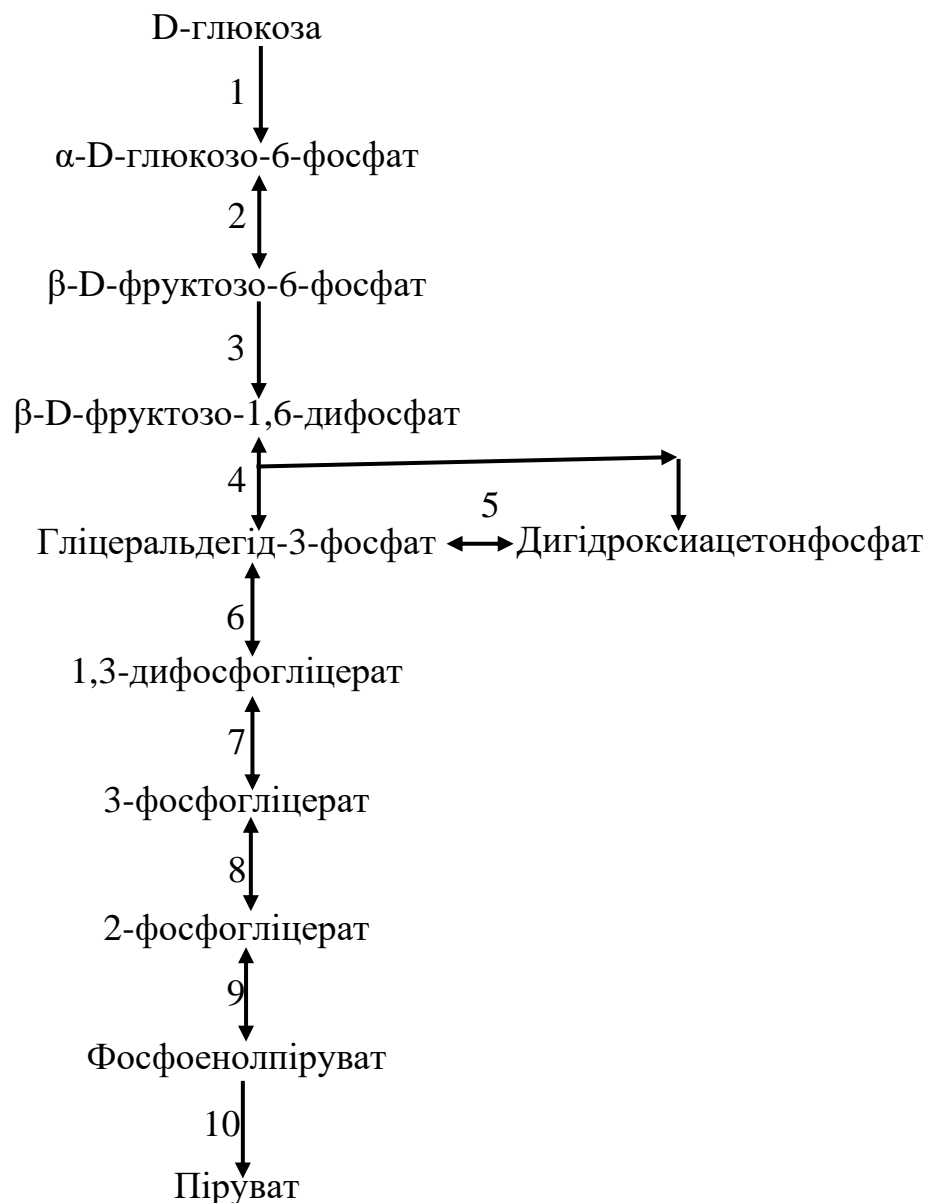


Рис. 3.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса

Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозо-дифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-дифосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Біосинтез лізину при рості *Corynebacterium glutamicum* К-8 на глюкозі починається з перетворення глюкози на α -D-глюкозо-6-фосфат за участі глюкокінази (КФ.2.7.1.2), після чого утворена сполука трансформується у β -D-фруктозо-6-фосфат під дією глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ.5.3.1.9). Далі відбувається гліколіз, в якому фруктозо-6-фосфат за допомогою 6-фосфофруктокінази (КФ.2.7.1.11) перетворюється у фруктозо-1,6-дифосфат. Фруктозодифосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13) каталізує утворення дигідроксиацетонфосфату та гліцеральдегід-3-фосфату з фруктозо-1,6-дифосфату. Дигідроксиацетонфосфат під дією триозофосфатізомерази (КФ. 5.3.1.1) перетворюється у гліцеральдегід-3-фосфат, останній далі переходить у 1,3-дифосфогліцерат за допомогою ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ.1.2.1.12). У подальшому 1,3-дифосфогліцерат під дією фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат. У мікроорганізмі функціонує гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (КФ.1.2.1.9), котра приймає участь у прямому перетворенні гліцеральдегід-3-фосфату у 3-фосфогліцерат, із якого в свою чергу утворюється 2-фосфогліцерат під дією 2,3-дифосфогліцерат-залежної фосфогліцератмутази (КФ. 5.4.2.11). Енолаза (4.2.1.11) каталізує перетворення 2-фосфогліцерату на фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ.2.7.1.40).

Утворений піруват далі перетворюється в ацетил-КоА під дією ферментів піруватдегідрогенази К1 компоненту (КФ.1.2.4.1) та піруватдегідрогенази К2 компоненту (КФ.2.3.1.12), ацетил-КоА далі залучається до циклу трикарбонових кислот. Під дією ферменту цитратсинтази (КФ.2.3.3.1) ацетил-КоА та оксалоацетат, синтезований з пірувату з допомогою ферменту піруваткарбоксилаза (КФ.6.4.1.1),

перетворюються в цитрат, який в подальшому перетворюється в ізоцитрат за допомогою ферменту аконітатгідратази (КФ.4.2.1.3) через цис-аконітат. Ізоцитрат під дією ферменту ізоцитратдегідрогенази (КФ.1.1.1.42) утворює 2-оксоглутарат, котрий в свою чергу з допомогою ферментів 2-оксоглутаратдегідрогенази К1 компоненту (КФ.1.2.4.2), 2-оксоглутаратдегідрогенази К2 компоненту (КФ.2.3.1.61) та альфа-субодиниці сукциніл-КоА синтетази (КФ.6.2.1.5) перетворюється в сукцинат. Фермент сукцинатдегідрогенази (КФ.1.3.5.1) каталізує утворення з сукцинату фумарату, який далі перетворюється у малат під дією фумаратгідратази II класу (КФ.4.2.1.2). Малат під дією ферменту малатдегідрогенази (КФ.1.1.5.4) перетворюється в оксалоацетат.

Анаплеротичними реакціями є карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату під дією піруваткарбоксилази (КФ.6.4.1.1), перетворення фосфоенолпірувату на оксалоацетат під дією фосфоенолпіруваткарбоксикінази (КФ.4.1.1.49), перетворення пірувату на малат під дією оксалоацетат-декарбоксилювальна малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.40).

Для утворення лізину необхідне утворення аспартату з оксалоацетату за діамінопімеліновим шляхом під дією оксалоацетаттрансферази (КФ 2.6.1.1). Далі аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4) каталізує перетворення аспартату в аспартил-4-фосфат, який далі за допомогою аспартатнапівальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.11) синтезує відповідний напівальдегід аспарагінової кислоти. Отриманий продукт утворює (2S,4S)-4-гідрокси-2,3,4,5-тетрагідродипіколінат за каталізу 4-гідрокситетрагідродипіколінат-синтази (КФ 4.3.3.7), котра в подальшому через L-2,3,4,5-тетрагідродипіколінат перетворюється на L-2-аміно-6-оксопімелат під дією 4-гідрокситетрагідродипіколінатредуктази (КФ 1.17.1.8). Синтезований у даній реакції оксопімелат за допомогою діамінопімелатдегідрогенази (КФ 1.4.1.16) утворює мезо-2,6-діамінопімелінова кислота, яка далі декарбоксилюється до лізину під дією діамінопімелатдекарбоксилази (КФ 4.1.1.20).

Ферменти: 1 – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозо-дифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-дифосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 11 – К1 компонент піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1); 12 – К2 компонент піруватдегідрогенази (КФ 2.3.1.12); 13 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 14 – піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1); 15 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 16 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 17 – К1 компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази (КФ 1.2.4.2); 18 – К2 компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази (КФ 2.3.1.61); 19 – альфа-субодиниця сукциніл-КоА синтетази (КФ 6.2.1.5); 20 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 21 – фумаратгідратаза II класу (КФ 4.2.1.2); 22 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.5.4); 23 – фосфоенолпіруваткарбоксихіназа (КФ 4.1.1.49); 24 – оксалоацетат-декарбоксилувальна малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.40); 25 – оксалоацетат-трансфераза (КФ 2.6.1.1); 26 – аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4); 27 – аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 28 – 4-гідрокситетрагідродипіколінат-синтаза (КФ 4.3.3.7); 29 – 4-гідрокситетрагідродипіколінат-редуктаза (КФ 1.17.1.8); 30 – діамінопімелатдегідрогеназа (КФ 1.4.1.16); 31 – діамінопімелатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.20).

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Corynebacterium glutamicum К-8 є факультативним анаеробом, тобто він може рости як в умовах наявності кисню (аеробні умови), так і в його відсутності (анаеробні умови) [1,9]. Цей мікроорганізм є гетеротрофним, тобто для отримання енергії і вуглецю він використовує органічні сполуки. Оптимальні умови для його культивування включають температуру 30°C та рН 7,2. При таких умовах існує ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами, тому важливо забезпечити стерильність усього процесу. Це включає стерилізацію обладнання та комунікацій, компонентів поживного середовища, аераційного повітря, а також усіх речовин, які потрапляють у ферментер. Все ферментаційне обладнання (реактори, трубопроводи, резервуари) повинно бути стерилізоване до початку процесу культивування, що можна здійснити шляхом автоклавування або використання інших методів стерилізації. Всі компоненти поживного середовища (вуглецеві, азотні джерела, мікроелементи, вітаміни) повинні проходити ретельну стерилізацію перед додаванням у ферментер. Зазвичай це досягається шляхом автоклавування середовища. Повітря, яке подається у ферментер для аерації, повинно бути також стерильним. Це досягається використанням фільтрів або інших систем для очищення повітря від мікроорганізмів. Під час процесу культивування можуть додаватися підживлювальні розчини для підтримання концентрації поживних речовин [20].

Культивування *Corynebacterium glutamicum* К-8 проводиться глибинним способом, що означає, що процес відбувається у рідкому поживному середовищі, забезпечуючи рівномірний розподіл кисню і поживних речовин. Незважаючи на переваги безперервного культивування, біосинтез лізину здійснюється у періодичному процесі, оскільки максимальне утворення амінокислот досягається у стаціонарній фазі росту мікроорганізмів [1,9,20].

					НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Набігуз В.О.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ			Літ.	Арк.	Акрушів	
Консульт.									32	13	
Керівник		Лич І.В.						32			
Н. Контр.								Кафедра БТМ			
Зав.каф.		Стабніков В.П.									

Для забезпечення ефективного росту мікроорганізмів і продукції лізину необхідно підтримувати високу концентрацію джерела вуглецю (наприклад, глюкози) та джерела азоту (наприклад, амонію) [9,20].

Процес культивування *Corynebacterium glutamicum* К-8 потребує ретельного моніторингу і контролю наступних параметрів: температура підтримується на рівні 30°C за допомогою термостатичних систем; рН регулюється на рівні 7,2, з використанням буферних розчинів або автоматичних систем додавання кислоти чи лугу; розчинений кисень підтримується на оптимальному рівні за допомогою контролю аерації та перемішування; концентрація поживних речовин регулярно моніториться і підтримується шляхом додавання підживлювальних розчинів. Дотримання всіх перерахованих умов і заходів дозволяє забезпечити ефективне культивування *C. glutamicum* К-8 і максимальний вихід лізину при мінімізації ризику контамінації [20].

Відповідно до раніше зазначених умов, ферментер повинен відповідати наступним вимогам:

1. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою та датчиком температури.
2. Для забезпечення інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувачий пристрій з частотою обертання 250 об/хв.
3. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН.

Таким ферментером є ферментер з механічним перемішуванням барботажного типу об'ємом 63 м³. На відміну від інших ферментерів відрізняється застосуванням оболонки, яка складається з 6-8 ярусів-секцій. Крім того, ферментер має додатковий внутрішній теплообмінний пристрій з площею теплообміну 45 м². Особливістю ферментера є те, що кількість обертів мішалки регулюється безступенево за допомогою тиристорного перетворювача або застосуванням постійного струму для живлення електродвигуна в межах 110-250 об/хв. Апарат споряджений двоярусною мішалкою із закритими турбінками діаметром 600-1000 мм при ширині лопаті 150-

200 мм. Також ферментер розрахований на надлишковий робочий тиск 0,25 МПа. Висота стовпа рідини 5-6 м при висоті апарата більше 8 м [21].

4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря для одержання лізину

Corynebacterium glutamicum К-8 є факультативним анаеробом, що означає його здатність рости як в безкисневих умовах, так і за наявності кисню. Однак для забезпечення оптимальних умов росту та максимальної продуктивності необхідно передбачити стадію підготовки аераційного повітря [9,20].

Першим етапом є забір атмосферного повітря. Цей процес реалізується через забірну шахту з використанням турбокомпресора. Етап проводиться на висоті 2-3 метри від найвищої точки споруди, що становить приблизно 16 метрів, беручи до уваги висоту поверху (6 м), кількість поверхів (2), та нахил даху (близько 1,5 м).

Другий етап – проходження повітря через фільтри попереднього очищення. Попередні фільтри, які іноді називають фільтрами грубого очищення, призначені для уловлювання великих часток, таких як пил. В якості фільтрів попереднього очищення можна використати також губчаті фільтри з модифікованого пінополіуретану [20].

Третій етап – стиснення повітря. Далі повітря піддається стисненню в турбокомпресорі, де цей процес відбувається завдяки відцентровій силі. Ці апарати є складнішими в обслуговуванні, але забезпечують високу продуктивність (від 100 до 1000 м³/хв) і не забруднюють повітря маслом [22].

Четвертий етап - охолодження стисненого повітря за допомогою теплообмінного апарату.

П'ятий етап - підігрів повітря у теплообмінниках.

Шостий етап - видалення зайвої вологи відбувається за допомогою ресивера. Протягом цього етапу також проходить процес вирівнювання тиску попередньо очищеного повітря [20].

Сьомий етап - очищення повітря на головних фільтрах. Відповідний етап дозволяє досягти видалення до близько 98% можливих мікроорганізмів. Широкого поширення у якості фільтруючого матеріалу головних фільтрів одержали волокнисті матеріали. Волокнисті фільтри є фільтрами об'ємної дії, тому що вони розраховані на

вловлювання й нагромадження часток не тільки на поверхні фільтруючого матеріалу, але й і глибині шару [22].

Восьмий етап - очистка повітря за допомогою індивідуальних фільтрів. Від головних фільтрів повітря направляється через колектори до індивідуальних фільтрів третього рівня, які встановлені безпосередньо на кожному ферментері і здатні затримати до 99,999% мікроорганізмів [20].

4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування *Corynebacterium glutamicum* К-8

Максимальний рівень синтезу лізину, який становить 221,3 г/л, досягається при культивуванні мікроорганізму *Corynebacterium glutamicum* К-8 на поживному середовищі з таким складом (г/л) [1]:

- ✓ глюкоза – 80;
- ✓ меляса – 40;
- ✓ кукурудзяний екстракт – 30;
- ✓ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 50;
- ✓ KH_2SO_4 – 1,5;
- ✓ $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1;
- ✓ FeSO_4 – 0,02;
- ✓ MnSO_4 – 0,02;
- ✓ L-метіонін – 0,5;
- ✓ гліцин-бетаїн – 0,05;
- ✓ біотин – 0,0024;
- ✓ тіаміну хлорид – 400 мг;
- ✓ полісорбат-80 – 2 мл.

Згідно з розрахунками, наведеними в підрозділі 3.4, виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 63 м³. Інокулянт отримують у п'ять етапів: спочатку у трьох качалочних колбах, потім в інокуляторах об'ємом 6,3 л, 63 л і 630 л.

Для виробничого біосинтезу передбачено приготування підживлювального розчину глюкози, запасного розчину вітамінів (біотин та тіаміну хлорид) та мікроелементів (FeSO_4 та MnSO_4), так як кількісний склад цих компонентів дуже

малий. Дані, наведені в табл. 4.1, свідчать про те, що для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, а також в інокуляторах об'ємом 6,3 і 63 л необхідно готувати запасний розчин вітамінів (з розрахунку 1 г кожного вітаміну на 100 мл розчину), який вноситиметься в розрахунку 0,1 мл на 100 мл середовища.

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту вітамінів та мікроелементів у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст вітамінів		Вміст мікроелементів	
	біотин	тіаміну хлорид	FeSO ₄	MnSO ₄
0,315	0,75 мг	0,126 мг	6,3 мг	6,3 мг
3,15	7,5 мг	1,26 мг	63 мг	63 мг
31,5	75 мг	12,6 мг	630 мг	630 мг
315	750 мг	126 мг	6,3 г	6,3 г
3150	7,5 г	1,26 г	63 г	63 г
31500	75 г	12,6 г	630 г	630 г

Також в поживному середовищі присутня меляса, яка потребує попередньої підготовки. Цей процес включає освітлення та центрифугування. Після попередньої підготовки меляса використовується для приготування поживного середовища. Стерилізація середовища проводиться разом із термолабільними компонентами.

Обґрунтування підготовки та стерилізації підживлювального розчину

Згідно дослідження Xu et. al. [1] для виробництва L-лізину з *Corynebacterium glutamicum* необхідне приготування підживлюючого розчину, оскільки він підтримує оптимальну концентрацію субстрату, забезпечує енергетичний баланс і сталість метаболічної активності штаму. Це дозволяє уникнути дефіциту цукру, запобігти інгібуванню через його надлишок і досягти максимальної продуктивності процесу та виходу продукту. До складу підживлювального розчину входять (г/л):

- глюкоза – 400;
- меляса – 100;
- (NH₄)₂SO₄ – 40.

Розрахуємо загальну кількість глюкози (X) для приготування підживлювального розчину. Об'єм поживного середовища для виробничого біосинтезу становить 31500 л. Отже:

400 г глюкози міститься в 1 л середовища,

X г глюкози міститься в 31500 л середовища.

$$X = (31500 \times 400) / 1 = 12600000 \text{ г} = 12600 \text{ кг глюкози.}$$

Тепер розрахуємо загальну кількість $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Y) для приготування підживлювального розчину. Об'єм поживного середовища для виробничого біосинтезу становить 31500 л. Отже:

40 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ міститься в 1 л середовища,

Y г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ міститься в 31500 л середовища.

$$Y = (31500 \times 40) / 1 = 1260000 \text{ г} = 1260 \text{ кг } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4.$$

За таким же принципом розраховуємо кількість меляси (A). Отже:

100 г меляси міститься в 1 л середовища,

A г меляси міститься в 31500 л середовища.

$$A = (31500 \times 100) / 1 = 3150000 \text{ г} = 3150 \text{ кг меляси.}$$

Всі компоненти завантажують в один реактор об'ємом 60 м³ та готують концентрований розчин додаючи 14000 л питної води. Стерилізація відбувається при температурі 112 °C протягом 30 хв. Після охолодження у цей же реактор перекачують 6,3 м³ розчину меляси та перемішують. Об'єм підживлювального розчину - 20,3 м³.

Розрахуємо кількість порцій підживлення і об'єм підживлювального розчину для однієї порції. Тривалість процесу біосинтезу лізину становить 40 год. Прийmemo, що підживлення вноситься у середовище кожні 4 год, причому остання порція – за 4 год до кінця процесу біосинтезу. Отже, кількість порцій підживлення становить $(40 - 4) / 4 = 9$. Отже, з кожною порцією підживлення у середовище необхідно внести $20,3 / 9 = 2,25$ м³, або 2250 л підживлювального розчину.

4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту

4.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування початкового посівного матеріалу використовується раніше зазначене поживне середовище. Через невеликий об'єм поживного середовища

стерилізація проводиться в автоклаві. Компоненти поживного середовища поділяються на окремі композиції залежно від режимів стерилізації.

Композиція А: глюкоза, меляса, кукурудзяний екстракт, L-метіонін та гліцин-бетаїн. Стерилізація в автоклаві при температурі 112 °С протягом 30 хвилин.

Композиція Б: KH_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Стерилізація в автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хвилин.

Компоненти композиції А, є термолабільним, тому вони потребують м'якого режиму стерилізації. Солі з композиції Б стерилізуються при стандартній для солей температурі. Біотин та тіаміну хлорид готуються у вигляді запасного розчину вітамінів та стерилізують при 112 °С протягом 30 хвилин в автоклаві. Піногасник на даному етапі вносити не доцільно.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 315 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	80	25,5	А	162
Меляса	40	12,6		
Кукурудзяний екстракт	30	9,45		
L-метіонін	0,5	0,157		
Гліцин-бетаїн	0,05	0,0157		
Вода		127 мл		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50	15,75	Б	153
KH_2SO_4	1,5	0,473		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1	0,315		
Вода		137 мл		
Розчин вітамінів	1 мл	0,32 мл	-	0,32 мл
Розчин мікроелементів	1 мл	0,32 мл	-	0,32 мл

4.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах в інокуляторі об'ємом 6,3 л

Для даного етапу вирощування інокуляту, поживне середовище потрібно поділили на відповідні композиції:

Композиція А: глюкоза, меляса, кукурудзяний екстракт, L-метіонін та гліцин-бетаїн. Стерилізація в автоклаві при температурі 112 °С протягом 30 хвилин.

Композиція Б: KH_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Стерилізація композиції проходить безпосередньо в інокуляторі при температурі 131 °С протягом 40 хвилин.

Компоненти композиції А, є термолабільним, тому вони потребують м'якого режиму стерилізації. Солі з композиції Б стерилізуються при стандартній для солей температурі. Біотин та тіаміну хлорид готуються у вигляді запасного розчину вітамінів та стерилізують при 112 °С протягом 30 хвилин в автоклаві. Піногасник вносимо безпосередньо в поживне середовище без попередньої стерилізації.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6,3 л наведений у табл. 4.3.

Таблиця 4.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6,3 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3150 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	80	252	А	1610
Меляса	40	126		
Кукурудзяний екстракт	30	94,5		
L-метіонін	0,5	1,57		
Гліцин-бетаїн	0,05	0,157		
Вода		1261 мл		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50	157,5	Б	1530
KH_2SO_4	1,5	4,73		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1	3,15		
Вода		1365 мл		
Розчин вітамінів та мікроелементів	1 мл	3,2 мл	-	3,2 мл
Піногасник	2 мл	6,3 мл	-	6,3 мл

4.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах в інокуляторі об'ємом 63 л

Для даного етапу вирощування інокуляту, поживне середовище потрібно поділили на відповідні композиції:

Композиція А: глюкоза, меляса, кукурудзяний екстракт, L-метіонін та гліцин-бетаїн. Стерилізація проходить у збірнику при температурі 112 °С протягом 30 хв.

Композиція Б: KH_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Стерилізація проходить безпосередньо в інокуляторі при температурі 131 °С протягом 40 хвилин.

Компоненти композиції А, є термолабільним, тому вони потребують м'якого режиму стерилізації. Солі з композиції Б стерилізуються при стандартній для солей температурі. Біотин та тіаміну хлорид готуються у вигляді запасного розчину вітамінів та стерилізують при 112 °С протягом 30 хвилин в автоклаві. Піногасник вносимо безпосередньо в поживне середовище без попередньої стерилізації.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 63 л наведений у табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 63 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 31,5 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	80	2520	А	16,1
Меляса	40	1260		
Кукурудзяний екстракт	30	945		
L-метіонін	0,5	15,7		
Гліцин-бетаїн	0,05	1,57		
Вода		14,5 л		
Конденсат		1,61 л	Б	15,3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50	1575		
KH_2SO_4	1,5	47,3		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1	31,5		
Вода		13,77 л		
Конденсат		1,53 л		
Розчин вітамінів та мікроелементів	1 мл	0,032 л	-	0,032
Піногасник	2 мл	0,063 л	-	0,063

4.4.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах в інокуляторі об'ємом 630 л

Для даного етапу вирощування інокуляту, поживне середовище потрібно поділили на відповідні композиції:

Композиція А: глюкоза, меляса, кукурудзяний екстракт, L-метіонін та гліцин-бетаїн. Стерилізація у збірнику при температурі 112 °С протягом 30 хвилин.

Композиція Б: KH_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Стерилізація в автоклаві при температурі 131 °С протягом 40 хвилин.

Компоненти композиції А, є термолабільним, тому вони потребують м'якого режиму стерилізації. Солі з композиції Б стерилізуються при стандартній температурі. Піногасник вносимо безпосередньо в поживне середовище без попередньої стерилізації.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 630 л наведений у табл. 4.5.

Таблиця 4.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 630 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 315 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	80	25200	А	161
Меляса	40	12600		
Кукурудзяний екстракт	30	9450		
L-метіонін	0,5	157		
Гліцин-бетаїн	0,05	15,7		
Вода		145 л		
Конденсат		16,1 л	Б	153
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50	1575		
KH_2SO_4	1,5	47,3		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1	31,5		
Вода		137,7 л		
Конденсат		15,3 л		
Розчин вітамінів та мікроелементів	1 мл	0,32 л	-	0,32
Піногасник	2 мл	0,63 л	-	0,63

4.4.5. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах в інокуляторі об'ємом 6,3 м³

Для даного етапу вирощування інокуляту, поживне середовище потрібно поділили на відповідні композиції:

Композиція А: глюкоза, меляса, кукурудзяний екстракт, L-метіонін, гліцин-бетаїн.

Композиція Б: KH_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$.

Для стерилізації усіх компонентів обираємо УБС-5 з продуктивністю 5 м³/год (час стерилізації становитиме 0,85 год). Температура стерилізації – 130 °С. Розчин усіх компонентів поживного середовища готується в одному реакторі-змішувачі. Піногасник вносимо безпосередньо в поживне середовище без попередньої стерилізації.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6,3 м³ наведений у табл. 4.6.

Таблиця 4.6

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6,3 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3150 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	80	252	А	3140,5
Меляса	40	126		
Кукурудзяний екстракт	30	94,5		
L-метіонін	0,5	1,57		
Гліцин-бетаїн	0,05	0,157		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50	15,75		
KH_2SO_4	1,5	0,473		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1	0,315		
Вода		2830 л		
Конденсат		314 л		
Розчин вітамінів та мікроелементів	1 мл	3,2 л	-	3,2
Піногасник	2 мл	6,3 л	-	6,3

4.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу лізину у ферментері об'ємом 63 м³

Для цієї стадії необхідно 31,5 м³ поживного середовища. Такий об'єм поживного середовища економічно доцільніше стерилізувати в установці безперервної стерилізації. Це дозволить зменшити витрати води, пари та скоротити

час обробки поживного середовища. Обираємо УБС-35 з продуктивністю 35 м³/год (конструктивно аналогічну УБС-20) (час стерилізації становитиме 0,85 год). Температура стерилізації – 130 °С. Розчин усіх компонентів поживного середовища готується в одному реакторі-змішувачі. Спочатку у цьому реакторі-змішувачі заварюються крохмаль та соєве борошно, після чого в нього ж подаються всі інші компоненти.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 63 м³ наведений у табл. 4.7.

Таблиця 4.7

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 63 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 31,5 м ³ середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, м ³
Глюкоза	80	2520	А	11,12
Меяса	40	1260		
Кукурудзяний екстракт	30	945		
L-метіонін	0,5	15,7		
Гліцин-бетаїн	0,05	1,57		
(NH ₄) ₂ SO ₄	50	157,5		
KH ₂ SO ₄	1,5	4,73		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1	3,15		
Вода		10026 л		
Конденсат		1114 л		
Розчин вітамінів та мікроелементів	1 мл	32 л	-	0,032
Підживлювальний розчин	-	20300 л	-	20,3
Піногасник	2 мл	63 л	-	0,063

4.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Під час культивування *Corynebacterium glutamicum* К-8 піна утворюється через аерацію культуральної рідини зі швидкістю 1,5–2 л/хв та наявності меяси. Додаткове піноутворення підсилюється через наявність у середовищі білків, пептидів та інших органічних речовин, які мають поверхнево-активні властивості. Ці сполуки стабілізують бульбашки повітря, створюючи стійку піну. Піна може створити кілька проблем, таких як зменшення робочого об'єму середовища, порушення ефективної

подачі кисню та нерівномірний розподіл живильних речовин у ферменті. Це знижує продуктивність мікроорганізмів і може призвести до втрат середовища через викиди піни [20].

В якості піногасника обираємо полісорбат-80, оскільки він є ефективним у зниженні піноутворення під час ферменту, не пригнічує ріст *Corynebacterium glutamicum* і не впливає на процес синтезу лізину. Полісорбат-80 забезпечує стабільність у ферментаційному середовищі, добре розчиняється у воді та легко інтегрується в систему, мінімізуючи ризик утворення гарячої піни без шкоди для продуктивності бактерій.

Згідно статті [1] для підтримання рН на рівні 7,0 під культивування *Corynebacterium glutamicum*, в якості титрувального агента використовують NH_4OH .

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу лізину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрозбірник	1	Ємність: 1-2 м ³ , робочий тиск: 0,5-2 бар (виробник: Atlas Copco) [23] https://www.atlascopco.com/uk-ua/compressors/products/air-compressor
ФГО-2	Фільтр грубої очистки	1	Продуктивність: до 1000 м ³ /год, ступінь фільтрації: від 100 мкм (виробник: Donaldson) [24] https://www.buyfilteronline.com/brands/donaldson/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUIV2etU2MyEJacKiwRhizG3UAMGyfTppWOYBlaxizo3gWxKVMo5K5gaAo25EALw_wcB
К-3	Турбокомпресор	1	Продуктивність: 100-2000 м ³ /год, тиск: 0,5-1,5 бар, потужність: 15-30 кВт (виробник: Ingersoll Rand) [25] https://www.ingersollrand.com/en/air-compressor/turbo-air-compressors
ТО-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Продуктивність: до 500 л/год, температура охолодження: до +5°C, тип: пластинчастий (виробник: Alfa Laval) [26] https://en.bjhuaaxin.com/Recommended/2.html?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUmo-34uNeMPtv8wNIKUxPZ2YWG-ha3QrTl_zg0lzsbsZqrc50vr3ZsaAlZiEALw_wcB
Р-5	Ресивер	1	Об'єм: 0,5-2 м ³ , тиск: 0,5-2 бар (виробник: Festo) [27] https://www.festo.com/ua/uk/a/192159/
ТН-6 ТН-48	Теплообмінник-нагрівач	2	Продуктивність: до 500 л/год, температура нагріву: до +90°C, тип: пластинчастий (виробник: Guntner) [28] https://en.ahlsell.se/en/products/cooling/heat-exchanger/evaporators/spare-parts-guntner/7443031

					НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Набігуз В.О.			РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							45	6
Керівник		Лич І.В.				45		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

ФТО-7	Фільтр тонкого очищення	1	Ступінь фільтрації: 5-10 мкм, продуктивність: до 500 м ³ /год (виробник: Donaldson) [29] https://art-agro.com.ua/filtri-donaldson
ФНО-8	Фільтр надтонкого очищення	1	Ступінь фільтрації: 0,1-1 мкм, продуктивність: до 3400 м ³ /год (виробник: Інтерхолод) [30] https://interholod.com.ua/ua/p716654683-filtry-tonkoj-ochistki.html
ІФ-17 ІФ-25 ІФ-33 ІФ-46 ІФ-59	Фільтр надтонкого очищення	5	Ступінь фільтрації: 0,1-1 мкм, продуктивність: до 3400 м ³ /год (виробник: Інтерхолод) [30] https://interholod.com.ua/ua/p716654683-filtry-tonkoj-ochistki.html
ЗБ-9	Збірник для зберігання аміачної води	1	Модель: SF50 Об'єм: 100 л, матеріал: нержавіюча сталь (Виробник: Grainfather) [31] https://kamrad.ua/ua/tskt-fermenter-grainfather-sf50?srsId=AfmBOop4H4LzErA_VdXHhW2ylgsF050AgO25H8T3S8iMzMcjwCuIeBuu
Н-10 Н-12 Н-14 Н-16 Н-22 Н-24 Н-27 Н-29 Н-32 Н-34 Н-38 Н-41 Н-47 Н-49	Відцентровий насос	14	Модель: Vitals aqua PRO CP 10100Y Продуктивність: 100 л/год, робоча частота обертання - 2850 об/хв, споживча потужність – 1000 Вт (виробник: «Фуян Нью Інджа Памп Ко ЛТД») [32] https://vitals-aqua.ua/poverhnostnyye-nasosy/tsentrobeznyye-seriya-cp/pro-cp-10100y
Р-11	Реактор-змішувач для приготування підживлювального розчину	1	Модель: SF50 Об'єм: 30 м ³ , матеріал: нержавіюча сталь (Виробник: Grainfather) [31] https://kamrad.ua/ua/tskt-fermenter-grainfather-sf50?srsId=AfmBOop4H4LzErA_VdXHhW2ylgsF050AgO25H8T3S8iMzMcjwCuIeBuu

P-13	Реактор-змішувач для стерилізації підживлювального розчину	1	<p>Модель: SF50</p> <p>Об'єм: 30 м³, матеріал: нержавіюча сталь</p> <p>(Виробник: Grainfather) [31]</p> <p>https://kamrad.ua/ua/tskt-fermenter-grainfather-sf50?srsltid=AfmBOop4H4LzErA_VdXHhW2ylgsF050AgO25H8T3S8iMzMcjwCuIeBuu</p>
ЗБ-15	Збірник для запасного розчину вітамінів та мікроелементів	1	<p>Модель: SF50</p> <p>Об'єм: 50 л, матеріал: нержавіюча сталь</p> <p>(Виробник: Grainfather) [31]</p> <p>https://kamrad.ua/ua/tskt-fermenter-grainfather-sf50?srsltid=AfmBOop4H4LzErA_VdXHhW2ylgsF050AgO25H8T3S8iMzMcjwCuIeBuu</p>
I-18	Інокулятор	1	<p>Об'єм: 6,3 л, матеріал: термостійке боросилікатне скло</p> <p>(виробник: Minifors, Infors) [33]</p> <p>https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/fermenteryInfors/</p>
Д-19 Д-22 Д-27 Д-30 Д-35 Д-44 Д-48 Д-57	Об'ємно-ваговий дозатор	8	<p>Дозатор напівавтоматичний фірми "ABC Tech" моделі ВДСВ-2 (Україна), тип – з вібраційним живильником; межі зважування: найменша межа дозування – 50 г/мл, найбільша межа дозування – 15 кг/мл; об'єм бункера – 420 л; похибка дозування – 0,35% [34]</p> <p>https://storage.ua.prom.st/1655371_pasport_ustanovka_fasovo_ya_modeli_vdsv1_vdsv2.pdf</p>
P-20	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	<p>Об'єм: 35 л, матеріал: термостійке скло (виробник: ТОВ «Титан Технікс») [35]</p> <p>https://hms-ua.com/ua/p1445439783-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html</p>
P-23	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	<p>Об'єм: 30 л, матеріал: термостійке скло (виробник: ТОВ «Титан Технікс») [35]</p> <p>https://hms-ua.com/ua/p1445439783-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html</p>
I-26	Інокулятор	1	<p>Модель: SF50</p> <p>Об'єм: 63 л, матеріал: нержавіюча сталь</p> <p>(Виробник: Grainfather) [31]</p> <p>https://kamrad.ua/ua/tskt-fermenter-grainfather-sf50?srsltid=AfmBOop4H4LzErA_VdXHhW2ylgsF050AgO25H8T3S8iMzMcjwCuIeBuu</p>

P-28	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	<p>Модель: SF50 Об'єм: 350 л, матеріал: нержавіюча сталь (Виробник: Grainfather) [31] https://kamrad.ua/ua/tskt-fermenter-grainfather-sf50?srsltid=AfmBOop4H4LzErA_VdXHhW2ylgsF050AgO25H8T3S8iMzMcjwCuIeBuu</p>
P-31	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	<p>Модель: SF50 Об'єм: 300 л, матеріал: нержавіюча сталь (Виробник: Grainfather) [31] https://kamrad.ua/ua/tskt-fermenter-grainfather-sf50?srsltid=AfmBOop4H4LzErA_VdXHhW2ylgsF050AgO25H8T3S8iMzMcjwCuIeBuu</p>
I-34	Інокулятор	1	<p>Модель: ФР-500 Об'єм: 630 л, матеріал: нержавіюча сталь (Виробник: Промвіт) [36] https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rastenij-500-l/</p>
P3-36	Реактор-змішувач	1	<p>Об'єм: 6,2 м³, матеріал: нержавіюча сталь (Виробник: Стройторгсервіс) [37] https://prom.ua/ua/p15745045-emkosti-nerzhaveyuschej-stali.html</p>
P-38	Реактор УБС	1	<p>Об'єм: 6,2 м³, матеріал: нержавіюча сталь (Виробник: Стройторгсервіс) [37] https://prom.ua/ua/p15745045-emkosti-nerzhaveyuschej-stali.html</p>
КШН-40	Колонка швидкісного нагріву	1	<p>Робочий тиск 0,6 МПа, вміщення – 100 л, Матеріал корпусу – Ст Х18Н9Т.</p>
В-41	Витримувач	1	<p>Об'єм: 6,2 м³, матеріал: нержавіюча сталь, максимальний робочий тиск – 10 бар (Виробник: Махдапра) [38] https://tbpool.com.ua/p/plastinchatyj-teploobmennik-s-boltami-x-pwt-1333-va-600kvt-</p>
ТО-42	Теплообмінник-охолоджувач	1	<p>Осушувач рефрижераторного типу Модель: ATS DGO 780 Продуктивність: 780 м³/год (Виробник: «АТS») [39] https://tusk.ua/product/osushitel-refrizheratornogo-tipa-ats-dgo-780/</p>

М-45	Збірник для приготування та стерилізації піногасника	1	Збірник фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об'ємом 12 л; обладнаний електротеном, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304,ASTM [40] https://www.blsvalve.com/
І-47	Інокулятор	1	Модель: ФР-500 Об'єм: 6300 л, матеріал: нержавіюча сталь (Виробник: Промвіт) [36] https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rastenij-500-l/
Р-49	Реактор-змішувач	1	Модель: ФР-500 Об'єм: 60 м ³ , матеріал: нержавіюча сталь (Виробник: Промвіт) [36] https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rastenij-500-l/
Ф-51	Фільтр для затримки часток	1	Продуктивність: до 1000 м ³ /год, ступінь фільтрації: від 100 мкм (виробник: Donaldson) [41] https://www.buyfilteronline.com/brands/donaldson/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUIV2etU2MyEJacKiwRhizG3UAMGyfTppWOYBlaxizo3gWxKVMo5K5gaAo25EALw_wcB
КШН-53	Колонка швидкісного нагріву	1	Робочий тиск 0,6 МПа, вміщення – 100 л,. Матеріал корпусу – Ст Х18Н9Т.
Т-54	Витримувач	1	Об'єм: 60 м ³ , матеріал: нержавіюча сталь, максимальний робочий тиск – 10 бар (Виробник: Махдапра) [38] https://tbpool.com.ua/p/plastinchatyj-teploobmennik-s-boltami-x-pwt-1333-va-600kvt-
Т-55	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач рефрижераторного типу Модель: ATS DGO 780 Продуктивність: 780 м ³ /год (Виробник: «АТS») [42] https://tusk.ua/product/osushitel-refrizheratornogo-tipa-ats-dgo-780/
М-58	Збірник для приготування та стерилізації піногасника	1	Збірник фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD (Китай) об'ємом 100 л; обладнаний електротеном, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304,ASTM [40] https://www.blsvalve.com/

Ф-60	Ферментер	1	<p>Модель: DIN-BE Об'єм: 63 м³, матеріал: нержавіюча сталь. Оснащений барботером, сорочкою, датчиками кислотності, кисню та температури, пробовідбірником, манометром, турбінною мішалкою: 320 об/хв. (Виробник: Pfaudler) [43] https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf</p>
------	-----------	---	--

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Схема виробництва лізину штамом *Corynebacterium glutamicum* К-8 включає ряд кроків, що охоплюють підготовку аераційного повітря, приготування та стерилізацію титрувальних агентів, приготування підживлювального розчину глюкози, запасного розчину вітамінів та мікроелементів та освітлення меляси. Крім того, технологічний процес включає підготовку посівного матеріалу та біосинтез цільового продукту. Детальну схему отримання лізину можна побачити в графічній частині роботи.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря:

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Проводиться за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником (**ПЗ-1**) на найвищій точці (Н = 16 м).

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

Проводиться на тканинному фільтрі з грубим очищенням (**ФГО-2**) з ефективністю $E = 90\%$, що затримує частинки розміром більше 50 мкм.

ДР 1.3. Компресія повітря

Повітря стискається у компресорі (**К-3**) до тиску 1,0 МПа та нагрівається до 120-200°C.

ДР 1.4. Охолодження та видалення вологи

Після стиснення повітря охолоджують до 25 °С за допомогою теплообмінника-охолоджувача (**ТО-4**). Далі охолоджене повітря подається до ресивера (**Р-5**), де його вологість стабілізується на рівні 60%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря нагрівають у теплообміннику-нагрівачі (**ТН-6**) до температури 70-80 °С. Після цього воно направляється на стадію тонкого очищення.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря проходить через головний фільтр (**ФТО-7**) з $E = 95\%$.

					НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Набігуз В.О.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							51	10
Керівник		Лич І.В.				51		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

ДР 1.7. Надтонка очистка вентиляційного повітря

Для надтонкого очищення повітря використовуються фільтри типу НЕРА (ФНО-8), в яких основним фільтруючим елементом є скловолокно, складене у гофровану структуру для максимізації площі фільтрації.

ДР 1.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед посівними апаратами та ферментером встановлюють індивідуальні фільтри (ІФ-17, ІФ-25, ІФ-33, ІФ-46, ІФ-59), ступінь очищення яких становить $E = 99,99998\%$.

ДР 2. Приготування та стерилізація піногасника

ДР 2.1 Приготування та стерилізація піногасника для культивування в інокуляторі об'ємом 6,3 л

За допомогою мірного циліндра відміряють 6,3 мл піногасника та переливають у колбу на 25 мл. Перед застосуванням піногасника його необхідно простерилізувати в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,2 МПа тривалістю 40 хв. Піногасник подається на стадії (ТП 7.5).

ДР 2.2. Приготування та стерилізація піногасника для культивування в інокуляторі об'ємом 63 л

За допомогою мірного циліндра відміряють 63 мл піногасника та переливають у колбу на 100 мл. Перед застосуванням піногасника його необхідно простерилізувати в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,2 МПа тривалістю 40 хв. Піногасник подається на стадії (ТП 7.6).

ДР 2.3. Приготування та стерилізація піногасника для культивування в інокуляторі об'ємом 630 л

За допомогою мірного циліндра відміряють 630 мл піногасника та переливають у колбу на 1000 мл. Перед застосуванням піногасника його необхідно простерилізувати в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,2 МПа тривалістю 40 хв. Піногасник подається на стадії (ТП 7.7).

ДР 2.4. Приготування та стерилізація піногасника для культивування в інокуляторі об'ємом 6300 л

Через об'ємно-ваговий дозатор (**Д-44**) подають 6,3 л піногасника у мірник з електротеном (**М-45**) об'ємом 12 л. Піногасник стерилізують шляхом нагрівання середовища до температури 131°C протягом 40 хв. Охолодження простерилізованого піногасника здійснюють шляхом подачі води технічної холодної у сорочку апарату. Простерилізований і охолоджений піногасник подається самопливом до інокулятора (**І-47**).

ДР 2.5. Приготування та стерилізація піногасника для культивування у ферментері об'ємом 63 м³

Через об'ємно-ваговий дозатор (**Д-57**) подають 63 л піногасника у мірник з електротеном (**М-58**) об'ємом 100 л. Піногасник стерилізують шляхом нагрівання середовища до температури 131°C протягом 40 хв. Охолодження простерилізованого піногасника здійснюють шляхом подачі води технічної холодної у сорочку апарату. Простерилізований і охолоджений піногасник подається самопливом до виробничого ферментера (**Ф-60**).

ДР 3. Приготування титрувальних агентів

ДР 3.1. Зберігання аміачної води

NH₄OH як титруючий агент не вимагає стерилізації та доступний у готовій до використання формі. Аміачну воду зберігають у герметичному резервуарі (**ЗБ-9**) з нержавіючої сталі, як і всі комунікації до ферментера та інокулятора.

ДР 4. Приготування підживлювального розчину

ДР 4.1. Приготування підживлювального розчину

На технологічних вагах зважують 12600 кг глюкози, 3150 кг меляси та 1260 кг (NH₄)₂SO₄ завантажують у реактор-змішувач (**Р-11**) об'ємом 30 м³, за допомогою лічильника доливають 17 м³ питної води та вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °C при перемішуванні 320 об/хв.

ДР 4.2. Стерилізація підживлювального розчину

Приготований підживлювальний розчин (від ДР 4.1) об'ємом 17 м³ перекачують за допомогою насоса (**Н-12**) у реактор (**Р-13**) об'ємом 30 м³ стерилізують

при 112°C упродовж 30 хв. Розчин використовують на стадії виробничого біосинтезу (до ТП 6.1)

ДР 5. Приготування запасного розчину вітамінів та мікроелементів

Розчин вітамінів та мікроелементів готується з розрахунку 1 мл на 1 л поживного середовища, тому розрахуємо необхідний об'єм запасного розчину для кожного етапу культивування (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Об'єм запасного розчину вітамінів та мікроелементів

Об'єм поживного середовища, л	Об'єм запасного розчину, л
3,15	0,0032
31,5	0,032
315	0,32
3150	3,2
31500	32

Отже загальний об'єм розчину вітамінів та мікроелементів становитиме 35,5 л.

ДР 5.1. Приготування та стерилізація розчину вітамінів

На технологічних вагах зважують 83 г біотину, 14 г тіаміну хлориду та поміщають у колбу об'ємом 100 мл. За допомогою мірного циліндра доливають 50 мл питної води та перемішують до повного розчинення компонентів. Стерилізують розчин вітамінів при 112°C протягом 30 хвилин в автоклаві.

ДР 5.2. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів

На технологічних вагах зважують 133 г FeSO₄, 133 г MnSO₄ та поміщають у колбу об'ємом 100 мл. За допомогою мірного циліндра доливають 50 мл питної води та перемішують до повного розчинення компонентів. Стерилізують розчин мікроелементів при 131°C протягом 40 хвилин в автоклаві.

ДР 5.3. Змішування розчину вітамінів та мікроелементів

У збірник (ЗБ-15) об'ємом 50 л переливають 50 мл розчину вітамінів (від ДР 5.1) та 50 мл розчину мікроелементів (від ДР 5.2) та доливають за допомогою лічильника 35,4 л питної води та перемішують за допомогою мішалки.

ДР 6. Підготовка та стерилізація поживних середовищ

ДР 6.1. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту для цієї стадії необхідно приготувати 0,315 л поживного середовища (ПС).

ДР 6.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 12,6 г глюкози, 12,6 г меляси, 9,45 г кукурудзяного екстракту, 0,157 г L-метіоніну та 0,0157 г гліцин-бетаїну. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, за допомогою мірного циліндра додають 127 мл водопровідної води та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевим корком. Приготований розчин стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, упродовж 30 хв.

ДР 6.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 15,75 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,473 г KH_2SO_4 та 0,315 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, за допомогою мірного циліндра додають 137 мл водопровідної води та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C, упродовж 40 хв.

ДР 6.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 6,3 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 6,3 л, потрібно приготувати 3,15 л поживного середовища.

ДР 6.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 252 г глюкози, 126 г меляси, 94,5 г кукурудзяного екстракту, 1,57 г L-метіоніну та 0,157 г гліцин-бетаїну. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, за допомогою мірного циліндра додають 1261 мл водопровідної води та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевим корком. Приготований розчин стерилізують в автоклаві при $t = 112^\circ\text{C}$ 30 хв.

ДР 6.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 157,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,73 г KH_2SO_4 та 3,15 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, за допомогою мірного циліндра додають 1365 мл водопровідної води та перемішують. Закривають колбу

ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, упродовж 40 хв.

ДР 6.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 63 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 63 л, потрібно приготувати 31,5 л поживного середовища.

ДР 6.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-19) у реактор-змішувач (Р-20) об'ємом 35 л подають 2520 г глюкози, 1260 г меляси, 945 г кукурудзяного екстракту, 15,7 г L-метіоніну та 1,57 г гліцин-бетаїну. Потім за допомогою лічильника доливають 14,5 л водопровідної води та вмикають перемішуючий пристрій. Приготований розчин стерилізують безпосередньо у збірнику при температурі 112°С, упродовж 30 хв.

ДР 6.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-22) у реактор-змішувач (Р-23) об'ємом 30 л подають 1575 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 47,3 г KH_2SO_4 та 31,5 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Потім за допомогою лічильника доливають 13,7 л водопровідної води та вмикають перемішуючий пристрій. Приготований розчин стерилізують безпосередньо у збірнику при температурі 131 °С, упродовж 40 хв.

ДР 6.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 630 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 630 л, потрібно приготувати 315 л поживного середовища.

ДР 6.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-27) у реактор-змішувач (Р-28) об'ємом 350 л подають 25200 г глюкози, 12600 г меляси, 9450 г кукурудзяного екстракту, 157 г L-метіоніну, 15,7 г гліцин-бетаїну. Потім за допомогою лічильника доливають 145 л водопровідної води та вмикають перемішуючий пристрій. Приготований розчин стерилізують безпосередньо у збірнику при температурі 112°С, упродовж 30 хв.

ДР 6.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (**Д-30**) у реактор-змішувач (**Р-31**) об'ємом 300 л подають 1575 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 47,3 г KH_2SO_4 , 31,5 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Потім за допомогою лічильника доливають 13,7 л водопровідної води та вмикають перемішуючий пристрій. Приготований розчин стерилізують безпосередньо у збірнику при температурі 131 °С, упродовж 40 хв.

ДР 6.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 6300 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 6300 л, потрібно приготувати 3150 л поживного середовища.

ДР 6.5.1. Приготування композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (**Д-35**) у реактор-змішувач (**Р-36**) об'ємом 6200 л подають 252 кг глюкози, 126 кг меляси, 94,5 кг кукурудзяного екстракту, 1,57 кг L-метіоніну, 0,157 кг гліцин-бетаїну, 0,007 кг, 15,75 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,473 кг KH_2SO_4 , 0,315 кг $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Потім за допомогою лічильника доливають 2830 л водопровідної води та вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 6.5.2. Стерилізація композицій в УБС

Одержаний розчин (від ДР 6.5.1) перекачують відцентровим насосом (**Н-37**) у реактор УБС-5 (**Р-38**), де проходить стерилізація гострою парою за температури 131 °С протягом 5-7 хвилин.

ДР 6.6. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 63 м³

Для одержання посівного матеріалу у ферментері об'ємом 63 м³, потрібно приготувати 31,5 м³ поживного середовища.

ДР 6.6.1. Приготування композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (**Д-48**) у реактор-змішувач (**Р-49**) об'ємом 20 м³ подають 2520 кг глюкози, 1260 кг меляси, 945 кг кукурудзяного екстракту, 15,7 кг L-метіоніну, 1,57 кг гліцин-бетаїну, 157,5 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,73 кг KH_2SO_4 , 3,15 кг $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Потім за допомогою лічильника доливають 10026 л водопровідної води та вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 6.6.2. Стерилізація композицій в УБС

Одержаний розчин (від ДР 6.6.1) перекачують відцентровим насосом (**Н-50**) для подальшої стерилізації гострою парою за температури 131 °С протягом 5-7 хвилин.

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу

ТП 7.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *Corynebacterium glutamicum* К-8 зберігають в холодильнику при температурі + 4 °С на скошеному агарі. Культуру необхідно пересівати через кожні 2 місяці, щоб уникнути пересихання поживного середовища.

ТП 7.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з МПА для одержання ізолюваних колоній. Культивують в термостаті при $t = 30 \pm 1$ °С (20 год).

ТП 7.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізолювані колонії (від ТП 7.2) пересівають петлею в пробірки із бульйоном LBG (LB з додаванням 5 г/л глюкози). Штам інкубували з додаванням 50 мкг/мл канаміцину. Культивують в термостаті при температурі 30 °С упродовж 20 год.

ТП 7.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Простерилізовану композицію А (від ДР 6.1.1) об'ємом 162 мл та композицію Б (від ДР 6.1.2) об'ємом 153 мл переносять у колбу об'ємом 750 мл, потім додають 0,32 мл розчину вітамінів та мікроелементів (від ДР 5.3) і перемішують. Вміст колби розливають по 105 мл у три колби з коефіцієнтом заповнення 0,2. До кожної колби додають 5 мл фізіологічного розчину із робочою культурою. Після перемішування та змивання культури, одержану суспензію вносять у колби з поживним середовищем. Вирощування мікроорганізмів відбувається на качалках (250 об/хв) при 30 ± 1 °С протягом 20 годин. Після завершення культури проводять мікробіологічний контроль в кожній колбі.

ТП 7.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6,3 л

У інокуляторі (**І-18**) об'ємом 6,3 л додають 1610 мл композиції А (від ДР 6.2.1), 1530 мл композиції Б (від ДР 6.2.2), 3,2 мл розчину вітамінів та мікроелементів (від

ДР 5.3) і 6,3 мл піногасника (від ДР 2.1). Після включення перемішувального пристрою (250 об/хв) та подачі стерильного повітря через барботер (від ДР 1.7), вносять посівний матеріал з попередньої стадії через засівну колбу (з ТП 7.4). Культивування проводять при 30 °С протягом 40 годин.

ТП 7.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 63 л

У інокуляторі (**I-26**) об'ємом 63 л додають 16,1 л композиції А (від ДР 6.3.1), 15,3 л композиції Б (від ДР 6.3.2), 32 мл розчину вітамінів та мікроелементів (від ДР 5.3) і 63 мл піногасника (від ДР 2.2). Після включення перемішувального пристрою (250 об/хв) та подачі стерильного повітря через барботер (від ДР 1.7), вносять посівний матеріал з попередньої стадії через засівну колбу (з ТП 7.5). Культивування проводять при 30 °С протягом 40 годин.

ТП 7.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 630 л

У інокуляторі (**I-34**) об'ємом 630 л додають 161 л композиції А (від ДР 6.4.1), 153 л композиції Б (від ДР 6.4.2), 320 мл розчину вітамінів та мікроелементів (від ДР 5.3) та 630 мл піногасника (від ДР 2.3). Після включення перемішувального пристрою (250 об/хв) та подачі стерильного повітря через барботер (від ДР 1.7), вносять посівний матеріал з попередньої стадії через трубу перетискання (з ТП 7.6). Культивування проводять при 30 °С протягом 40 годин.

ТП 7.8. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6,3 м³

У інокуляторі (**I-47**) об'ємом 6,3 м³ додають 3144 л простерилізованої композиції А (від ДР 6.5.2), 3200 мл розчину вітамінів та мікроелементів (від ДР 5.3) та 6300 мл піногасника (від ДР 2.4). Після включення перемішувального пристрою (250 об/хв) та подачі стерильного повітря через барботер (від ДР 1.7), вносять посівний матеріал з попередньої стадії через трубу перетискання (з ТП 7.7). Культивування проводять при 30 °С протягом 40 годин.

ТП 8. Виробничий біосинтез

ТП 8.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 63 м³

У ферментері (**Ф-60**) об'ємом 63 м³ додається 11,12 м³ простерилізованої композиції А (від ДР 6.6.2), яка перекачується у ферментер за допомогою труби перетискування. Також в поживне середовище вносять 32 л розчину вітамінів та

мікроелементів (від ДР 5.3) та 63 л піногасника (від ДР 2.5). Після цього, коли розчини змішані, запускається перемішувальний пристрій на швидкості 250 об/хв, і стерильне повітря подається через барботер згідно з ДР 1.7. Послідовно, через трубу перетискання (від ТП 7.8), додається посівний матеріал з попередньої стадії.

Культивування мікроорганізмів здійснюється при температурі 30 °С протягом 40 годин. Кожні 4 годин порціями вносяться 2250 л стерильного розчину для підживлення (від ДР 3.2), це робиться за допомогою насосу (**Н-16**). Протягом процесу культивування, кожні 2-4 годин беруть проби культуральної рідини для аналізу концентрацій біомаси, джерел вуглецю та азоту, а також для мікробіологічного контролю. Кінцева концентрація лізину повинна досягти 221,3 г/л.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль чистоти культури зазвичай виконують двома способами: методом виснажувального штриха або мікроскопіюванням. Під час методу виснажувального штриха взірець культуральної рідини розміщують на пластині з агаровим середовищем, рівномірно розподіляючи його шляхом розтушовування. Після інкубації визначають кількість мікроорганізмів за кількістю колоній, які з'являються на пластині [44].

Для методу мікроскопування зразок культуральної рідини наноситься у вигляді краплі на предметне скло, розпластується, покривається покривним склом і досліджується під мікроскопом. Такий підхід дає змогу оцінити мікроскопічну морфологію та чисельність мікроорганізмів у зразку. У виробничих умовах цей метод часто обирають через його швидкість, оскільки він не потребує додаткового часу на інкубацію, як у випадку використання виснажувального штриха, що є недоліком для оперативного контролю [44].

Під час дослідження мікробіологічного аналізу культуральну рідину також розсівають на чашці Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для бактеріального процесу, де інкубують протягом 24–48 годин при $37\pm 2^\circ\text{C}$. Для виявлення дріжджів і грибів потрібно сусло-агар (СА), де інкубація триває 7 діб при температурі $30\pm 2^\circ\text{C}$. Це дозволяє застосувати можливе забруднення та оцінити загальну якість середовища [44].

Для мікроскопічного аналізу вибирають метод препарату «роздавлена крапля». Зразок готують наступним чином: на знежирене предметне скло нараховується невелика кількість покривної культуральної рідини, викривають склом і досліджують під мікроскопом, використовуючи об'єктив з кратністю 40x. Клітини *Corynebacterium glutamicum* К-8 мають вигляд тонких паличок, які можуть бути прямими або злегка вигнутими, із загостреними чи булавоподібними кінцями [8] (рис. 7.1).

					НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Набігуз В.О.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Лім.	Арк.	Акрушів
Консульт.							61	9
Керівник		Лич І.В.				61		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

Їхні розміри змінюються від 0,3–0,8 до 1,5–8,0 мкм, і вони часто розташовуються поодиноці або парами у V-подібній конфігурації [8].

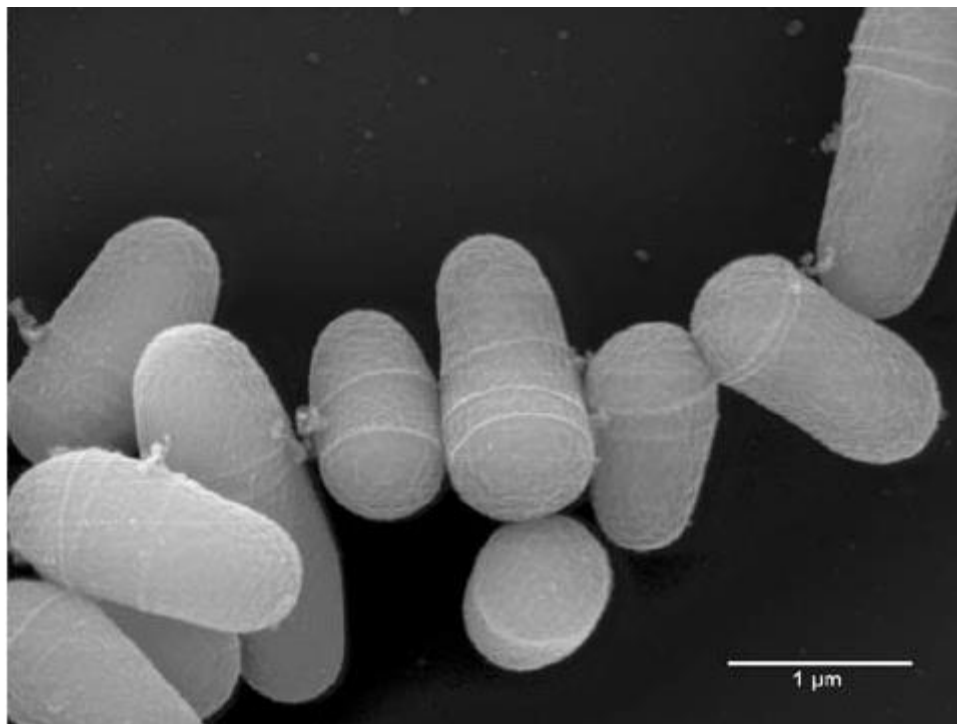


Рис. 7.1. Клітини *Corynebacterium glutamicum* К-8 під мікроскопом (10 000х)

Через 72 год росту на кров'яному агарі ці мікроорганізми формують опуклі, напівпрозорі колонії з матовою поверхнею [8].

Для перевірки стерильності поживного середовища відбирають стерилізовану пробу об'ємом 50 мл, з якої висівають 0,1 мл на чашки Петрі. Для виявлення грибів і дріжджів потрібно сусло-агар, а для бактерій — м'ясопептонний агар. Чашки з посівами упаковують у папір і розміщують у термостаті: для бактеріальної інкубації при температурі 32 °С протягом 24 годин, а для грибів і дріжджів — при 25 °С протягом 72 годин. Після завершення інкубації перевіряють зростання росту мікроорганізмів на поживних середовищах [44].

7.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

7.2.1. Визначення вмісту вуглецю

Зразки по 1-2 мл відбирали кожні 2-4 год. Потім 1 мл цих зразків використовували для визначення концентрації глюкози, фруктози, сахарози та трегалози, а інші – для вимірювання росту клітин і виробництва L-лізину. Визначення глюкози, фруктози та трегалози в супернатанті культивування, розведеному у

співвідношенні 1:10, проводили за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (HPLC, Agilent Technologies, Пало-Альто, Каліфорнія, США) з Sugar-Pak 1 6,5 × 300 мм колонці при 70 °С із використанням ізократичного елюювання надчистою H₂O при швидкості потоку 0,6 мл/хв, і подальше детектування за допомогою визначення показників заломлення [45]. Для кількісного визначення сахарози температуру колонки знизили до 15°C, а концентрацію елюенту підвищили до 10 mM H₂SO₄ [46].

7.2.2. Визначення вмісту азоту

Кількісне визначення амінокислот і проміжних продуктів метіоніну проводили за допомогою ВЕРХ (Agilent 1100; Agilent, Waldbronn, Німеччина) з захисним картриджем і колонкою Synergi 4 м (MAX-RP 80 Å, 150 * 4,6 мм) (Phenomenex, AschaVenburg, Німеччина). Перед ін'єкцією аналіти були дериватизовані з використанням офтальдіальдегіду (ОРА) і меркаптоетанолу (2-МСЕ) як відновника. Додатково сульфгідрильні групи блокували йодоцтовою кислотою. Розділення проводили зі швидкістю 1 мл/хв, використовуючи 40 mM NaH₂PO₄ (елюент А, рН 7,8, відкоригований NaOH) як полярну фазу та суміш метанол/вода (100/1) як неполярну фазу (елюент В). Застосовували наступний градієнт: Початок 0% В, 39 хв 39% В, 70 хв 64% В, 3,5 хв 100% В, 2 хв 0% В для врівноваження. Дериватизацію при кімнатній температурі автоматизували, як описано нижче. Спочатку 0,5 л 0,5% 2-МСЕ в біцині (0,5 М, рН 8,5) змішували з 0,5 л клітинного екстракту. Потім додавали 1,5 л 50 мг/мл йодоцтової кислоти в біцині (0,5 М, рН 8,5), а потім додавали 2,5 л біцинового буверу (0,5 М, рН 8,5). Дериватизацію проводили шляхом додавання 0,5 л 10 мг/мл ОРА реагенту, розчиненого в 1/45/54 об./об./об. 2-МСЕ/MeOH/біцину (0,5 М, рН 8,5). Нарешті суміш розбавляли 32 л H₂O. Між кожним із зазначених вище етапів піпетування був час очікування - 1 хв. Потім у колонку вводили загальний об'єм 37,5 л. Виявлення проводили детектором Fluorescence (340 нм збудження, випромінювання 450 нм; Agilent, Waldbronn, Німеччина). Для кількісного визначення - як внутрішній стандарт використовували аміномасляну кислоту [47].

7.3. Визначення концентрації біомаси та лізину

7.3.1. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси вимірювали за допомогою спектрофотометра при 600 нм після відповідного розведення. Відповідно до попереднього опису коефіцієнт кореляції між масою сухої клітини (DCW) і OD_{600} був визначений як 0,318 ($OD_{600}=0,318$ г DCW) [1].

7.3.2. Визначення концентрації лізину

Концентрацію L-лізину визначали за допомогою іммобілізованого ферментного біосенсора SBA-40E (Shandong, Китай). Концентрацію L-лізину визначали як лізин·HCl у дублікатах [1]. Біосенсори доцільно використовувати для дослідження концентрації лізину в культуральній рідині завдяки їх високій специфічності, швидкості аналізу, точності та чутливості. Вони дозволяють проводити моніторинг у реальному часі з мінімальною пробопідготовкою, є економічно вигідними та стійкими до впливу забруднень у складних середовищах. Це забезпечує ефективний контроль біотехнологічних процесів.

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні і значення показника
ДР 1.1 Забір атмосферного повітря К _Т	повітрозабірник висота повітрозабірника	—	під час купівлі та встановлення	H = 16 м
ДР 1.2 Очистка від грубих домішок	повітря після проходження фільтра грубої очистки	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	E = 90 %
ДР 1.3 Компресіювання повітря К _Т	стиснене повітря після проходження компресора тиск, температура	манометр, термометр	після проходження через компресор	P = 1,0 МПа t = 120 – 200°C
ДР 1.4 Охолодження повітря та видалення вологи К _Т	охоложене повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після охолодження	t = 25– 30°C W = 60–70%
ДР 1.5 Нагрівання повітря К _Т	нагріте повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після нагрівання	t° = 45–50°C W = 50 %
ДР 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі К _Т	повітря після проходження головного фільтра ступінь очищення	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	E = 95 %

Продовження табл. 7.1

<p>ДР 2.1</p> <p>Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 6,3 л</p> <p>Кт, Кх, Км</p>	<p>температура, час стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>датчик температури, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>температура, тиск, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T = 131°C P = 0,75 Мпа, t = 30 хв стерильність</p>
<p>ДР 2.2</p> <p>Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 63 л</p> <p>Кт, Кх, Км</p>	<p>температура, час стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>датчик температури, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>температура, тиск, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T = 131°C P = 0,75 Мпа, t = 30 хв стерильність</p>
<p>ДР 2.3</p> <p>Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 630 л</p> <p>Кт, Кх, Км</p>	<p>температура, час стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>датчик температури, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>температура, тиск, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T = 131°C P = 0,75 Мпа, t = 30 хв стерильність</p>
<p>ДР 2.4</p> <p>Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 6300 л</p> <p>Кт, Кх, Км</p>	<p>температура, час стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>датчик температури, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>температура, тиск, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T = 131°C P = 0,75 Мпа, t = 30 хв стерильність</p>
<p>ДР 2.5</p> <p>Приготування та стерилізація піногасника для виробничого ферментера об'ємом 63 м³</p> <p>Кт, Кх, Км</p>	<p>температура, час стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>датчик температури, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>температура, тиск, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T = 131°C P = 0,75 Мпа, t = 30 хв стерильність</p>

ДР 4.1 <i>Приготування підживлювального розчину</i> Кт	температура, частота обертання мішалки	датчик температури, годинник	Температура розчинення та швидкість перемішування підтримуються автоматично, температура, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації	t (розчинення) = 40 °C n = 320 об/хв
ДР 4.2 <i>Стерилізація підживлювального розчину</i> Кт, Кх, Км	температура, час стерилізації, тиск, стерильність	датчик температури, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	температура, тиск, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації	T = 111°C P = 0,5 Мпа, t = 30 хв стерильність
ДР 5.1 <i>Приготування та стерилізація розчину вітамінів</i> Кт, Кх, Км	тиск, температура, стерильність	манометр, мікробіологічний контроль	Тиск – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,5 Мпа, t = 112 °C t = 30 хв стерильність
ДР 5.2 <i>Приготування та стерилізація розчину мікроелементів</i> Кт, Кх, Км	тиск, температура, стерильність	манометр, мікробіологічний контроль	Тиск – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,75 Мпа, t = 131 °C t = 40 хв стерильність
ДР 6.1.1, 6.2.1 <i>Приготування та стерилізація композиції А</i> Кт, Км	композиція А температура, час, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	t = 112 °C t = 30 хв стерильність
ДР 6.1.2, 6.2.2 <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i> Кт, Км	композиція Б температура, час, стерильність	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	t = 131 °C t = 40 хв стерильність

ДР 6.3.1, 6.4.1, 6.5.1 Приготування та стерилізація композиції А КТ, КМ	композиція А температура розчинення, частота обертання мішалки, час і температура стерилізації, тиск, стерильність	манометр, датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура розчинення та швидкість перемішування підтримуються автоматично, температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	t (розчинення) = 40 °С n = 50 об/хв t = 112 °С t = 30 хв стерильність
ДР 6.3.2, 6.4.2, 6.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б КТ, КМ, КХ	композиція Б рН, температура, тиск, час, стерильність	датчик рН, датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	рН – перед стерилізацією, температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	рН = 7,2 Р = 0,15 МПа t = 131 °С t = 40 хв стерильність
ТП 6.1 Підтримання колекційної культури КТ, КМ	колекційна культура <i>Corynebacterium glutamicum</i> В-6 температура, мікробіологічна чистота	датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 2 місяці	t° = 4 °С мікробіологічна чистота
ТП 7.2 Одержання робочої культури КТ, КМ	робоча культура <i>Corynebacterium glutamicum</i> В-6 на чашках Петрі температура, час, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування	t = 29–31°С t = 20 год мікробіологічна чистота
ТП 7.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах хКТ, КМ	робоча культура <i>Corynebacterium glutamicum</i> В-6 у пробірках температура, час, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування	t = 30°С t = 20 год мікробіологічна чистота

Закінчення табл. 7.1

<p>ТП 7.4 Вирощування культури в колбах на качалках Кт, Км</p>	<p>посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, частота обертання колб підтримується автоматично, мікробіологічний контроль – після культивування</p>	<p>$t^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$ $t = 20$ год $n = 250 \text{ хв}^{-1}$ мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 7.5, 7.6, 7.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом $0,063 \text{ м}^3$, $0,63 \text{ м}^3$, $6,3 \text{ м}^3$ Кт, Км</p>	<p>посівний матеріал рН, температура, час, швидкість перемішування, витрата аераційного повітря, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, датчик рН, годинник, тахометр, ротаметр, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>рН – перед початком процесу, температура, частота обертів мішалки та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси та мікробіологічний контроль – кожні 8 год і після культивування</p>	<p>$\text{pH} = 7,2$ $t = 30^{\circ}\text{C}$ $t = 20$ год $v = 1 \text{ л}/(\text{л}^*\text{хв})$ $n = 250 \text{ хв}^{-1}$ мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 8.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 63 м^3 Кт, Км</p>	<p>культуральна рідина температура, час, швидкість перемішування, витрата аераційного повітря, рН, концентрація біомаси, концентрація лізину, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, рН, годинник, тахометр, ротаметр, хроматограф, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, швидкість перемішування та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси, лізину, мікробіологічний контроль – кожні 8 год</p>	<p>$\text{pH} = 7,2$ $t = 30^{\circ}\text{C}$ $t = 60$ год $v = 1 \text{ м}^3/(\text{м}^3*\text{хв})$ $n = 220 \text{ хв}^{-1}$ $C (\text{лізину}) = 221,3 \text{ г/л}$ мікробіологічна чистота</p>

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва на місця емісії рідких, твердих та газоподібних відходів

Процес біосинтезу лізину *Corynebacterium glutamicum* К-8 супроводжується утворенням рідких відходів, до яких відносяться залишки культуральної рідини та мийно-дезінфікуючих розчинів. Речовини, що містяться у відповідних рідинах, можуть бути загрозливими для навколишнього середовища, у зв'язку з чим постає потреба у встановленні систем, що дозволять забезпечити знешкодження таких речовин.

На території біотехнологічних виробництв утворюються три види стічних вод: виробничі, побутові й атмосферні.

Середні за зміну витрати виробничих стічних вод становлять:

$$Q_e = q_e \cdot n = 10000 \cdot 5557 = 55570 \text{ м}^3/\text{рік} = 152,246 \text{ м}^3/\text{добу}$$

де q_e – норма відведення води в л на одиницю продукції, що підприємство виробляє (орієнтовно приймаємо 10000 л/кг); n – кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (5557 кг).

Середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = q_n \cdot N = 25 \cdot 15 = 375 \text{ л/зміну}$$

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л/зм на одного робітника (приймаємо для холодного цеху 25 л/зм люд); N – кількість працівників у зміні.

За добу в середньому матимемо наступну витрату побутових стічних вод:

$$Q_n = Q_n \cdot N_{зм} = 375 \cdot 3 = 1225 \text{ л/добу}$$

де $N_{зм}$ – кількість змін на добу (3).

За добу в середньому матимемо наступну витрату атмосферних стічних вод:

$$Q_a = Q_n/5 = 375/5 = 75 \text{ л/добу}$$

Таким чином, розрахуємо загальну витрату утворюваних на підприємстві стічних вод:

					НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Набігуз В.О.			РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							70	7
Керівник		Лич І.В.				70		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 152246 + 1225 + 75 = 153,546 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Біосинтез лізин *Corynebacterium glutamicum* К-8 супроводжується утворенням таких газоподібних відходів, як аераційне повітря після процесу культивування продуцента, котре має аерозоль клітин мікроорганізму, а також продукти його життєдіяльності.

Тривалість процесу отримання інокуляту та виробничого біосинтезу складає по 40 год. Для аерації середовища використовують стерильне повітря зі швидкістю аерації – 1,2 л повітря на 1 л культуральної рідини за одиницю часу (хв). У виробничому приміщенні розміщують 5 біореакторів об'ємами 6,3 л, 63 л, 630 л, 6,3 м³ та 63 м³. Розрахуємо об'єм повітря для посівних апаратів. Оскільки нам відомо, що аерація проводиться 1,2 л на 1 л культуральної рідини, то з цього отримаємо:

Для інокулятора на 6,3 літри:

$$1,2 \times 3,1 = 3,72 \text{ л/хв.}$$

А оскільки культивування проводиться впродовж 40 годин, то:

$$3,72 \times (40 \times 60) = 8928 \text{ л} = 8,928 \text{ м}^3.$$

Для інокулятора на 63 літри:

$$1,2 \times 31 = 37,2 \text{ л/хв.}$$

А оскільки культивування проводиться впродовж 40 годин, то:

$$37,2 \times (40 \times 60) = 89280 \text{ л} = 89,28 \text{ м}^3.$$

Для інокулятора на 630 літри:

$$1,2 \times 31 = 372 \text{ л/хв.}$$

А оскільки культивування проводиться впродовж 40 годин, то:

$$372 \times (40 \times 60) = 892800 \text{ л} = 892,8 \text{ м}^3.$$

Для інокулятора на 6,3 м³:

$$1,2 \times 31 = 3720 \text{ л/хв.}$$

А оскільки культивування проводиться впродовж 40 годин, то:

$$3720 \times (40 \times 60) = 8928000 \text{ л} = 8928 \text{ м}^3.$$

Розрахуємо об'єм повітря для ферментера: $1,2 \times 31 = 37,2 \text{ м}^3/\text{хв.}$

А оскільки культивування проводиться впродовж 40 годин, то:

$$37,2 \times (40 \times 60) = 89280 \text{ м}^3.$$

Таким чином, загальна кількість відпрацьованого аераційного повітря становитиме:

$$8,928 + 89,28 + 892,8 + 8928 + 89280 = 99199 \text{ м}^3.$$

8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Розраховану кількість рідких відходів можна знешкодити за допомогою системи зворотного осмосу RO-7000 Small (Аква Форсайт, Україна) продуктивністю 168000 л/добу. Принцип очистки стічних вод з використанням системи зворотного осмосу полягає у подачі рідини під тиском на спеціальну мембрану, в результаті чого забруднювачі затримуються, а чиста вода проходить далі [48]. До переваг даного методу можна віднести те, що він робить можливим виведення з рідин та знешкодження низькомолекулярних речовин, до того ж отриману в результаті даного очищення воду можна використовувувати далі у процесі виготовлення готового до використання продукту [49]. Автоматика установки дозволяє забезпечити електричний захист насосу від сухого ходу, мембран від високого тиску, а також уможлиблює виконання гідравлічної промивки мембран. Система оснащена передфільтром Big Blue 20 з діаметром пор 5 мкм та контролером.



Рис. 8.1. Система зворотного осмосу RO-7000 Small

У систем зворотного осмосу також наявний суттєвий недолік: їх використання безпосередньо для очистки відпрацьованої рідини є економічно недоцільним, зважаючи на швидке забивання фільтрів та систем [49]. Враховуючи наявність у комплектації системи передфільтру з пропускною здатністю 5 мкм [48], доцільним буде встановити фільтр MPF моделі MPF1002AG2P10NBP01 (MP Filtri, Італія), діаметр пор якого складає 10 мкм [50]. Даний крок дозволить зменшити навантаження на передфільтр, що зробить можливим збільшити період його експлуатації. З тією ж метою необхідно встановити гідравлічний зливний фільтр моделі MPF1003AG3P25NBP01 (MP Filtri, Італія), котрий здатен затримувати частки діаметром більше 25 мкм. У якості матеріалу фільтроелементу у даних пристроях використовується мікрокартон з пропиткою [50].

Детальна інформація з приводу технічних характеристик обладнання для знешкодження рідких відходів виробництва наведена в таблиці 8.1.

Таблиця 8.1

Технічні характеристики обладнання для знешкодження рідких відходів

Показник	Назва обладнання		
	Фільтр MPF1002AG2P10NB P01	Фільтр MPF1002AG2P25N BP01	Система зворотного осмосу RO- 7000 Small
Виробник	MP Filtri, Італія	MP Filtri, Італія	Аква Форсайт, Україна
Максимальна продуктивність, л/добу	158400	172800	168000
Робочий тиск, бар	3,5 – 4,0	3,5 – 4,0	1,5 – 10,0
Максимальний тиск у водопроводі, бар	8	8	10
Габарити, мм (Ш/В/(Г))	104/246	174/539	3700/1700/800

8.2.2 Системи знешкодження газоподібних відходів

Для знешкодження газоподібних продуктів життєдіяльності пропонуємо встановити вологі скрубери моделі Spray Venturi Scrubbers від ACMAN [51].

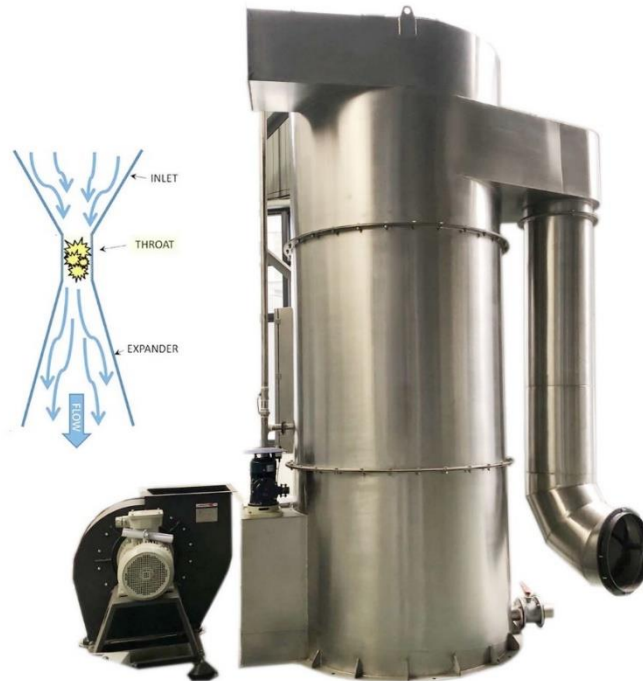


Рис 8.2. Скрубер моделі Spray Venturi Scrubbers [51].

Скрубери даного типу використовуються у хімічній та фармацевтичній промисловості в широкому діапазоні застосувань. Такі скрубери збирають грубі або дрібні частинки, включаючи частки розміром менше 1 мікрона та частинки, які є липкими або мають високий вміст вологи. Ефективність очищення повітря при використанні подібних апаратів становить до 98,5%. Для використання у нашому випадку доцільно буде використовувати модель FCT-40 з продуктивністю 3786-4527 м³/год. Потужність насоса складає 0,75 кВт, оснащений резервуаром для води об'ємом 700 л, діаметр тіла апарату – 950 мм [51].

8.2.3. Системи знешкодження та утилізації твердих відходів

Процес біосинтезу лізину *Corynebacterium glutamicum* K-8 супроводжується утворенням таких твердих відходів, як залишки біомаси та пакувальні матеріали тари мийно-дезінфікуючих засобів та компонентів поживного середовища.








Утилізацію біомаси пропонується здійснювати шляхом убойного автоклавовання у відповідних установках.

Утилізацію тари пластмасових відходів від мийно-дезінфікуючих засобів та компонентів поживного середовища пропонується здійснювати шляхом сортування

та подальшої передачі на відповідні підприємства, що спеціалізуються на переробці такої сировини. Упаковки та кришки сортують відповідно до видів пластику, наведених у таблиці 8.3.

Таблиця 8.2

Види пластику для сортування

Вид пластику	Маркування	Джерело
ПЕТ (PETE) – поліетилентерефталат		
ПВТ (HDPE) – поліетилен високого тиску		
ПВХ (PVC) – полівінілхлорид		
ПНТ (LDPE) – поліетилен низького тиску		[52]
ПП (PP) – поліпропілен		
ПС (PS) – полістирол		
ІНШЕ (OTHER) – полікарбонат та інші пластмаси		

По закінченню сортування пластик необхідно ретельно помити та просушити перед передачею на підприємство з переробки. В Україні переробкою та утилізацією таких видів пластику займається «Регіон-2001» [53].

Також у процесі виробництва може утворюватися невеликий відсоток скляних відходів у результаті пошкодження скляного лабораторного посуду. Склобій пропонується збирати до окремої тари та далі відправляти на утилізацію до відповідного підприємства. Також може утворюватися певна кількість відходів з картону при використанні коробок з цього матеріалу у якості групової упаковки для мийно-дезінфікуючих засобів чи компонентів поживного середовища. Скляні та картонні відходи можна також відправляти на підприємство «Регіон-2001», що займається переробкою таких матеріалів [53].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Xu, J.-Z., Ruan, H.-Z., Yu, H.-B., Liu, L.-M., & Zhang, W. (2020). Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar. *Microbial Cell Factories*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1294-7>.
2. 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.
3. Eggeling, L., & Bott, M. (2015). A giant market and a powerful metabolism: L-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 3387-3394. doi: 10.1007/s00253-015-6508-2.
4. Дехтяр Ю. Ф. Мікробіологічне виробництво кормів та кормових добавок: курс лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162 “Біотехнологія та біоінженерія” денної форми навчання / Ю. Ф. Дехтяр. Миколаїв : МНАУ, 2017. 99 с.
5. Liu, J., Xu, J. Z., Rao, Z. M., & Zhang, W. G. (2022). Industrial production of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum*: Progress and prospects. *Microbiological Research*, 262, 127101. doi: 10.1016/j.micres.2022.127101.
6. Liu, N., Zhang, T. T., Rao, Z. M., Zhang, W. G., & Xu, J. Z. (2021). Reconstruction of the diaminopimelic acid pathway to promote L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9065.. doi: 10.3390/ijms22169065.
7. Xu, J. Z., Wu, Z. H., Gao, S. J., & Zhang, W. (2018). Rational modification of tricarboxylic acid cycle for improving L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial cell factories*, 17, 1-13. doi: 10.1186/s12934-018-0958-z.
8. Takano, H., Shimizu, A., Shibosawa, R., Sasaki, R., Iwagaki, S., Minagawa, O., ... & Ueda, K. (2008). Characterization of developmental colony formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 81, 127-134. doi: 10.1007/s00253-008-1622-z

9. Graf, M., Zieringer, J., Haas, T., Nieß, A., Blombach, B., & Takors, R. (2018). Physiological response of *Corynebacterium glutamicum* to increasingly nutrient-rich growth conditions. *Frontiers in microbiology*, 9, 2058. doi: 10.3389/fmicb.2018.02058.
10. Tsuge, Y., & Yamaguchi, A. (2021). Physiological characteristics of *Corynebacterium glutamicum* as a cell factory under anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(16), 6173-6181. doi: 10.1007/s00253-021-11474-w.
11. Liu, N., Zhang, T. T., Rao, Z. M., Zhang, W. G., & Xu, J. Z. (2021). Reconstruction of the diaminopimelic acid pathway to promote L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9065. doi: 10.3390/ijms22169065.
12. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. Київ, НУХТ. 2010. 632 с.
13. Kircher, M., & Pfefferle, W. (2001). The fermentative production of l-lysine as an animal feed additive. *Chemosphere*, 43(1), 27–31. doi: 10.1016/s0045-6535(00)00320-9.
14. Liao, S. F., Wang, T., & Regmi, N. (2015). Lysine nutrition in swine and the related monogastric animals: muscle protein biosynthesis and beyond. *SpringerPlus*, 4, 147. doi: 10.1186/s40064-015-0927-5.
15. ОСНОВИ НОРМОВАНОЇ ГОДІВЛІ СВИНЕЙ/ Виробнично-практичні рекомендації //Укладачі: Топіха Віра Сергіївна, Лихач Вадим Ярославович, Луговий Сергій Іванович, Лихач Анна Василівна, 146 Крамаренко Сергій Сергійович:// Миколаївський національний аграрний університет, 2016.
16. Гопка М. Український і світовий ринок свинини: тенденції та прогнози [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ucab.ua/ua/pres_sluzhba/blog/maksim_gopka/ukrainskiy_i_svitoviy_rinok_svinini_tendentsii_ta_prognozi/.
17. Порошок Лізин 55% кормова добавка 1 кг Укрветбіофарм [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://krolikam.com.ua/ua/bilkovo-aminokyslotni-sahara/lizin-1-kg?srsltid=AfmBOorgZgN5IMsrs-Fmb8MG8H26A3Mk-iBawt6S3dQL6qzylLFPdIq->.

18. Амінокислота Лізин моногідрохлорид 98,5%, кормова добавка [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zahid-agromiks.com.ua/ua/p11214217-aminokislota-lizin-monogidrohlorid.html>.
19. Metabolic pathways - *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Kyowa Hakko). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/cgl00010>.
20. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с. 35.
21. Конструкції ферментерів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bioengineering.kpi.ua/attachments/article/277/%D0%93%D0%BB%D0%B0%D0%B2%D0%B0%204.pdf>.
22. Головей О. П. , Гуляєв В. М. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О. П., Гуляєв В. М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.
23. Моделі повітряних компресорів і промислові рішення [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.atlascopco.com/uk-ua/compressors/products/air-compressor>.
24. Фільтр грубої очистки [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.buyfilteronline.com/brands/donaldson/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUIV2etU2MyEJacKiwRhizG3UAMGyfTppWOYBlaxizo3gWxKVMo5K5gaAo25EALw_wcB.
25. Turbo Air Compressors [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ingersollrand.com/en/air-compressor/turbo-air-compressors>.
26. Теплообмінник-охолоджувач [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://en.bjhuaaixin.com/Recommended/2.html?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUmo-34uNeMPtv8wNIKUxPZ2YWG-ha3QrTl_zg0lzsBZqrc50vr3ZsaAlZiEALw_wcB.

27. Ресивер CRVZS-5 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.festo.com/ua/uk/a/192159/>.
28. Теплообмінник-нагрівач [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://en.ahlsell.se/en/products/cooling/heat-exchanger/evaporators/spare-parts-guntner/7443031>.
29. Фільтри Donaldson [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://art-agro.com.ua/filtri-donaldson>.
30. Фільтри тонкого очищення ДУ-350/Д-23 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interholod.com.ua/ua/p716654683-filtry-tonkoj-ochistki.html>.
31. ЦКТ ферментер Grainfather SF50 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://kamrad.ua/ua/tskt-fermenter-grainfather-sf50?srsltid=AfmBOop4H4LzErA_VdXHhW2ylgsF050AgO25H8T3S8iMzMcjwCu1eBu
у.
32. Насос поверхневий відцентровий Vitals aqua PRO CP 10100Y [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vitals-aqua.ua/poverhnostnyye-nasosy/tsentrobezhye-seriya-cp/pro-cp-10100y>.
33. Ферментер (біореактор) Minifors, Infors [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/fermenteryInfors/>.
34. Дозатор напівавтоматичний фірми “ABC Tech” моделі ВДСВ-2 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://storage.ua.prom.st/1655371_pasport_ustanovka_fasovo_ya_modeli_vdsv1_vdsv2.pdf.
35. Скляний реактор із сорочкою S212 об'єм 10 літрів, реакційний котел [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hms-ua.com/ua/p1445439783-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html>.
36. Реактор-ферментер ФР-500 для біологічних препаратів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rastenij-500-1/>.
37. Ємності з нержавіючої сталі від 30 до 20000 літрів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p15745045-emkosti-nerzhaveyuschej-stali.html>.

38. Пластинчастий теплообмінник з болтами X-PWT 1333M-VA, 600кВт Махдагпа [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tbpool.com.ua/p/plastinchatyj-teploobmennik-s-boltami-x-pwt-1333-va-600kvt->.

39. Осушувач рефрижераторного типу ATS DGO 780 (PRZ014310) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tusk.ua/product/osushitel-refrizheratornogo-tipa-ats-dgo-780/>.

40. Збірник фірми WENZHOU L&B FLUID EQUIPMENT CO.,LTD [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.blsvalve.com/>.

41. Фільтр для затримки часток [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.buyfilteronline.com/brands/donaldson/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUIV2etU2MyEJacKiwRhizG3UAMGyfTppWOYBlaxizo3gWxKVMo5K5gaAo25EALw_wcB.

42. Осушувач рефрижераторного типу ATS DGO 780 (PRZ014310) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tusk.ua/product/osushitel-refrizheratornogo-tipa-ats-dgo-780/>.

43. Ферментер [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf>.

44. 11. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. 252 с.

45. Xu, J., Zhang, J., Guo, Y., Zai, Y., & Zhang, W. (2013). Improvement of cell growth and l-lysine production by genetically modified *Corynebacterium glutamicum* during growth on molasses. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(12), 1423–1432. doi: 10.1007/s10295-013-1329-8.

46. Becker, J., Klopprogge, C., Zelder, O., Heinzle, E., & Wittmann, C. (2005). Amplified Expression of Fructose 1,6-Bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* Increases In Vivo Flux through the Pentose Phosphate Pathway and Lysine Production on

Different Carbon Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8587–8596. doi: 10.1128/aem.71.12.8587-8596.2005.

47. Krömer, J. O., Fritz, M., Heinzle, E., & Wittmann, C. (2005). In vivo quantification of intracellular amino acids and intermediates of the methionine pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Analytical Biochemistry*, 340(1), 171–173. doi: 10.1016/j.ab.2005.01.027.

48. Система зворотного осмосу RO-7000 л/год Small (без мембрани) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p2382778059-sistema-obratnogo-osmosa.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=4&gclid=CjwKCAiAqfe8BhBwEiwAsnebGThOA3Ro7C3cugAoBNPlc1FQJcW5UWSQTCxBKwMNbQ9Xbqc_zwlPRhoCxuoQAvD_BwE.

49. Красінько В.О. Природоохоронні біотехнології [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв. – проф. прогр. «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. - К: НУХТ, 2020. – 218 с.

50. Фільтр зливний (зворотної лінії) MP Filtri MPF 1811 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hydraulic.ua/filtr-zlivniy-zvorotnoi-linii-mp-filtri-mpf1811-mikrokarton-z-propitkou-10-mkm-280-l-khv/>.

51. Venturi Scrubber, Spray Venturi Scrubbers Manufacturers, Venturi Wet Scrubber Air Pollution Control [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.acman-dustcollector.com/pid18439175/Venturi-Scrubber-Spray-Venturi-Scrubbers-Manufacturers-Venturi-Wet-Scrubber-Air-Pollution-Control.htm>.

52. Позначки на пластику: що потрібно знати, коли ви купуєте воду в пластиковій пляшці [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://solvetpv.lviv.ua/poznachky-na-plastyku-shho-potribno-znaty-koly-vy-kupuyete-vodu-v-plastykovij-plyashti/>.

53. Заготівельно-виробниче приватне підприємство «Регіон-2001»
[Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://region-2001.com.ua/services/pererobka-
vtorsirovini/pererobka-smittya-ta-vidkhodiv/pererobka-plastika](http://region-2001.com.ua/services/pererobka-
vtorsirovini/pererobka-smittya-ta-vidkhodiv/pererobka-plastika).

Abstract

A new and innovative process for the biotechnological production of L-lysine is presented, exemplified here by the fermentative production of the feed additive Biolys®60. The novel feature of this product is that the entire manufacturing concept, i.e. the production strain, the raw materials, all process stages and the product specifications have been systematically tailored for optimal environmental compatibility and for minimum resource depletion and waste. The process completely dispenses with the need to discharge residual and waste material and reduces the handling of hazardous materials to a minimum. Since only a few process stages are involved, the method is economical to use and investment outlay is reduced. The process, which also leads to a higher grade product, is thus highly attractive in both ecological and economical terms. By boosting the nutrient value of the plant-based feedstuffs, the product itself makes a cost-effective contribution towards a more sustainable form of animal feeding and by reducing nitrogen emission levels promotes a more environmentally compatible form of animal husbandry. © 2001 Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; Amino acid; Essential amino acid; L-lysine; Fermentation; Feed additive

1. Introduction

The vision that lay behind the biotechnological process presented here was that of developing a process for the production of an animal feed additive – in this case, the amino acid L-lysine, which would meet the following criteria:

Based on the concepts of integrated environmental protection and sustainable development, the product should be manufactured from renewable raw materials in a simple and therefore cost-effective process without generating waste or residual material. The product should provide customers both economic and ecological benefits.

1.1. The areas of application

Before discussing the process in detail, the usage of L-lysine, which has an annual world market of some 400,000 t will be briefly presented.

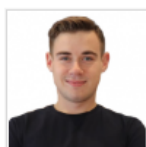
Proteins are essential components in feedstuffs. They are composed of the 20 proteinogenic amino acids which are released when the feed proteins are digested. From these building blocks, the animal synthesizes its typical proteins, i.e. poultry, pigs, fish, etc., all have their own species-specific amino acid spectrum. Many amino acids can be synthesized by the animal itself. In the case of others, the so-called essential amino acids the animal relies upon the amino acids being supplied by the food. The vegetable feedstuffs also have their own characteristic amino acid spectrum, which differs from that of the animal. It is generally found that the essential amino acids, methionine, lysine and threonine are only present in limiting quantities in the crude feed materials. Fig. 1

* Corresponding author.

E-mail address: manfred.kircher@degussa-huels.de (M. Kircher).

0045-6535/01/\$ - see front matter © 2001 Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

PII: S 0 0 4 5 - 6 5 3 5 (0 0) 0 3 2 0 - 9



30.01.2024

Український і світовий ринок свинини: тенденції та прогнози

Для галузі свинарства 2023 рік став роком випробувань і водночас відновлення. Через глобальні воєнні та економічні виклики галузь зазнала значних труднощів. Проте, всупереч перешкодам, свинарство демонструвало виняткову стійкість і здатність до відновлення – весь минулий рік поступово збільшувалося поголів'я тварин, що свідчило про пожвавлення у галузі.

На 1 січня 2024 року поголів'я свиней становить 5,0 млн голів, що на 1,1% більше, ніж в аналогічний період минулого року. Зокрема, на підприємствах ріст поголів'я склав 4,8% та становить 3,14 млн голів (65,8% від усього поголів'я). Натомість в господарствах населення спостерігається зниження поголів'я за рік на 5,2% та становить 1,70 млн голів. **Найбільша чисельність поголів'я спостерігається в: Київській (620,4 тис. голів), Львівській (427,1 тис. голів), Хмельницькій (377,6 тис. голів), Тернопільській областях (375,8 тис. голів).** Сумарно ці області мають 36% свиней від загального поголів'я.

Проте, найбільший приріст поголів'я у 2023 році демонструють області: Донецька +42,8% (196,1 тис. голів), Житомирська +25,5% (138,1 тис. голів), Полтавська + 10,4% (271,2 тис. голів), Харківська +9% (65,2 тис. голів).



Опис



Характеристики



Інформація для замовлення

Лізин - незамінна **амінокислота**, яка бере участь в обміні нуклеїнових кислот, метаболізмі вуглеводних сполук, покращує азотний баланс в організмі, секрецію травних ферментів і транспорт кальцію в клітини. Лізином балансують раціони **свиней** і **птиці** за вмістом у ньому лізину.

L-Лізин моногідрохлорид (98-99%) сприяє інтенсивному засвоєнню кормів і активному росту тварин. В основному він необхідний тваринам з однокамерним шлунком - птиці і свиням.

Використання лізину дозволяє збільшити приріст тварин і птиці на 10 - 30%, підвищити надої молока на 12%, - збільшити несучість курей на 10%. У всіх раціонах, які звичайно застосовуються в свинарстві, лізин за важливістю випереджає інші амінокислоти.

Дефіцит лізину у курей батьківського стада підвищує смертність ембріонів на 5 - 9%. У бройлерних курчат при дефіциті лізину слабо формуються м'язи, що знижує якість м'яса.

Тваринам і птиці він необхідний для регуляції обміну азоту, вуглеводів, а також для синтезу нуклеотидів, хромопротеїдів, сприяє інтенсивному росту молодняку, інтенсивному використанню кормів, утворенню меланінового пігменту в оперенні птиці; впливає на формування еритроцитів і відкладення в кістках кальцію, бере участь в окисно-відновних реакціях, активізує переамінування і дезамінування амінокислот, сприяє засвоєнню фосфору і кальцію. У всіх раціонах, які використовуються під час відгодівлі свиней, лізин за важливістю випереджає інші амінокислоти.

Основні сировинні компоненти для виробництва лізину: м'яса, кукурудзяний екстракт, соляна кислота, аміачна вода, вітаміни, висівки, соняшниковий шрот, рибне борошно, м'ясо-кісткове борошно та ріпак.

Користь:

- Бере участь в обміні нуклеїнових кислот
- Поліпшує азотний баланс в організмі тварини
- Покращує секрецію травних ферментів
- Покращує транспорт кальцію в клітини

Дозування:

Вноситься в комбікорми і в кормосуміші згідно з нормами використання лізину, враховуючи його фактичний вміст в кормах. При цьому Рекомендований вміст лізину в кормі повинен складати (кг / т):

Бройлери - 1,0-2,5;

Несучки - 0,5-1,0;

Індички, куріпки - 1,5-2,5;

Поросята до 25кг - 1,5-2,5;

Свині на відгодівлі - 1,0-1,5;

Свиноматки - 0,5-1,0

Фасування: 25 кг



Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar

Jian-Zhong Xu^{1*}, Hao-Zhe Ruan¹, Hai-Bo Yu¹, Li-Ming Liu² and Weiguo Zhang¹

Abstract

The efficiency of industrial fermentation process mainly depends on carbon yield, final titer and productivity. To improve the efficiency of L-lysine production from mixed sugar, we engineered carbohydrate metabolism systems to enhance the effective use of sugar in this study. A functional metabolic pathway of sucrose and fructose was engineered through introduction of fructokinase from *Clostridium acetobutylicum*. L-lysine production was further increased through replacement of phosphoenolpyruvate-dependent glucose and fructose uptake system (PTS^{Glc} and PTS^{Fru}) by inositol permeases (IolT1 and IolT2) and ATP-dependent glucokinase (ATP-GIK). However, the shortage of intracellular ATP has a significantly negative impact on sugar consumption rate, cell growth and L-lysine production. To overcome this defect, the recombinant strain was modified to co-express bifunctional ADP-dependent glucokinase (ADP-GIK/PFK) and NADH dehydrogenase (NDH-2) as well as to inactivate SigmaH factor (SigH), thus reducing the consumption of ATP and increasing ATP regeneration. **Combination of these genetic modifications resulted in an engineered *C. glutamicum* strain K-8 capable of producing 221.3 ± 17.6 g/L L-lysine with productivity of 5.53 g/L/h and carbon yield of 0.71 g/g glucose in fed-batch fermentation. As far as we know, this is the best efficiency of L-lysine production from mixed sugar. This is also the first report for improving the efficiency of L-lysine production by systematic modification of carbohydrate metabolism systems.**

Keywords: L-lysine, *Corynebacterium glutamicum*, Carbohydrate metabolism systems, Fructokinase, ATP availability

Background

L-lysine, an essential amino acids for animals and humans, is widely used as feed additive, composition of pharmaceuticals, and feedstock for cosmetics and polymer materials [1]. With the expansion and deep-going of L-lysine's applications, the demands for L-lysine are growing rapidly in global marketplace [2]. In industry, L-lysine is mainly produced by microbial fermentation [3,

4]. Therefore, the excellent L-lysine producers and inexpensive fermentation feedstock are absolutely vital for fermentation to reduce the production costs.

Corynebacterium glutamicum and its subspecies are widely used as workhorse for producing L-lysine in industry [4, 5], because they possess the wide carbon resource utilization spectrum, including carbohydrate feedstock (e.g., glucose, fructose, sucrose and pentose) and non-carbohydrate feedstock (e.g., n-alkane, ethanol and organic acids) [6, 7]. In industry, the L-lysine production by *C. glutamicum* is primarily using glucose, fructose, sucrose or molasses as carbon sources, especially glucose [8]. Carbohydrate uptake and phosphorylation are mainly executed by phosphoenolpyruvate- carbohydrate

*Correspondence: xujianzhong@jiangnan.edu.cn

¹ The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, 1800# Lihu Road, Wuxi 214122, China

Full list of author information is available at the end of the article

Комбінація цих генетичних модифікацій призвела до створення інженерного штаму *C. glutamicum* K-8, здатного виробляти 221,3 ± 17,6 г/л L-лізину з продуктивністю 5,53 г/л/год і виходом вуглецю 0,71 г/г глюкози при порційному ферментації

phosphotransferase system (PTS) consisting of 1 membrane-bound carbohydrate-specific EIIABC component (EII) and 2 cytoplasmic components (i.e., enzyme I (EI) and histidine protein (HPr)) [9]. Previous researches have pointed out that the productivity of target products goes hand in hand with carbohydrate uptake capacity [10–12]. Although carbohydrate uptake capacity is increased with increasing the expression levels of the key genes in PTS, it will lead to overflow metabolism [10, 13]. In addition, PTS uses phosphoenolpyruvate (PEP) as phosphoryl group donor, resulting in the low intracellular PEP and the increase of flux through PEP carboxykinase [14]. It is a problem for realizing the efficient production of L-lysine that how to balance carbohydrate uptake capacity and carbohydrate consumption rate.

Aside from engineering PTS to increase the uptake rate of carbohydrates, a number of studies indicated the important role of PTS-independent carbohydrate uptake systems (i.e., non-PTS) for cell growth and production of target products (including L-lysine) by addition of *myo*-inositol to increase genes *iolT1* and *iolT2* expression level [15], by deletion or rational modification of transcriptional regulator IolR to derepress the expression of *iol*-genes [16–18], or by co-overexpression of the *myo*-inositol permease (i.e., IolT1 and IolT2; encoded by genes *iolT1* and *iolT2*, respectively) and glucokinases (e.g., Glk and PpgK; encoded by genes *glk* and *ppgK*, respectively) [19–22]. In *C. glutamicum*, the coupling system of *myo*-inositol permeases and glucokinases (designed as IGS, similarly hereinafter) has been proved to participate in carbohydrate uptake and phosphorylation [16, 17, 21–23], which belongs to non-PTS [23]. The IGS uses ATP or PolyP_n as phosphoryl group donor rather than PEP in *C. glutamicum*, thus increasing PEP availability [24]. In IGS, the carbohydrates are firstly transported into intracellular by *myo*-inositol permeases, and are then phosphorylated by glucokinases. However, IolT1 and IolT2 show a lower affinity for glucose as compared with EII_{GlC} [19]. Moreover, the expression of *iolT1* is repressed by IolR [18]. Lara et al. has proved that overflow metabolism can be circumvented with replacement of PTS by the coupling system of galactose permease and glucokinases in *Escherichia coli* [13]. This gives us a positive reference to construct L-lysine high-producing strain to improve the efficiency of L-lysine production.

Molasses, the major by-product of sugar industry, is a frequently-used and economical carbon source for producing many valuable fine chemicals by microbial fermentation, including ethanol [25], vitamin B₁₂ [26], docosahexaenoic acid [27]. This is because that molasses contains abundant nourishments and biological active substances, such as sugars, amino acids, inorganic salts, nicotinic acid, folic acid, thiamine, etc. [7, 27, 28].

Therefore, reuse of molasses is important for sugar industry to improve economic returns. At present, molasses is one of the main feedstock for amino acids production (e.g., L-lysine [10, 29], L-glutamate [30], poly- γ -glutamic acid [31]), because its main component is sucrose [7]. Sucrose can be easily hydrolyzed to glucose and fructose [7]. Although molasses is widely used for amino acid fermentation in industry, most published work focus on investigating the consumption rate of carbohydrates at single glucose, fructose, or sucrose as carbon source [32–34]. How to improve the utilization efficiency of molasses is an important problem to be solved in our present-day amino acids industry.

Corynebacterium glutamicum K-1 (i.e., *C. glutamicum* JL-6 $\Delta pck::ppc \Delta odx::pyc \Delta P1gltA/P_{tac-M} gdh$) is a L-lysine high-yielding strain with L-lysine production of 181.5 ± 7.65 g/L after cultivating 48 h in fed-batch culture [3]. However, the productivity of *C. glutamicum* K-1 is lower as compared with the previous results (3.78 g/L/h v.s. 4.00 g/L/h) [10]. The aim of this study was to make use of mixed sugar for L-lysine production by *C. glutamicum* K-1, in which the mixture of glucose and beet molasses was designed as mixed sugar. Furthermore, in order to improve the efficiency of L-lysine production from mixed sugar, we focused on the genetic modification of genes involved in carbohydrate metabolism systems to increase the L-lysine productivity of *C. glutamicum* K-1. The results verified that carbohydrate metabolism system is a good target for improving amino acid production.

Results and discussion

Hetero-expression of ScrK increases L-lysine production in *C. glutamicum* K-1 from mixed sugar

According to our previous results [7], total sugar concentration in beet molasses, supplied by COFCO Biochemical (Anhui) Co., Ltd., (Anhui, China), was about 50%, and especially sucrose was the most important components (more than 47%). Sucrose was assimilated and phosphorylated by sucrose-PTS (PTS^{Suc}) in *C. glutamicum* to yield sucrose-6-phosphate, and then sucrose-6-phosphate was hydrolyzed to glucose-6-phosphate and fructose by sucrose-6-phosphate hydrolase [35]. However, there is no fructokinase (ScrK) in *C. glutamicum* [36], resulting in that the intracellular fructose should be firstly excreted into extracellular and then re-assimilated via fructose-PTS (PTS^{Fru}). Previous results indicated that hetero-expression of ScrK is beneficial to increase the production of NADPH-dependent products with sucrose or mixed sugar as carbon source [7, 37–39]. Therefore, hetero-expression of ScrK from *C. acetobutylicum* at *pfkB* gene loci was set as a potential strategy for enhancing L-lysine production on mixed sugar in this study. As a result, the resulted strain *C. glutamicum* K-2

showed no fructose efflux, whereas the extracellular fructose in original strain *C. glutamicum* K-1 was increased at the initial stage of fermentation on CgXII^{IP}M-medium (Fig. 1a). There was no obvious difference in DCW between *C. glutamicum* K-1 and *C. glutamicum* K-2, but the maximal specific growth rate (μ_{\max}) of *C. glutamicum* K-2 ($\mu_{\max}=0.23/\text{h}$) was higher than that of *C. glutamicum* K-1 ($\mu_{\max}=0.20/\text{h}$) (Fig. 1b). The similar results were also obtained in the previous reports [7, 39]. However, these results are contrast to the results reported by Zhang et al. [38], in which DCW of recombinant strain with hetero-expression of ScrK was 15.5% lower than that of control strain. A possible reason is that more carbon source was used to synthesize target product. Consistent with the effect on cell growth, hetero-expression of ScrK obviously increased the L-lysine production on CgXII^{IP}M-medium (Fig. 1c). In addition, the sugar consumption rate of strain K-2 increased to 7.74 ± 0.45 (mmol C)/(g DCW)/h, which was 76.7% higher than that of strain K-1 (4.38 ± 0.47 (mmol C)/(g DCW)/h) (Table 1). The point is that hetero-expression of ScrK is ineffective in cell growth and L-lysine production with glucose as sole carbon source (Table 1), possibly because of the absence of fructose in culture [7].

In addition, fed-batch fermentation was carried out in a 1-L jar fermenter containing 0.25 L fermentation media to test the production performance of strain K-2. Compared with strain K-1, hetero-expression of ScrK had a trend to increase L-lysine production (Fig. 2a). The L-lysine production of strain K-2 reached to 187.3 ± 11.7 g/L, which was 9.0% higher than that of strain K-1 (171.8 ± 5.6 g/L). However, it cannot be ignored that strain K-2 accumulated large amount of by-products, especially lactate, L-alanine and L-valine (Fig. 2b). The main reason for this is that carbohydrate uptake by PTS will produce pyruvate (Fig. 3), thus leading to overflow metabolism [13]. Therefore, the next plan is to modify the carbohydrate uptake system in strain K-2 to reduce the amount of by-products.

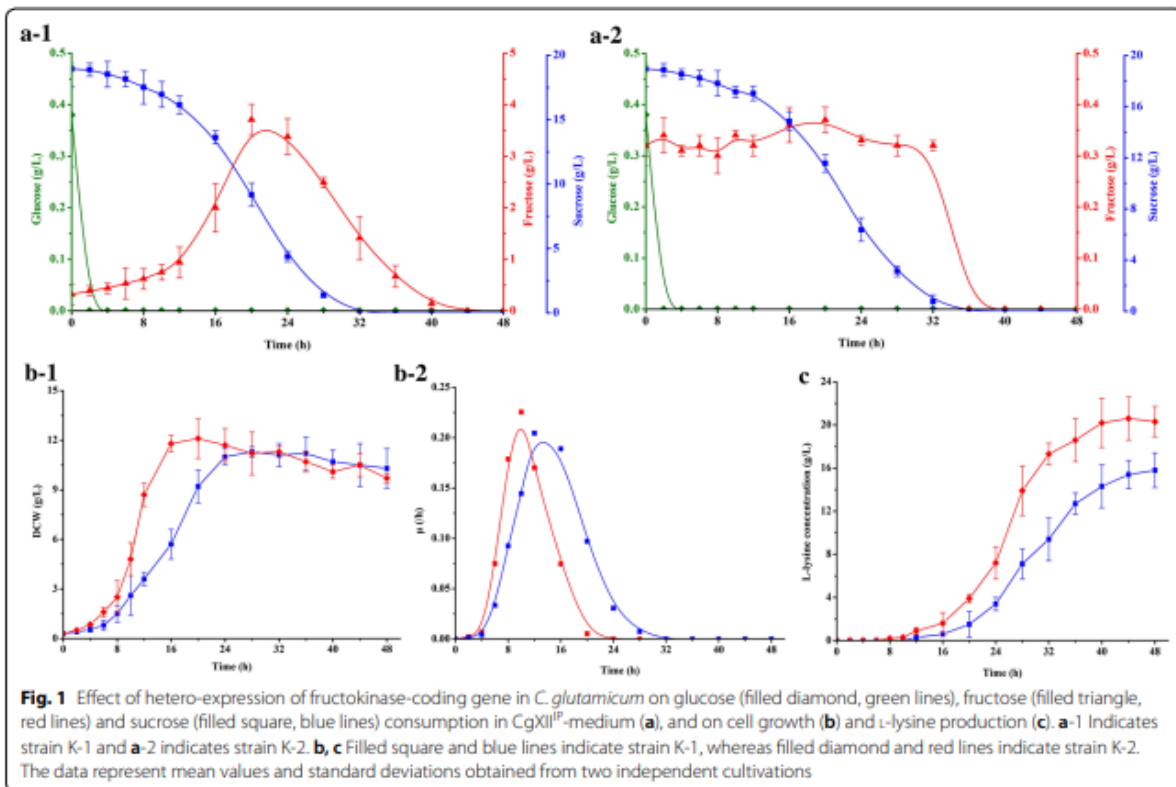
Deletion of *ptsG* and *ptsF* genes cause a decrease in carbohydrates consumption in *C. glutamicum*

The *ptsG* and *ptsF* genes encode membrane-bound glucose-specific EIIABC (EII_{Glc}) and fructose-specific EIIABC (EII_{Fru}), respectively [39]. EII_{Glc} and EII_{Fru} facilitate glucose and fructose movement across membrane, respectively (Fig. 3). Theoretically, deletion of *ptsG* and *ptsF* genes reduces the intake of sugar via PTS and thus compels strain to assimilate sugar via non-PTS. In order to verify this inference, *ptsG* and *ptsF* genes were deleted in strain K-2. However, the target strain *C. glutamicum* K-2 $\Delta ptsG \Delta ptsF$ (i.e., *C. glutamicum* K-3) showed bad cell growth and L-lysine production as compared with

strain K-2 on CgXII^{IP}-medium with glucose or fructose as sole carbon source (Table 1). This is because PTS is the major carbohydrates uptake system in *C. glutamicum* [23]. In addition, although *C. glutamicum* possess IGS for assimilating glucose and fructose, the key components (i.e., *myo*-inositol permease and glucokinases) show the low expression level and the low affinity for glucose and fructose [18, 19, 21]. Interestingly, deletion of *ptsG* and *ptsF* genes is ineffective in cell growth and L-lysine production with sucrose or molasses as carbon source (Table 1), because glucose and fructose in culture is negligible. However, it should be noted that the production performance of strain K-3 (including DCW, L-lysine production and sugar consumption rate) was dramatically disturbed by deletion of *ptsG* and *ptsF* genes in fed-batch fermentation (Additional file 1: Fig. S1). *C. glutamicum* exhibits a strong preference for glucose as carbon source [8]. And fermentation medium and feed solution mainly contain glucose (see "Methods" section) [10]. These may be the reasons for the bad production performance of strain K-3 in fed-batch fermentation. In consideration of the physiology of strain K-3 and the functional role of IGS, the expression levels of *myo*-inositol permease and glucokinases in strain K-3 should be increased to enhance the participation of IGS in carbohydrates uptake in L-lysine producer.

Over-/hetero-expression of *IolT1*, *IolT2*, ATP-GIK and ADP-GIK accelerates carbohydrates consumption in PTS^{Glc}- and PTS^{Fru}-deficient strains

As mentioned above, *C. glutamicum* possess IGS for carbohydrate uptake, but *myo*-inositol permease and glucokinases show the low expression level and the low affinity for glucose and fructose [18, 19, 21]. To overcome these defects and to push carbohydrate into cell via IGS, the dominant strategy is to increase the expression level of *myo*-inositol permease and glucokinases. *myo*-inositol permease (e.g., *IolT1* or *IolT2*) and glucokinases (e.g., PpgK or ATP-GIK) have been demonstrated to redirect carbohydrate uptake by IGS in *C. glutamicum* [19–22]. However, the expression of *IolT*-coding gene *iolT1* is repressed by *IolR* [18], and deletion of *IolR*-coding gene *iolR* causes certain negative effects on strain [17]. Therefore, the special promoter of *iolT1* (i.e., P_{oe}) with two point mutations at position -113 (A → G) and -112 (C → G) replaced the nature promoter of *iolT1* according to the reports by Brusseler et al. [17], and the nature promoter of *IolT2*-coding gene *iolT2* was replaced by P_{tuf} promoter, and then the second copy of *iolT2* gene with P_{tuf} promoter was introduced in strain K-3 genome, resulting in the final engineered strain *C. glutamicum* K-4. In response to these modifications, the cell growth, L-lysine production and sugar consumption rate of strain



K-4 were increased by ~1.9 times, 19.8 times and ~2.3 times as compared with strain K-3 on CgXII^{IP}-medium with glucose as sole carbon source, respectively (Table 1). The similar positive results were also found in fructose (increased by ~3.6 times, 17.1 times and ~5.7 times, respectively), whereas the increase of cell growth and sugar consumption rate was not obvious on sucrose and molasses (Table 1). These results indicated that IolT1 and IolT2 participate in the uptake of glucose and fructose, which were consistent with previous reports [21, 22]. Interestingly, this was also linked to an increase in the activity of PEP carboxylase (PPC) and pyruvate kinase (PYK) (Table 2). PPC catalyzes the biosynthesis of oxaloacetate from PEP, and PYK catalyzes the biosynthesis of pyruvate from PEP (Fig. 3) [1]. IGS turned away from PEP to phosphorylate carbohydrate, resulting in that a large amount of intracellular PEP can be used as substrate for PPC and PYK [14]. However, although the productivity of strain K-4 was improved as compared with strain K-3, it was lower than that of strain K-2 with glucose as sole carbon source (Table 1). Lindner et al. indicated that glucokinase must be required in PTS-independent glucose uptake system to phosphorylate glucose [24]. However, glucokinase from *C. glutamicum* shows

the low affinity for glucose with K_m values of 1.0 mmol/L [40]. In addition, many studies have demonstrated that it is necessary to co-overexpression of glucokinase to get the most out of IGS [20, 22], indicating that the expression level of glucokinase-coding gene was low in *C. glutamicum*.

Glucokinase catalyzes the phosphorylation of glucose to glucose-6-phosphate using ATP, ADP or inorganic polyphosphates (PolyP) as phosphoryl donor [19, 41]. *C. glutamicum* has two types of glucokinases, i.e., GIK_{Cg} (ATP-dependent enzyme; ATP-GIK, encoded by *glk_{Cg}*) and polyphosphate-glucose phosphotransferases (PolyP/ATP-dependent enzyme; PpgK, encoded by *ppgK*) [19], but PpgK plays a chief part in phosphorylation of glucose [40]. However, PpgK shows a low affinity for glucose with K_m values of 1.0 mmol/L [40]. In order to increase the glucose consumption of strain K-4, the native GIK_{Cg} was replaced by GIK from *Bacillus subtilis* 168 (i.e., GIK_{Bs}) with a high affinity for glucose ($K_m = 0.24$ mmol/L) [42]. In addition, the strong *tuf* promoter was located at the front of GIK_{Bs}-coding gene *glk_{Bs}*. The resulting strain K-5 exhibited significantly increased glucose consumption rate, cell growth and L-lysine production as compared with strain K-4 (Table 1). The final production of L-lysine

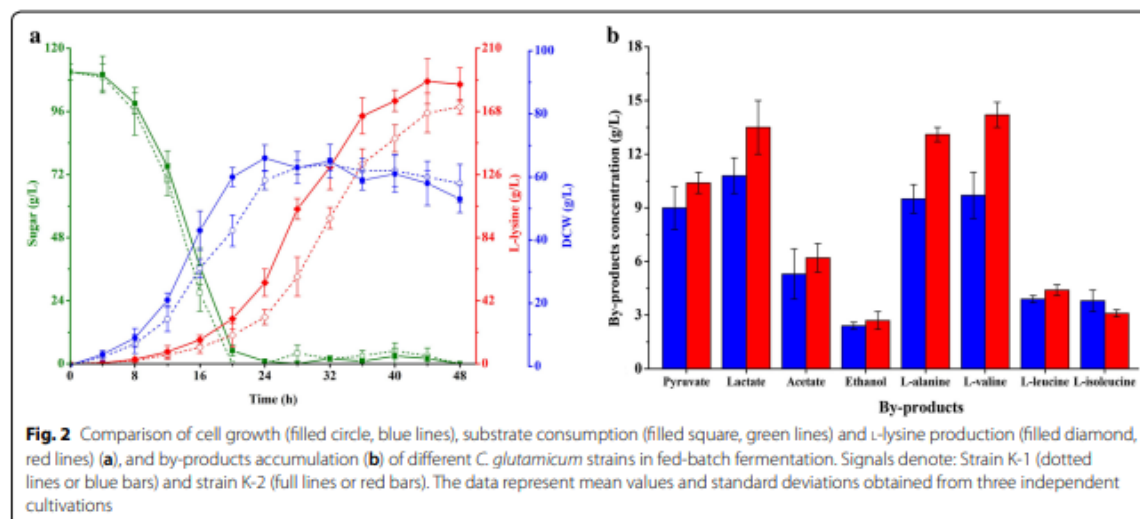
Table 1 DCW, Cell growth rate, L-lysine production, and substrate consumption rate of original strain *C. glutamicum* K-1 and its derivatives in shake flask experiments

Strains	Sugar	Glucose						Fructose						Sucrose						Molasses						
		DCW		μ_{max}		P_{Lys}		q_s		DCW		μ_{max}		P_{Lys}		q_s		DCW		μ_{max}		P_{Lys}		q_s^a		
		g/L	h	h ⁻¹	g/L	g/L	h	g/L	g/L	h	h ⁻¹	g/L	g/L	h	g/L	g/L	h	g/L	g/L	h	h ⁻¹	g/L	g/L	h	g/L	
K-1		10.9±1.2	0.25	24.1±1.6	6.26±0.57	8.6±0.5	0.2	17.2±1.8	5.13±0.40	9.9±0.8	0.24	18.9±1.2	5.18±0.32	10.3±1.2	0.2	15.8±2.1	4.38±0.47									
K-2		10.6±0.5	0.25	24.3±2.9	6.25±0.66	8.9±0.5	0.21	18.5±1.7	6.06±0.37	10.1±0.6	0.24	23.9±1.6	8.07±0.51	9.8±0.7	0.23	21.3±2.1	7.74±0.45									
K-3		1.8±0.2	0.06	0.5±0.06	1.02±0.13	2.1±0.2	0.07	1.3±0.3	1.21±0.05	9.9±1.0	0.23	24.2±1.3	8.06±0.54	9.8±0.3	0.23	22.0±1.8	7.80±0.56									
K-4		5.3±0.7	0.12	10.4±1.5	3.38±0.54	9.7±0.6	0.22	23.5±2.2	8.05±0.31	9.8±1.3	0.23	24.1±2.2	8.10±0.72	10.0±1.5	0.24	22.5±1.9	7.95±0.52									
K-5		8.9±1.0	0.18	25.3±2.2	7.89±0.71	10.0±1.3	0.22	23.8±3.0	8.06±0.74	9.7±0.9	0.22	24.7±2.7	8.12±0.53	9.8±1.0	0.22	22.8±2.5	7.99±0.63									
K-6		10.1±1.4	0.23	26.0±3.0	8.73±0.48	10.2±0.8	0.23	24.9±2.5	8.21±0.57	10.0±1.0	0.23	25.4±1.8	8.33±0.75	9.8±0.6	0.22	23.5±1.5	8.16±0.48									
K-7		11.4±1.2	0.26	26.4±1.8	10.62±0.55	10.8±1.3	0.24	25.4±2.1	9.75±0.65	11.1±1.6	0.25	26.0±2.5	9.92±0.49	10.7±0.9	0.24	24.1±2.5	9.72±0.98									
K-8		10.8±0.7	0.24	27.6±2.5	11.87±0.34	10.5±0.5	0.24	26.4±2.8	10.92±0.64	10.4±0.9	0.24	27.0±1.9	11.11±0.62	10.5±1.2	0.24	25.2±1.8	10.87±0.74									

The culture media was CgXII[®] medium with 40 g/L of glucose, fructose, beet molasses or 20 g/L of sucrose as sole carbon source

DCW: Dry cell weight (g/L); μ_{max} : The maximal specific growth rate (h⁻¹); P_{Lys} : The production of L-lysine (g/L); q_s : The substrate consumption rate (g/L/h); mmol C/(g DCW/h)

^a The data was based on the sucrose consumption rate



by strain K-5 was 25.3 ± 2.2 g/L (0.63 g/g glucose), which is 143.3% and 4.1% higher than that of strain K-4 and K-2, respectively. This advantage was also found in the fed-batch fermentation (Fig. 4). In the fed-batch fermentation, the L-lysine production of strain K-5 reached to 209.0 ± 21.6 g/L, which was 11.6% higher than that of strain K-2 (Fig. 4c). Although most of the test by-products in strain K-5 were reduced, the accumulation of acetate and ethanol was significantly increased as compared with strain K-2 (Fig. 4d). In addition, the intracellular NADH and ATP levels were decreased in strain K-5 (Table 3). ScrK and GIK_{Bs} catalyze the phosphorylation of fructose and glucose to fructose-6-phosphate and glucose-6-phosphate using ATP as phosphoryl donor, respectively [39, 42]. Introduction of ScrK and GIK_{Bs} in strain K-5 could increase ATP consumption rate, thus perturbing the intracellular ATP balance. NADH can be oxidized to generate ATP [43], thereby meeting the demand of cell for ATP. It should be noted that the biosynthesis of acetate and ethanol involved in ATP and NADH regeneration (Fig. 3). This might be the reason why acetate and ethanol were significantly increased in strain K-5. Consistent with the previous results [44], the shortage of ATP has significantly impact on cell growth (Table 1 and Fig. 4a). To overcome this defect, the availability of ATP should be increased by reducing the consumption of ATP or/and by increasing ATP regeneration.

Lately, ADP-dependent glucokinase (*i.e.*, ADP-GIK) was discovered in Archaea and Mammalian, which used ADP as phosphoryl donor for the phosphorylation of glucose [45, 46]. In *Methanococcus maripaludis*, a bifunctional enzyme (*i.e.*, ADP-GIK/PFK) with ability

to phosphorylate glucose and fructose-6-phosphate has been reported [47]. In order to reducing the consumption of ATP, we introduced ADP-GIK/PFK from *M. maripaludis* into strain K-5. The resulting strain K-6 showed good properties in glucose consumption rate, cell growth, L-lysine production and by-products accumulation either in shake-flasks or in fed-batch fermentation as compared with strain K-5 (Table 1 and Fig. 4). Moreover, the intracellular NADH and ATP levels in strain K-6 were slightly higher than that of strain K-5 (Table 3), and this may be why strain K-6 showed the better cell growth and the lower accumulation of by-products than that of strain K-5 (Fig. 4a, d). ADP-GIK/PFK catalyzed the phosphorylation of glucose with ADP as phosphoryl donor rather than ATP [47], thus avoiding over-utilizing ATP in carbohydrate uptake. Interestingly, the activity of PYK was increased by 25% as compared with strain K-5 (Table 2). This may be because PYK is activated by AMP [48], while AMP will be synthesized from ADP in the ADP-GIK/PFK-catalyzed reactions (Fig. 3). Compared with strain K-2, however, strain K-6 exhibited the decreased intracellular NADH and ATP levels (Table 3), thereby hampering the cell growth and increasing the accumulation of acetate and ethanol (Fig. 4). The formation of acetate and ethanol involved in NADH and ATP regeneration (Fig. 3), thus making as much ATP for cell as possible.

Overexpression of the NDH-2 benefits the further increase in carbohydrates consumption in PTS^{Glc}- and PTS^{Fru}-deficient strains

Compared with strain K-1, the L-lysine production was drastically increased in fed-batch fermentation (from

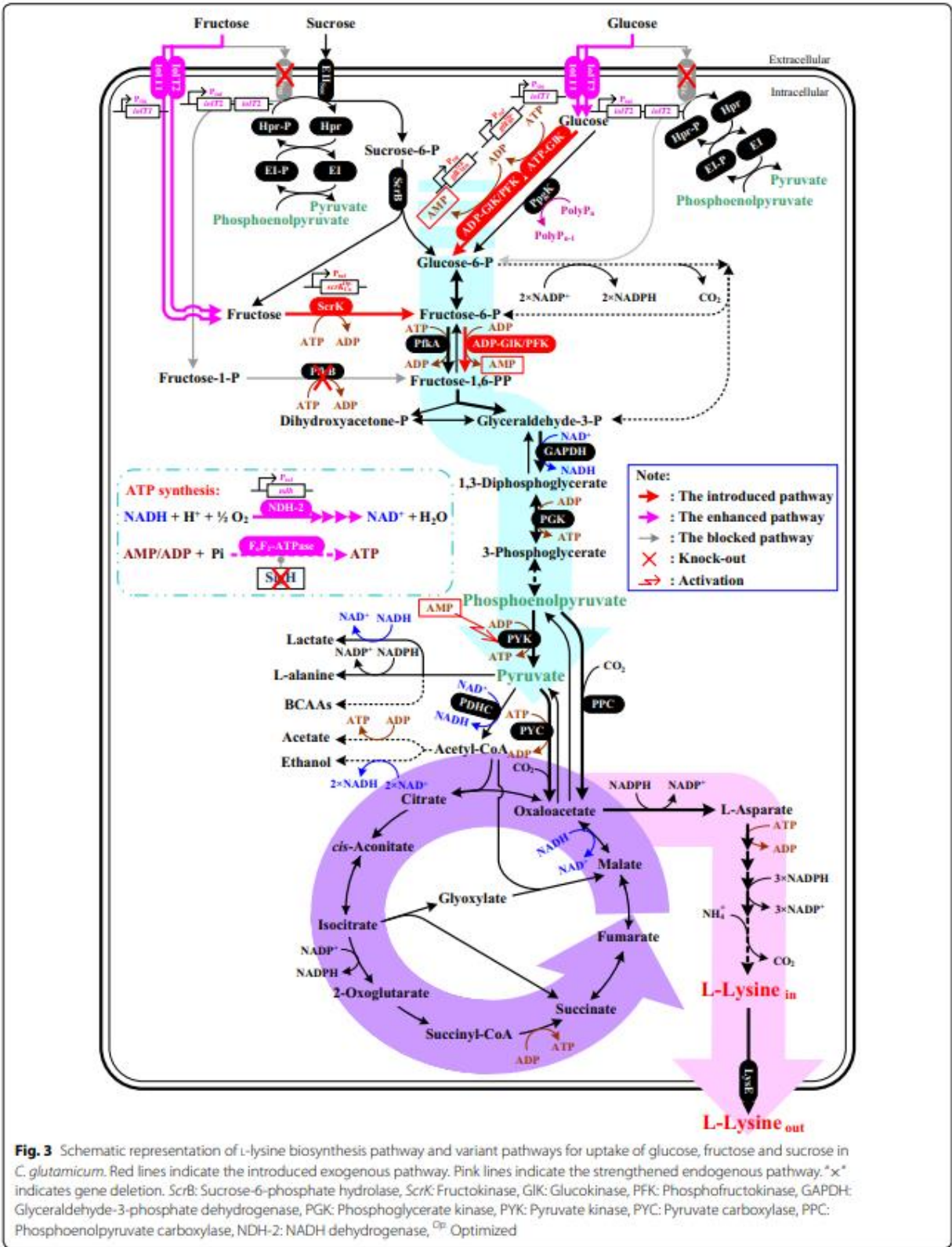


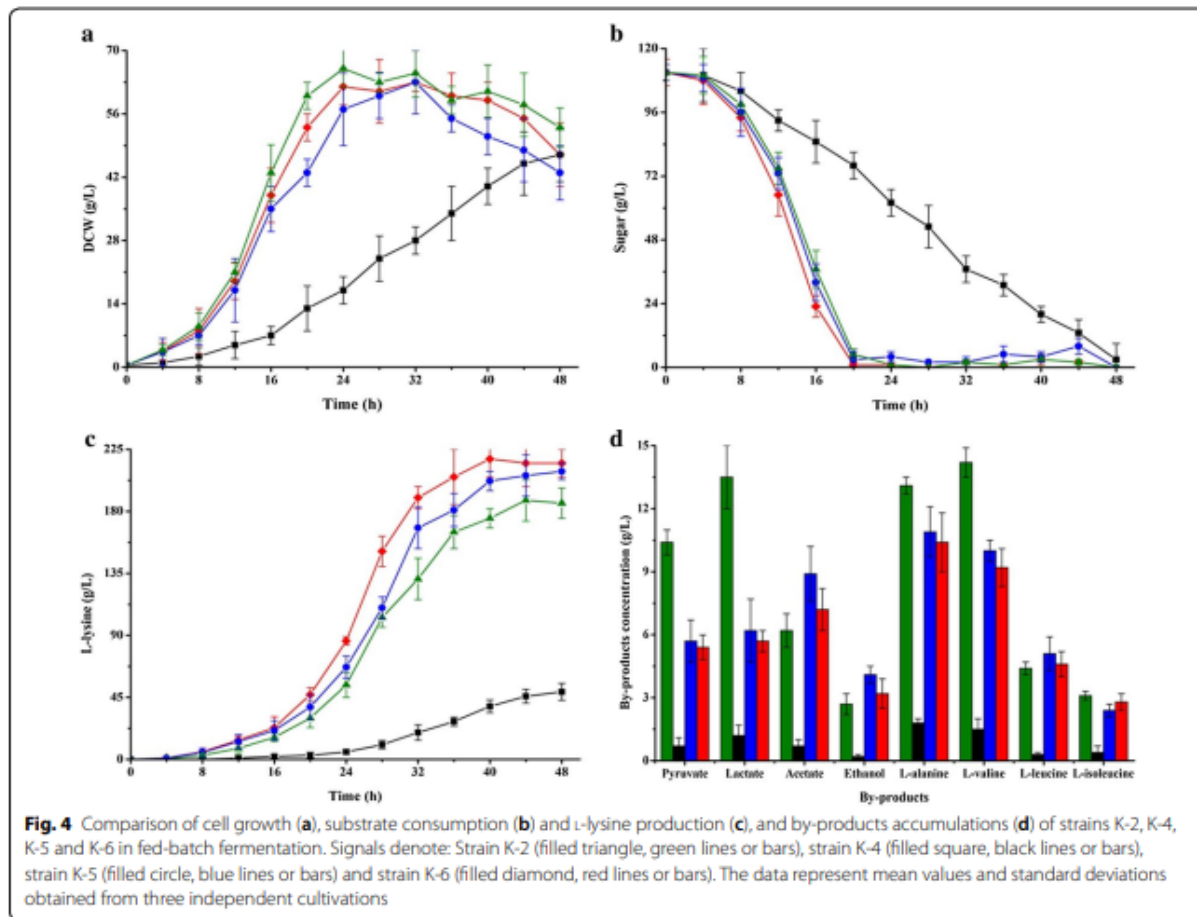
Table 2 In vitro activities of some key enzymes in genetically modified *C. glutamicum* strains and original strain *C. glutamicum* K-1 on CgXII^{IP}-medium with glucose as carbon source

Strains	PTS ^{Glc}	GIK		ScrK	PPC	PYK	NDH-2	F _o F ₁ -ATPase
		ATP	ADP					
K-1	1.73 ± 0.27	0.046 ± 0.004	ND	ND	0.50 ± 0.09	1.47 ± 0.10	7.31 ± 1.52	0.39 ± 0.04
K-2	1.71 ± 0.12	0.045 ± 0.001	-	0.11 ± 0.02	0.51 ± 0.12	1.47 ± 0.18	8.16 ± 2.03	0.44 ± 0.02
K-3	≤ 0.1	0.057 ± 0.003	-	0.03 ± 0.02	0.17 ± 0.05	0.56 ± 0.09	2.35 ± 0.55	0.13 ± 0.02
K-4	-	0.073 ± 0.007	-	0.07 ± 0.05	0.42 ± 0.05	1.14 ± 0.15	7.88 ± 1.64	0.41 ± 0.03
K-5	-	0.312 ± 0.018	-	0.09 ± 0.02	0.95 ± 0.14	2.23 ± 0.21	8.43 ± 1.78	0.52 ± 0.07
K-6	-	0.325 ± 0.021	0.21 ± 0.01	0.11 ± 0.06	0.79 ± 0.07	2.78 ± 0.18	8.45 ± 2.25	0.53 ± 0.01
K-7	-	0.331 ± 0.019	0.21 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.80 ± 0.13	2.74 ± 0.25	26.27 ± 8.76	0.60 ± 0.08
K-8	-	0.354 ± 0.043	0.18 ± 0.04	0.13 ± 0.05	0.87 ± 0.09	2.59 ± 0.16	29.73 ± 5.84	0.91 ± 0.05

The unit of specific enzyme activity is U/(mg protein)

All data are meaning values of three determinations of three independent experiments with ± SD

"-" represents no test, and ND represents no detection



171.8 ± 5.6 g/L to 215.2 ± 10.3 g/L), whereas the cell growth was markedly disturbed in strain K-6 because of the insufficient of ATP (Figs. 2a, 4a, c and Table 3). These results indicated that ATP may be a limiting factor for further increasing the production efficiency of L-lysine in strain K-6. ATP can be synthesized either by substrate level phosphorylation (SLP) or by electron transport phosphorylation (ETP) [44]. ETP, also known as oxidative phosphorylation, involved in the transfer of electrons from NADH to oxygen and the phosphorylation of AMP/ADP to synthesize ATP (Fig. 3) [49]. NADH dehydrogenase from *C. glutamicum* (i.e., NDH-2, encoded by *ndh* gene) is a quinone-dependent dehydrogenase, which links with the inner layer of the cytoplasmic membrane [49]. To enhance ATP synthesis by ETP, the promoter of *ndh* was substitute by the strong *tuf* promoter in this study. Consistent with the previous results [50], NADH/NAD⁺ ratio in the resulting strain *C. glutamicum* K-7 was significantly decreased as compared

with strain K-6 (from 0.20 ± 0.02 to 0.11 ± 0.03; Table 3). As expected, the glucose consumption rate in shake-flasks increased from 8.73 ± 0.48 (mmol C)/(g DCW)/h in strain K-6 to 10.62 ± 0.55 (mmol C)/(g DCW)/h in strain K-7 (Table 1). In addition, the other substrates (i.e., fructose, sucrose and molasses) consumption rate was also increased during overexpression of NDH-2 in strain K-6 (Table 1). The research has shown clearly that high level of NADH/NAD⁺ ratio inhibits the activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and pyruvate dehydrogenase (PDHC), which are the rate-limiting enzymes in glycolysis [51]. Therefore, the effect of overexpression of NDH-2 on increasing substrate consumption rate was likely due to the increased activity of GAPDH and PDHC in *C. glutamicum*. Consistent with the previous results [52], however, the intracellular ATP levels in strain K-7 were slightly higher than that of strain K-6 (Table 3), and the L-lysine production was not obviously increased in strain K-7 (Table 1 and Fig. 5c).

Table 3 Comparison of intracellular nucleotides concentrations in original strain and the genetically defined *C. glutamicum* strains ($\mu\text{mol}/(\text{g DCW})$)

Strains	NADH	NAD ⁺	NADH/NAD ⁺	NADPH	NADP ⁺	NADPH/NADP ⁺	ATP
K-1	1.69 ± 0.22	7.68 ± 0.83	0.22 ± 0.03	1.71 ± 0.12	1.47 ± 0.15	1.16 ± 0.10	4.98 ± 0.42
K-2	1.67 ± 0.23	7.59 ± 0.66	0.22 ± 0.01	1.74 ± 0.21	1.42 ± 0.19	1.23 ± 0.13	4.87 ± 0.53
K-3	0.28 ± 0.02	2.02 ± 0.24	0.14 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.30 ± 0.07	0.82 ± 0.09	0.98 ± 0.13
K-4	1.03 ± 0.15	5.42 ± 0.78	0.19 ± 0.03	0.99 ± 0.17	0.94 ± 0.12	1.05 ± 0.14	2.68 ± 0.19
K-5	1.51 ± 0.18	7.57 ± 0.81	0.20 ± 0.01	1.57 ± 0.11	1.38 ± 0.15	1.14 ± 0.13	2.92 ± 0.35
K-6	1.54 ± 0.22	7.69 ± 0.83	0.20 ± 0.02	1.48 ± 0.18	1.31 ± 0.16	1.13 ± 0.10	3.08 ± 0.32
K-7	0.93 ± 0.23	8.58 ± 0.67	0.11 ± 0.03	1.41 ± 0.12	1.25 ± 0.13	1.13 ± 0.21	3.43 ± 0.45
K-8	0.98 ± 0.22	8.91 ± 0.79	0.11 ± 0.01	1.16 ± 0.14	1.05 ± 0.10	1.10 ± 0.08	4.69 ± 0.47

Exponentially growing cells cultured in CgXII[®] with 40 g/L glucose as sole carbon source in shake flasks were used for analysis

All data are meaning values of three determinations of three independent experiments with \pm SD

In contrast, strain K-7 accumulated a large amount of by-products, especially pyruvate, acetate, L-alanine and L-valine (Fig. 5d). This is presumably due to impairment of the intracellular NADH/NAD⁺ balance for L-lysine production and hence resulting in increasing the by-products biosynthetic pathway to regenerate NADH and ATP. In addition, overflow metabolism could be another reason for by-products accumulation [13]. As can be seen from Table 3, a large amount of pyruvate accumulated in the cell instead of entering into L-lysine biosynthetic pathway.

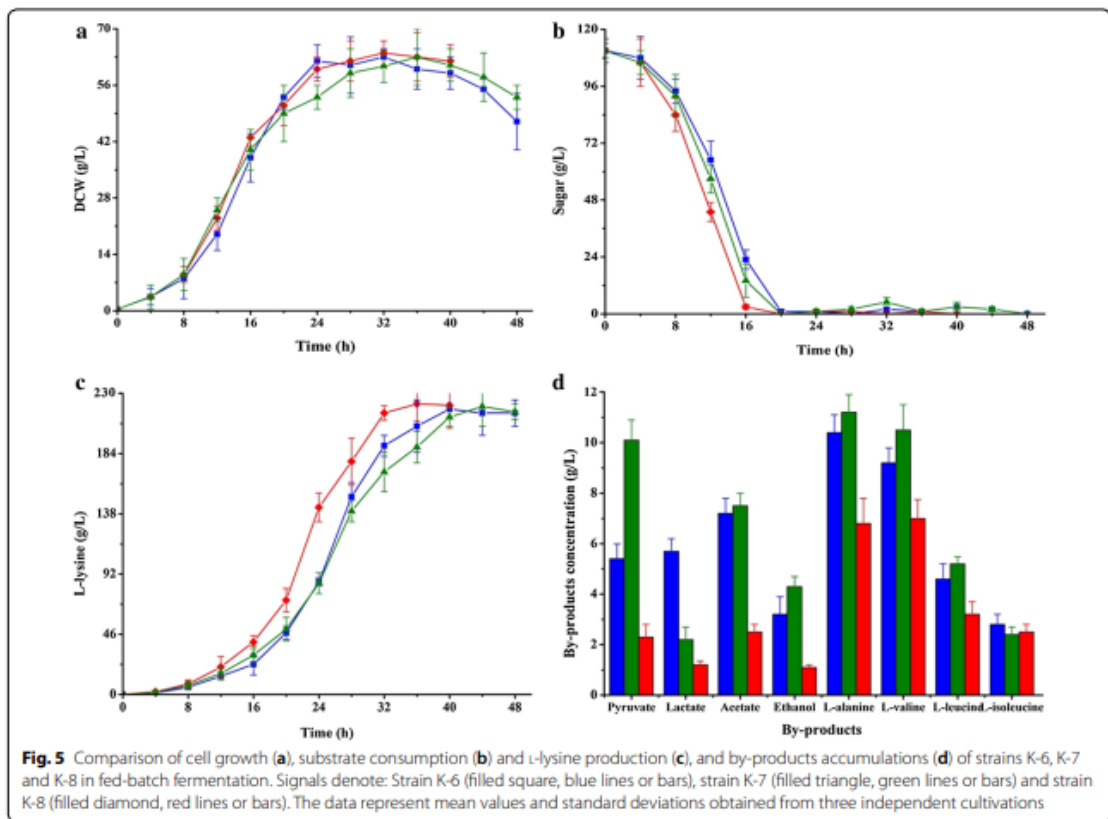
Deletion of the *sigH* gene decreases the accumulation of by-products in *C. glutamicum* strain

Base on the chemiosmotic theory of energy coupling, the synthesis of ATP from ETP involved in energy release by transfer of electrons from NADH to oxygen and energy transfer by phosphorylation of AMP/ADP [53]. F₀F₁-ATPase catalyzed the formation of ATP (i.e., the phosphorylation of AMP/ADP) by proton motive force (pmf) [44]. Although F₀F₁-ATPase was not essential for growth of *C. glutamicum* on glucose, inactivation of F₀F₁-ATPase decreased the specific glucose uptake rate and mRNA levels of genes involved in amino acid biosynthesis [44]. Therefore, it is a useful strategy for increasing L-lysine production by genetically modifying F₀F₁-ATPase. We tried to increase the expression level of F₀F₁-ATPase by overexpression of F₀F₁-ATPase-coding gene, but it was not successful as there were eight subunits of F₀F₁-ATPase (encoded by *atpBEFHAGDC*) [44] (data not shown). As described by Barriuso-Iglesias et al. [54], F₀F₁-ATPase-coding gene was expressed at pH 9.0 because it is regulated by SigmaH factor (i.e., SigH). However, the optical pH of *C. glutamicum* in L-lysine fermentation process is neutral pH (i.e., pH ≈ 7.0). In order to increase the expression level of F₀F₁-ATPase-coding gene at neutral pH, we deleted SigH-coding gene *sigH*

to construct a SigH-deficient strain *C. glutamicum* K-8. Consistent with previous results [54], the expression level of *atpB* was increased (increased by about 4.3 times), whereas the expression level of *sigH* was disappeared in strain K-8 as compared with strain K-7 at pH=7 (Additional file 1: Fig. S2). Conversely, the expression level of *atpB* in strain K-8 was lower than that of strain K-7 at pH=9 (Additional file 1: Fig. S2). These results showed that deletion of SigH increased the activity of F₀F₁-ATPase at neutral pH (Table 2). We also observed that the increased L-lysine production rate was induced by elevating ATP supply from ETP (Table 1 and Table 3). In other words, the more ATP is available in the cytosol, the more carbon flux will be entered into L-lysine biosynthetic pathway (Fig. 5). Previous researches have pointed out that interdiction of ATP regeneration from ETP decreased the specific glucose uptake rate in *C. glutamicum* [44, 55]. Our study again confirmed these viewpoints that strain K-8 showed the best substrate consumption rate among the test strains (Table 1). The titer of L-lysine reached 221.3 ± 17.6 g/L at a productivity of 5.53 g/L/h and a carbon yield of 0.71 g/g glucose at 40 h (Fig. 5c). Those are the highest value for L-lysine production in fed-batch fermentation (Table 4), demonstrating that this engineered *C. glutamicum* strain is a competitive platform strain for L-lysine production.

Conclusions

For the first time, metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems was identified as a critical factor for efficiently producing L-lysine from mixed sugar in *C. glutamicum*. The carbohydrate uptake system of strain was reconstructed and the intracellular ATP was complemented by enhancing ETP. We showed that hetero-expression of ScrK and introduction of optimized non-PTS were effective for increasing substrate consumption rate and L-lysine production from mixed



sugar. Furthermore, substitution of the promoter of *ndh* by strong *tuf* promoter and deletion of the transcriptional regulator SigH further increased the L-lysine production and the highest substrate consumption rate, and these provided an efficient strategy for improving the efficiency of L-lysine production. The target strain K-8 produced 221.3 ± 17.6 g/L at a productivity of 5.53 g/L/h and a carbon yield of 0.71 g/g glucose in fed-batch fermentation. To the best of our knowledge, those are the highest value for L-lysine production by fed-batch fermentation in the references.

However, this yield of L-lysine in strain K-8 is still lower than the theoretical level (i.e., 0.81 g/g glucose). Thus, there is still plenty of room to enhance the yield of L-lysine. The most important by-product of strain K8 was pyruvate-family amino acids. Although adequate ATP could be used for pyruvic carboxylase (PYC) as cofactor, the activity of PYC was inhibited by L-aspartate [56]. Further improvement may be achieved by increasing the activity of PYC, for example, by overexpression of PYC-coding gene *pyc* or by site-specific mutagenesis of *pyc* to

relieve feedback inhibition. Another potential strategy is to reduce the flux into biosynthetic pathway of pyruvate-family amino acids. In addition, intracellular NADPH plays an important role in L-lysine production [1]. Therefore, how to effectively improve availability of intracellular NADPH is an important problem to be solved in further improving L-lysine production strains.

Methods

Strains, growth medium and culture conditions

Strains used in this study are listed in Table 5. Luria-Bertani (LB) broth and LBG broth (LB supplemented with 5 g/L glucose) were used for *Escherichia coli* and *C. glutamicum*, respectively [57]. Epo medium, used for preparing electroporation-competent *C. glutamicum* cells, and LBHIS (LB, Brain Heart Infusion, and sorbitol) medium, used for obtaining recombinant strains, were prepared according to the description reported by van der Rest et al. [58]. *C. glutamicum* and *E. coli* were grown at 30 °C and 37 °C, respectively. Appropriately, strains were incubated with 50 µg/mL of kanamycin (Km), and

Штами, використані в даному дослідженні, наведені в таблиці 5. Бульйон Лурія – Бертані (LB) та бульйон LBG (LB з додаванням 5 г/л глюкози) використовувалися для *Escherichia coli* та *C. glutamicum* відповідно [57]. Середовище ЕРО, яке використовувалося для приготування клітин *C. glutamicum*, компетентних в електропорації, і середовище LBHIS (LB, Brain Heart Infusion, and sorbitol), використовуване для отримання рекомбінантних штамів, були приготовлені відповідно до опису, наданого van der Rest et al. [58]. *C. glutamicum* та *E. coli* вирощували при 30 °C та 37 °C відповідно. Відповідно, штами інкубували з 50 мкг/мл канаміцину (Км), і

Table 4 Overview on the production of L-lysine by metabolic engineered *C. glutamicum*

Strains	Culturing methods	Final titers (g/L)	Productivity (g/L/h)	Yield (g/g glucose)	References
K-8	Batch	27.6	0.58	0.69	This work
	Fed-batch	221.3	5.53	0.71	This work
AM03	Batch	27.7	0.46	0.35	[60]
ZL-92	Fed-batch	201.6	5.04	0.65	[61]
JL-69P _{lac-M} <i>gdh</i>	Fed-batch	181.5	3.78	0.65	[3]
JOV2-C7 ^a	Batch	13.2	0.33	0.31	[62]
LYS-12	Fed-batch	120	4.0	0.55	[10]
MH20-22BΔ _{leuA} ^{a,b}	Batch	21.6	0.3	0.22	[63]

^a Achieved in shake-flask fermentation

^b Estimated from reference

25 μg/mL of Km was used to obtain recombinant strains of *C. glutamicum*.

Batch cultivation in shake flasks was carried out as described previously by Xu et al. [57]. The improved CgXII-medium (CgXII medium supplied with 0.25 g/L L-methionine and 0.6 mg/L biotin; CgXII^{IP}) without carbon source was used as minimal medium for L-lysine production. The main culture was performed in triplicate using 500-mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of CgXII^{IP}-medium containing 40 g/L of glucose or 40 g/L of beet molasses, which were designed as CgXII^{IP}G-medium or CgXII^{IP}M-medium, respectively.

The fed-batch fermentations were carried out in a 1-L jar fermenter (BLBIO-1GC-4, Bailun Bi-Technology Co. Ltd., Shanghai, China) containing 0.25 L of medium with an inoculum size of 10% (v/v). Inoculum was obtained from a seed culture at ΔOD₅₆₂ = 0.45 – 0.50 (at a dilution of 25-fold). The seed medium was prepared according to the description reported by Xu et al. [3]. The fermentation medium contained (per liter): 80 g glucose, 40 g beet molasses, 30 g corn steep liquor, 50 g (NH₄)₂SO₄, 1.5 g KH₂SO₄, 1.0 g MgSO₄·7H₂O, 0.02 g FeSO₄, 0.02 g MnSO₄, 0.5 g L-methionine, 0.05 g glycine betaine, 2.4 mg biotin (add in 4 portions), 400 μg thiamine-HCl and 2 mL antifoam. The aeration rate, pH, dissolved oxygen levels, and temperature were set as described by Becker et al. [10]. Feed solution contained (per liter) 400 g glucose, 100 g beet molasses, 40 g (NH₄)₂SO₄, which prepared according to the description reported by Becker et al. [10] and was used to maintain glucose concentration at 5~10 g/L by adjusting the feeding rate according to the glucose concentration observed every 4 h. Both these media were adjusted to pH 7.0 with ammonium hydroxide.

25 мкг/мл Км було використано для отримання рекомбінантних штамів *C. glutamicum*. Пакетне культивування в колбах для струшування проводилося, як описано раніше Xu et al. [57]. Покращене середовище CgXII (середовище CgXII містить 0,25 г/л л метіоніну та 0,6 мг/л біотину; CgXII^{IP}) без джерела вуглецю використовувався як мінімальне середовище для виробництва L-лізину. Основну культуру проводили в трьох примірниках з використанням колб Ерленмейєра об'ємом 500 мл з 50 мл CgXII^{IP}-середовища, що містило 40 г/л глюкози, або 40 г/л бурякової меляси, які були розроблені як CgXII^{IP}G-medium або CgXII^{IP}M-medium відповідно.

Construction of *C. glutamicum* recombinant strains

The plasmids and oligonucleotides used in this study are listed in Table 5 and Additional file 1: Table S1, respectively. The gene deletions and gene replacements were executed in *C. glutamicum* chromosome according to the published method [57]. The cassettes of ATP-GIK (from *B. subtilis*), ADP-GIK (from *M. maripaludis*) and fructokinase (ScrK; from *C. acetobutylicum*) with *P*_{trf} promoter, *rrnBT1T2* terminator and *EcoRI* endonuclease was optimized for expression in *C. glutamicum* and then synthesized by GENEWIZ (Suzhou), Inc. (Suzhou, China). The plasmid construction and transformation were performed according to the previous descriptions [57]. The recombinant plasmids were transferred into *C. glutamicum* competent cell by electroporation, and the recombinant strains were screened on according to the published method [58]. The DNA manipulations and build process of the recombinant strain are stated in Additional file 1.

Quantification of intracellular NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH and ATP

The *C. glutamicum* strains were cultivated in CgXII^{IP}-medium containing 40 g/L of glucose, and the logarithmic growth phase cells were used for analysis. The intracellular concentration of NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH and ATP were measured using NAD⁺/NADH Quantification Colorimetric Kit, NADP⁺/NADPH Quantification Colorimetric Kit and ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision, Inc., Milpitas, CA) according to the manufacturer's instructions, respectively.

Analytical methods

A sample was taken from shake flasks or fermenter every 2 or 4 h. A half of sample was used to measure biomass using a spectrophotometer at 600 nm after an appropriate dilution. According to the previous description [57],

Порційне бродіння з підживленням проводили в 1-л баночному ферментері (BLBIO-1GC-4, Bailun Bi Technology Co. Ltd., Шанхай, Китай), що містив 0,25 л середовища з розміром інокулята 10% (об./об.). Інокулят отримували з посівної культури при ΔOD₅₆₂ = 0,45 – 0,50 (у 25-кратному розведенні). Посівне середовище готували згідно з описом, представленим Xu et al. [3]. Середовище бродіння містило (на літр): 80 г глюкози, 40 г бурякової патоки, 30 г кукурудзяного розчину, 50 г (NH₄)₂SO₄, 1,5 г KH₂SO₄, 1,0 г MgSO₄·7H₂O, 0,02 г FeSO₄, 0,02 г MnSO₄, 0,5 г L-метіонін, 0,05 г гліцинбетаїну, 2,4 мг біотину (дати в 4 порції), 400 мкг тіаміну-HCl і 2 мл піногасника. Швидкість аерації, pH, рівні розчиненого кисню та температуру встановлювали, як описано Becker et al. [10]. Кормовий розчин містив (на літр) 400 г глюкози, 100 г бурякової меляси, 40 г (NH₄)₂SO₄, який був приготовлений згідно з описом, наданим Becker et al. [10] і використовувався для підтримки концентрації глюкози на рівні 5~10 г/л шляхом регулювання швидкості годування відповідно до концентрації глюкози, що спостерігалася кожні 4 години. Обидва ці середовища доводять до pH 7,0 за допомогою гідроксиду амонію

Побудова рекомбінантних штамів *C. glutamicum* Плазмиди та олігонуклеотиди, використані в цьому дослідженні, наведені в таблиці 5 та додатковому файлі 1: Таблиця S1 відповідно. Делеції та заміни генів проводили в хромосомі *C. glutamicum* за опублікованою методикою [57]. Касети ATP-GIK (від *B. subtilis*), ADP-GIK (від *M. maripaludis*) та фруктокінази (ScrK; від *C. acetobutylicum*) з промотором P_{tuf}, термінатором rrrBT1T2 та ендонуклеазою EcoRI були оптимізовані для експресії на *C. glutamicum*, а потім синтезовані компанією GENEWIZ (Сучжоу), Inc. (Сучжоу, Китай). Побудову та перетворення плазмиди виконували згідно з попередніми описами [57]. Рекомбінантні плазмиди переносилися в компетентну клітину *C. glutamicum* за допомогою електропорації, а рекомбінантні штами проводили скринінг відповідно до опублікованого методу [58]. Маніпуляції з ДНК та процес побудови рекомбінантного штаму вказані у Додатковому файлі 1.

Аналітичні методи: Пробу відбирали з коктейлів або ферментера кожні 2 або 4 год. Половина зразка була використана для вимірювання біомаси за допомогою спектрофотометра на 600 нм після відповідного розведення. За попереднім описом

Table 5 Strains used in this study

Contents	Relevant characteristic(s)	References
<i>C. glutamicum</i> strains		
K-1	<i>C. glutamicum</i> JL-6 $\Delta pck:ppc \Delta odc:pyc \Delta P1 gltA/P_{tac-M} gdh$, L-lysine-producing strain derived from strain <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	[3]
K-2	Derivative of strain K-1 with hetero-expression of <i>scrK</i> from <i>C. acetobutylicum</i>	This work
K-3	Derivative of strain K-2 with deletion of <i>ptsG</i> and <i>ptsF</i>	This work
K-4	Derivative of strain K-3 with two point mutations in the promoter of <i>iolT1</i> , relative to the start codon at position-113 (A → G) and -112 (C → G) respectively, and with replacement of natural promoter of gene <i>iolT2</i> by <i>tuf</i> promoter as well as two copies of <i>iolT2</i> gene	This work
K-5	Derivative of strain K-4 with replacement of natural gene <i>glk_{CG}</i> by the optimized gene <i>glk_{BS}</i> from <i>B. subtilis</i>	This work
K-6	Derivative of strain K-5 with introduction of the optimized gene <i>glk_{Mm}</i> from <i>M. maripaludis</i>	This work
K-7	Derivative of strain K-6 with replacement of natural promoter of gene <i>ndh</i> by <i>tuf</i> promoter	This work
K-8	Derivative of strain K-7 with deletion of the gene <i>sigH</i>	This work
Plasmids		
pK18mobsacB	Integration vector	[59]
pK18mobsacB/ $\Delta pfkB::scrK_{CG}^{OP}$	Integration vector for introduction of the cassette of <i>scrK</i> gene at <i>pfkB</i> gene loci	This work
pK18mobsacB/ $\Delta ptsG$	Integration vector for deletion of <i>ptsG</i> gene	This work
pK18mobsacB/ $\Delta ptsF$	Integration vector for deletion of <i>ptsF</i> gene	This work
pK18mobsacB/ $\Delta ptsF::glk_{Mm}^{OP}$	Integration vector for introduction of the cassette of <i>glk_{Mm}</i> gene at <i>ptsF</i> gene loci	This work
pK18mobsacB/ $\Delta glk_{CG}::glk_{BS}^{OP}$	Integration vector for replacement of the native <i>glk_{CG}</i> gene by the cassette of <i>glk_{BS}</i> gene	This work
pK18mobsacB/P _{CG} <i>iolT1</i>	Integration vector for introducing two point mutations in the promoter region of <i>iolT1</i> , relative to the start codon at position-113 (A → G) and -112 (C → G), respectively	This work
pK18mobsacB-P _{tuf} <i>iolT2</i>	Integration vector for replacement of the nature promoter of <i>iolT2</i> gene by the <i>tuf</i> promoter	This work
pK18mobsacB-2 × <i>iolT2</i>	Integration vector for introducing a second copy of the <i>iolT2</i> gene with <i>tuf</i> promoter	This work
pK18mobsacB-P _{tuf} <i>ndh</i>	Integration vector for replacement of the nature promoter of <i>ndh</i> gene by the <i>tuf</i> promoter	This work
pK18mobsacB/ $\Delta sigH$	Integration vector for deletion of <i>sigH</i> gene	This work

the correlation factor between dry cell weight (DCW) and OD_{600} was determined as 0.318 ($1 OD_{600} = 0.318$ g DCW). The other half of sample was diluted 100-fold, and then used to determine glucose and L-lysine concentration using an SBA-40E immobilized enzyme biosensor (Shandong, China). L-lysine concentration was determined as lysine-HCl in duplicates. In addition, the samples were also used to determine the concentration of sucrose, fructose and by-products (including amino acids and organic acids) by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the description of Xu et al. [57]. The enzyme activity assay is stated in Additional file 1.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1294-7>.

коефіцієнт кореляції між масою сухих клітин (DCW) та OD_{600} був визначений як 0,318 ($1 OD_{600} = 0,318$ г DCW). Іншу половину зразка розводили в 100 разів, а потім використовували для визначення концентрації глюкози та L-лізину за допомогою іммобілізованого ферментного біосенсора SBA-40E (Шаньдун, Китай). Концентрацію L-лізину визначали як лізин·HCl у двох примірниках. Крім того, зразки також були використані для визначення концентрації сахарози, фруктози та побічних продуктів (включаючи амінокислоти та органічні кислоти) методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) відповідно до опису Xu et al. [57]. Аналіз активності ферментів зазначений у додатковій статті 1.

Additional file 1. Oligonucleotides used in this study, mutation information of the genes *ptsG*, *ptsI* and *ptsH* and strategy used for construction of recombinant plasmids.

Abbreviations

IGS: The coupling system of myo-inositol permeases and glucokinases; CgXII^P-medium: The improved CgXII-medium; CgXII^PM-medium: CgXII^P-medium with 40 g/L of beet molasses.

Acknowledgements

We thank Dr. XL Chen from State Key Laboratory of Food Science and Technology at Jiangnan University for assistance in data analysis.

Authors' contributions

JX, LL and WZ conceived and designed the experiments, HR and HY performed the experiments, LL and WZ analyzed the data, JX and HR wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Number 31601459); the China Postdoctoral Science Foundation (Grant Number 2016M590410); and the Top-Notch Academic Programs Project

Determination of glucose, fructose, sucrose, and trehalose concentration

Samples of 200 μ l were taken from Erlenmeyer flasks every 4 h. Then, 100 μ l of those samples was used to determine the glucose, fructose, sucrose, and trehalose concentration, and the other for measuring the cell growth and L-lysine production. The determinations of glucose, fructose, and trehalose in 1:10-diluted cultivation supernatant were carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a Sugar-Pak 1 6.5 \times 300-mm column at 70 °C using isocratic elution with ultrapure H₂O at a flow rate of 0.6 ml/min, and subsequent detection via determination of refraction indexes. The determination of sucrose was carried out by HPLC as described previously [4].

Substrate and product analysis.

Quantification of glucose, fructose, and organic acids in 1:10-diluted cultivation supernatant was carried out by high-pressure liquid chromatography (Kontron Instruments, Neufahrn, Germany) involving separation on an Aminex HPX-87H column (300 by 7.8; Bio-Rad, Hercules, Calif.) at 55°C, with 7 mM H₂SO₄ as the mobile phase and a flow rate of 1 ml min⁻¹, and subsequent detection via determination of refraction indexes (sugars) or UV absorption at 210 nm (organic acids). For quantification of sucrose, the column temperature was reduced to 15°C and the eluent concentration was increased to 10 mM H₂SO₄. Glycerol and dihydroxyacetone were quantified enzymatically (Boehringer-Mannheim, Darmstadt, Germany). Quantification of amino acids followed the method of Krömer et al. (12). Cell concentration was determined by a photometer at 660 nm or by gravimetric analysis as described previously (11).

KEGG Glycolysis / Gluconeogenesis - *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Kyowa Hakko)

[Pathway menu | Organism group | Pathway entry | Show description | Download | Help]

Change pathway type

Option

Scale: 56%

Search

ID search

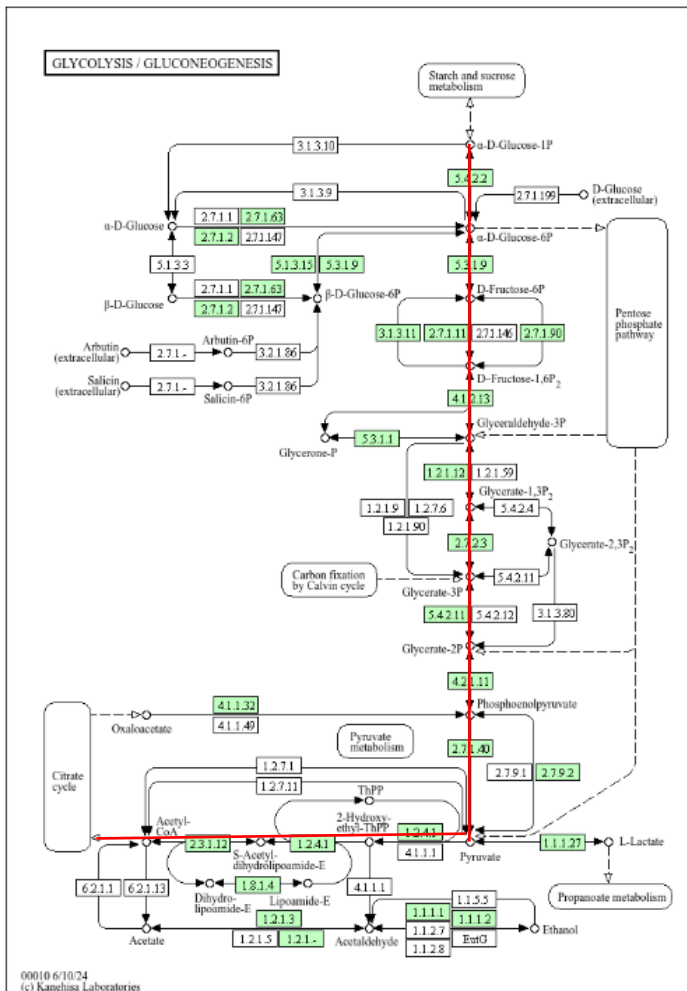
Color

Module

Complete only

Pathway modules

- Carbohydrate metabolism
- Central carbohydrate metab
- M00001 Glycolysis (Emb
- M00002 Glycolysis, core n
- M00003 Gluconeogenesis
- M00307 Pyruvate oxidatio



KEGG Citrate cycle (TCA cycle) - *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Kyowa Hakko)

[Pathway menu | Organism group | Pathway entry | Show description | Download | Help]

Change pathway type

▼ Option
Scale: 95%

▼ Search
Go

▼ ID search
Go

▼ Color
+

▼ Module
Complete only

Pathway modules

Carbohydrate metabolism

Central carbohydrate metab

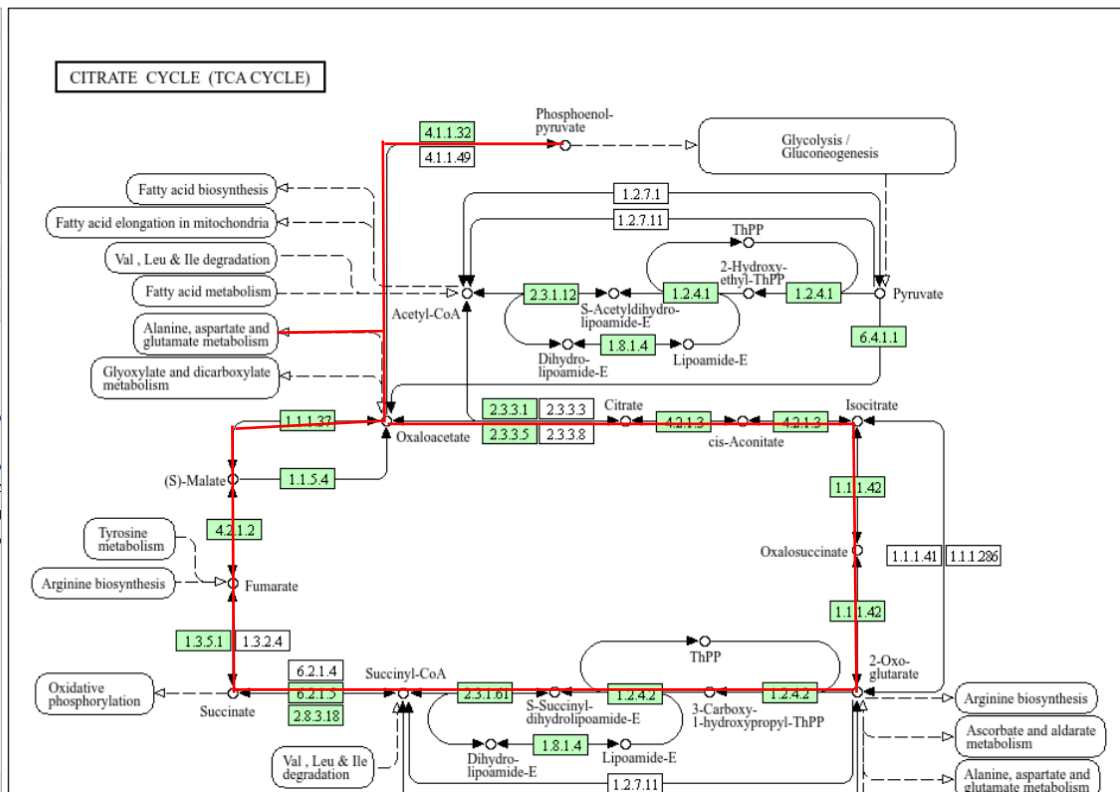
M00003 Gluconeogenesis

M00307 Pyruvate oxidatio

M00009 Citrate cycle (TCA

M00010 Citrate cycle, first

M00011 Citrate cycle, sec



KEGG Alanine, aspartate and glutamate metabolism - *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Kyowa Hakko)

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

Change pathway type

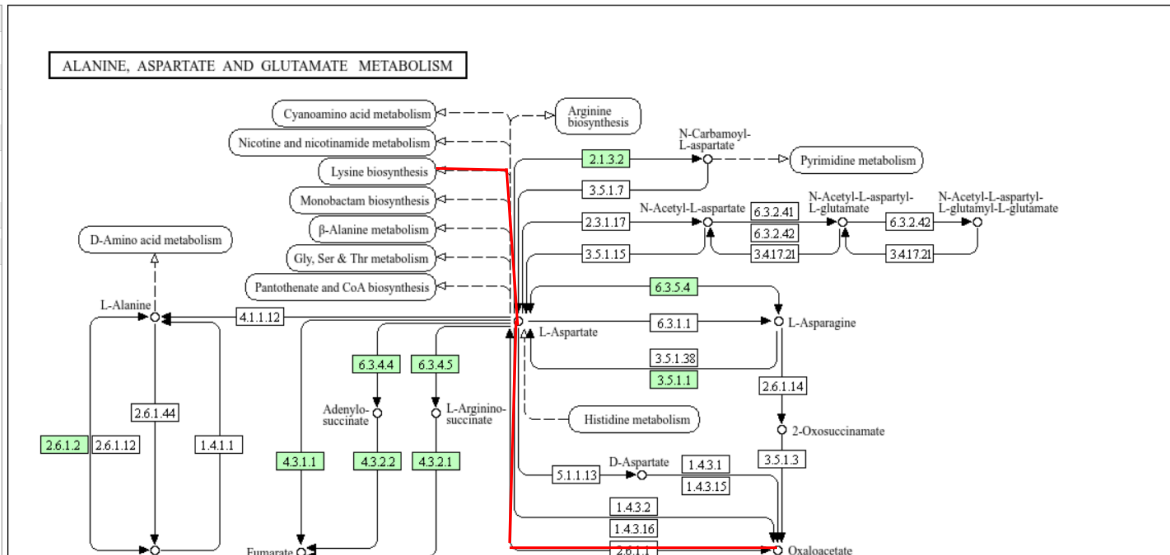
▼ Option
Scale: 100%

▼ Search
Go

▼ ID search
Go

▼ Color
+

▼ Module
Complete only



Change pathway type

Option

Scale: 100%

Search

ID search

Color

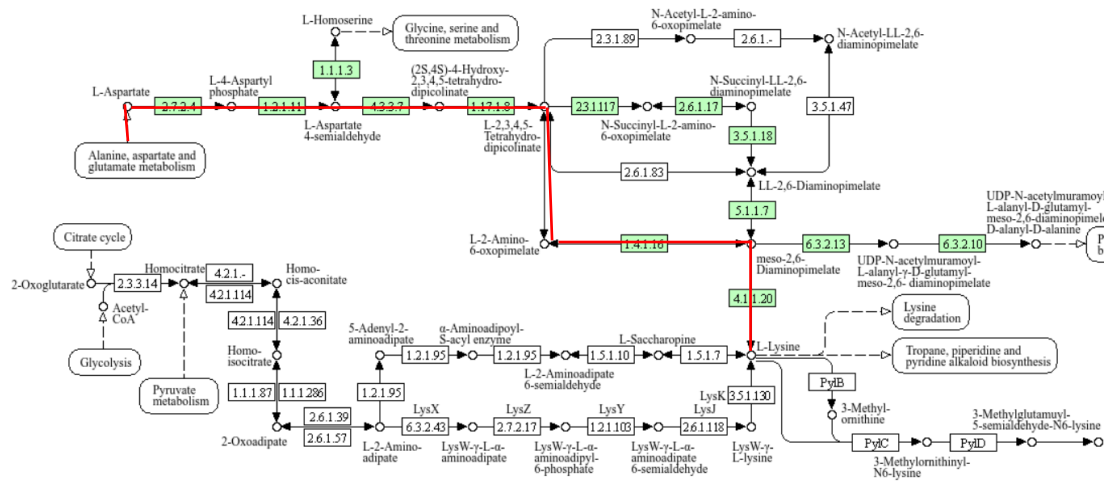
Module

Complete only

Pathway modules

- Amino acid metabolism
- Lysine metabolism
- M00016 Lysine biosynthes
- M00526 Lysine biosynthes

LYSINE BIOSYNTHESIS



KEGG Pyruvate metabolism - *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Kyowa Hakko)

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

Change pathway type

▼ Option

Scale: 95%

▼ Search

▼ ID search

▼ Color

▼ Module

Complete only ▼

Pathway modules

- Carbohydrate metabolism
- Central carbohydrate metab
- M00307 Pyruvate oxidatio
- Energy metabolism
- Carbon fixation
- M00168 CAM (Crassulaceae)
- M00579 Phosphate acetyl

