

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 «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Шовкань Дарини Олегівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання глутатіону культивуванням *Saccharomyces cerevisiae*

керівник роботи Стабніков Віктор Петрович, д.т.н., професор,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-к

2. Строк подання здобувачем роботи 04.06.2021

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Saccharomyces cerevisiae*, цільовий продукт: глутатіон

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва. РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 2 аркуші формату А1. Апаратурна схема виробництва – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки сушіння – 1 аркуш формату А3

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5. Автоматизація	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>01.04.21-04.04.21</i>	
2	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>05.04.21-15.04.21</i>	
3	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>10.04.21-18.04.21</i>	
4	<i>Біосинтез цільового продукту</i>	<i>15.04.21-18.04.21</i>	
5	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>19.04.21-30.04.21</i>	
6	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>26.04.21-02.05.21</i>	
7	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>30.04.21-09.05.21</i>	
8	<i>Контроль виробництва</i>	<i>10.05.21-16.05.21</i>	
9	<i>Автоматизація ділянки виробництва</i>	<i>10.05.21-16.05.21</i>	
10	<i>Охорона довкілля</i>	<i>17.05.21-20.05.21</i>	
11	<i>Оформлення пояснювальної записки</i>	<i>21.05.21-28.05.21</i>	
12	<i>Виконання графічної частини роботи</i>	<i>30.04.21-28.05.21</i>	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Шовкань Д.О.
(прізвище та ініціали)

Стабніков В.П.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

В даній роботі представлений проект виробництва субстанції глутатіону у вигляді сухого порошку культивуванням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy, що на середовищі з глюкозою і попередниками синтезу глутатіону – цистеїном та гліцином синтезує 3,2 г/л цільового продукту. Розрахована потужність його виробництва становить 346 90 л культуральної рідини або 111 кг препарату в рік.

Глутатіон – трипептид, якому притаманні сильні антиоксидантні властивості. Ця речовина присутня у всіх аеробів, оскільки захищає їх від окисного стресу і за рахунок своїх властивостей широко використовується в медицині, в тому числі у якості дієтичної добавки, для виробництва косметичних засобів, а також у промисловості як харчова добавка.

Технологія виробництва субстанції складається з допоміжних робіт (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація титрувальних агентів: приготування розчинів хлоридної кислоти, натрій гідроксиду, сульфатної кислоти та розчину етанолу, а також приготування та стерилізація поживних середовищ) та основних процесів (підготовка посівного матеріалу, виробничий біосинтез, дезінтеграція клітин, видалення уламків клітин, концентрування шляхом зворотнього осмосу, іонообмінне виділення глутатіону, концентрування, доочищення, концентрування, осадження глутатіону, відділення його центрифугуванням, промивання осаду, отримання сухого глутатіону з подальшим його подрібненням), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Реферат				Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Шовкань Д.О.									
Перевір.		Стабніков В.П.								2	98
Консультант									Кафедра БТМ		
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

Дипломний проект складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (72 найменувань) та графічної частини (4 креслення формату А1, 1 креслення формату А3). Загальний обсяг роботи – 98 сторінок, 5 рисунків, 15 таблиць, 3 додатків.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, глутатіон, антиоксидант, біосинтез, ферментер, руйнування дріжджових клітин, дезінтеграт, сепарування, зворотній осмос, Amberlite IR120 Н, пориста смола SP207, центрифугування, вакуум-сушіння.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ЗМІСТ	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	19
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	21
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	23
3.1. Потреба у цільовому продукті	23
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	24
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	25
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	26
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	29
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	29
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	31
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	33
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	33
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	33

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Зміст		
Розроб.		Шовкань Д.О.					
Перевір.		Стабніков В.П.					
Консультан							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ		
					Літ.	Арк.	Аркушів
						4	0

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	36
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	37
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	41
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	44
5.3.Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення ...	50
цільового продукту	50
5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях	50
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	57
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	62
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	74
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів	74
8.2. Мікробіологічний контроль	77
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	78
8.3.1. Концентрація біомаси.....	78
8.3.2. Концентрація цільового продукту	79
8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	79
8.4. Показники якості готового продукту	81
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	83
РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	88
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	88
10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	90
10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	90
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	90
10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів	91
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	91
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	93

ВСТУП

Біотехнологія є одним з ключових напрямків якісного технологічного розвитку ряду екномічно важливих галузей. У широкому сенсі біотехнологія являє собою граничну між біологією й технікою наукову дисципліну й сферу практики, що вивчає шляхи й методи зміни навколишнього середовища відповідно до потреб людини. У вузькому значенні біотехнологія – це сукупність методів і прийомів одержання корисних для людини продуктів і явищ за допомогою біологічних агентів [1].

Біотехнологія отримання глутатіону має важливе значення у сучасному світі. Глутатіон є основним компонентом загальної стресової відповіді майже у всіх живих організмів, зокрема і людини. На практиці глутатіон широко застосовується у медичній та косметичній промисловості, а також у харчовій промисловості. Також застосування глутатіону у складі різноманітних косметичних засобів упродовж останнього десятиліття стрімко набирає популярності [2].

На сьогоднішній день попит на продукцію глутатіону в промислових масштабах зростає. Світове виробництво кристалічного глутатіону та дріжджового екстракту, збагаченого глутатіоном (до 15 %), перевищує 500 і 2500 тонн в рік, проте в Україні його не виробляють.

Метою даної роботи є проектування ділянки виробництва (апаратурна та технологічна схема) глутатіону дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy у вигляді сухого порошку для подальшої його реалізації.

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Шовкань Д.О.							
Перевір.		Стабніков В.П.					6	98	
Консультан						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

Актуальність теми. Популярність глутатіону завдяки концепції «здорового способу життя» з кожним днем зростає. Глутатіон вживають до раціону харчування у якості дієтичної добавки, через його фундаментальне значення для численних біохімічних і метаболічних процесів, при зниженні функціональної активності антиоксидантної системи внаслідок старіння, при підвищених фізичних навантаженнях, у зимово-весняний період при збідненні раціону харчування антиоксидантами, для профілактики порушень функцій печінки.

Новизна. Використання високопродуктивного штаму хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy, який за відносно низької вартості поживного середовища утворює 3,2 г/л глутатіону, що є високим показником серед представників роду *Saccharomyces*.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Глутатіон – трипептид, γ -L-глутаміл-L-цистеїнілгліцин, який присутній у всіх тканинах ссавців у концентраціях 1-10 mM, проте найбільша його кількість у печінці. Це найпоширеніший небілковий тіол, який бере участь у захисті клітин від окиснення. Глутатіон також є ключовим фактором у окислювально-відновній сигналізації, життєво важливим для детоксикації ксенобіотиків та модуляції і проліферації, апоптозі, імунній функції та фіброгенезі клітин [3].

У твердому вигляді глутатіон являє собою безбарвні кристали з температурою плавлення 190 °С. Речовина розчинна у воді, проте нерозчинна в етанолі та ефірі. За кип'ятіння у воді утворює піролідонкарбонову кислоту і цистеїнілгліцин.

За взаємодії глутатіону з нітропрусидом натрію в лужному середовищі утворює червоне забарвлення. В результаті дії неагресивних окисників (наприклад, йоду) легко окиснюється в дисульфід, що і використовують для кількісного визначення глутатіону (окисно-відновний потенціал пари глутатіон/дисульфід – 0,24 В при pH 7,0).

Молярна маса глутатіону становить 307 г/моль [4]. Структурна формула його представлена на рис. 1.1.

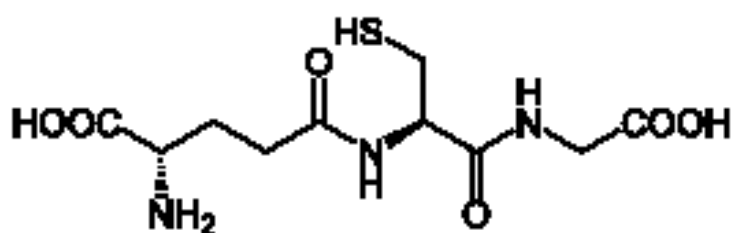


Рис. 1.1. Структурна формула глутатіону

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 1. Характеристика цільового продукту		
Розроб.		Шовкань Д.О.					
Перевір.		Стабніков В.П.					
Консультан							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ		
					Літ.	Арк.	Аркушів
						8	98

Глутатіон існує у двох формах: відновленому до тіолу та окисленому до дисульфіді. Глутатіон відновлений є переважаючою формою і становить > 98% від загального вмісту. Еукаріотичні клітини мають три основні резервуари глутатіону: цитозоль (80-85%), мітохондрії (10-15%) та невеликий відсоток знаходиться в ендоплазматичному ретикулумі [3].

Структура глутатіону унікальна тим, що пептидний зв'язок, який поєднує в ньому глутамат та цистеїн здійснюється через γ -карбоксильну групу глутамату, а не через звичайну α -карбоксильну групу. Єдиним ферментом, який може гідролізувати цей незвичний зв'язок, є γ -глутамілтранспептидаза, яка присутня лише на поверхні певних типів клітин.

Саме тому глутатіон стійкий до внутрішньоклітинної деградації і метаболізується лише позаклітинно клітинами, які синтезують γ -глутамілтранспептидазу [3].

Біологічні функції глутатіону полягають в наступному: захист -SH груп ферментів та інших білків від окиснення; відновлення H_2O_2 та інших пероксидів; зв'язує вільні радикали; бере участь в тіол-сульфідному обміні і в знешкодженні багатьох інших чужорідних для організму сполук; відновлює рибонуклеотиди в дезоксирибонуклеотиди; переносить амінокислоти через мембрану клітин; є кофактором цілого ряду ферментів (гліоксалази та формальдегіддегідрогенази) [3].

Найширшого свого застосування ця речовина знайшла в медицині та фармацевтиці.

Відновлений глутатіон вже більше 30-ти років застосовується в медичній практиці і включений в європейську, японську та американську фармакопеї. Китай та Японія стали одними з перших країн, які почали впроваджувати глутатіон в протоколи лікування захворювань печінки. На сьогоднішній день в Китаї глутатіон вважається лікарською речовиною, яка найчастіше приписується як гепатопротектор [5].

З 2009 р. глутатіон увійшов в список реімбурсації Національної програми базового медичного страхування в Китаї як препарат ад'ювантної терапії захворювань печінки, в тому числі і вірусних гепатитів [5].

Також варто зазначити, що на сьогоднішній день концепція «здорового способу життя» сприяла виведенню глутатіону на ринок як дієтичної добавки добавки, яка здійснює сильний антиоксидантний ефект на організм людини.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Трипептид глутатіон є найпоширенішим небілковим тіолом, який захищає клітини від метаболічних та окислювальних стресів і широко використовується в медицині, в харчовій промисловості як харчові добавки та в косметичній промисловості [6].

Незважаючи на постійно зростаючий попит на глутатіон його застосування обмежено високими витратами на виробництво. Відновлені та окислені до дисульфідіду форми глутатіону можуть бути синтезовані ферментативним шляхом (дороговартісним та збитковими), а також бродінням з використанням природних або генетично модифікованих мікроорганізмів [6].

Глутатіон зазвичай відсутній у анаеробних мікроорганізмів (прокаріотів і деяких еукаріот), але є майже у всіх аеробів, що підтверджує гіпотезу, що даний трипептид виник у еукаріотів в зв'язку з виникненням аеробного метаболізму та мітохондрій. Оскільки глутатіон захищає клітини від активних форм кисню, які утворюються в результаті аеробного типу життєдіяльності [7].

Серед мікроорганізмів, які здатні до синтезу глутатіону зустрічаються дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* та *Candida utilis*, бактерії *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* [6].

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Шовкань Д.О.						
Перевір.		Стабніков В.П.					11	98
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Для порівняння здатності мікроорганізмів до утворення внутрішньоклітинного глутатіону було обрано *Pichia pastoris* D18 [8] штами *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy [9], *S. cerevisiae* 26-2 [10] та *S. cerevisiae* ATCC7754 [11].

Узагальнююча характеристика технологічних особливостей отримання цільового продукту з використанням різних продуцентів наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Особливості глибинного культивування *Pichia pastoris* D18, *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy, *S. cerevisiae* 26-2 та *S. cerevisiae* ATCC7754 з метою одержання глутатіону

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація глутатіону, мг/л	Тривалість, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>Pichia pastoris</i> D18	Глюкоза – 129; Дріжджовий екстракт – 5; (NH ₄)SO ₄ – 11; K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O – 7; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 5; CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,5; KCl – 0,5;	4260	50	Культивування здійснювали при 30°C, pH 5,0 Перемішування 220 об/хв Початкова концентрація глюкози 50 г/л, після 16 год культивування додавали підживлюючий 80%-й розчин глюкози зі швидкістю подачі 2,9 мл/1 л середовища за год. На 44 год додають амінокислоти (20 ммоль/л) як попередники: глутамінова кислота, цистеїн, гліцин	<i>Fei L., Wang Y., Chen S.</i> Improved glutathione production by gene expression in <i>Pichia pastoris</i> // Bioprocess. Biosyst. Eng. – 2009; - V. 32, N6. – P. 729-735. doi:10.1007/s00449-009-0297-x
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GB Italy	Глюкоза – 80; Цитрат натрію – 10; Цистеїн – 4; Гліцин – 4; (NH ₄)SO ₄ – 7; KH ₂ PO ₄ – 3,5; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5;	3200	48	Культивування здійснювали при 28°C, pH 5,3 Перемішування 400 об/хв	<i>Rollini M., Musatti A., Manzoni M.</i> Production of glutathione in extracellular form by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> // Process Biochem. – 2010. – V. 45. – P. 441-445.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 26-2	Глюкоза – 50 г/л; Дріжджовий екстракт – 15; Сухий солодовий екстракт – 10; Кукурудзяний сироп – 10; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 5; KH ₂ PO ₄ – 1; ZnSO ₄ – 0,00001; FeSO ₄ – 0,000012; CuSO ₄ – 0,000012; MnSO ₄ – 0,00001;	2256	35	Культивування здійснювали при 30°C, pH 5,5 Перемішування 600 об/хв, подача повітря 10 л/год Попередники синтезу (глутамат, гліцин, цистеїн) 6 ммоль/л на 28 год культивування	Wang M., Sun J., Xue F., Shang F., Wang Z., Tan T. The effect of intracellular amino acids on GSH production by high-cell-density cultivation of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2012; - V. 168, N 1. – P. 198-205. doi:10.1007/s12010-011-9435-4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC7754	Глюкоза – 54; Пептон – 50; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 12;	340	72	Культивування здійснювали при 20°C, pH 5,0 Перемішування 200 об/хв Амінокислоти додавали у два етапи: після 6 год культивування – 2 mM цистеїну, після 28 год – 3,35 mM цистеїну, 10 mM глутамату, 18 mM гліцину Індукція магнітним полем 25 mT	Santos L.O., Alegre R.M., Garcia-Diego C., Cuellar J. Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> // Process Biochem. – 2010. – V. 45, N 8. – P. 1362-1367. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.008

Найвищі концентрації глутатіону було отримано за культивування *P. pastoris* D18 (4260 мг/л), дещо нижчими були значення глутатіону у *S. cerevisiae* GB Italy (3200 мг/л) і *S. cerevisiae* 26-2 (2256 мг/л). Найменша кількість (340 мг/л) трипептиду було одержано за умов вирощування штаму *S. cerevisiae* ATCC7754 на середовищі з глюкозою та пептоном за індукцією синтезу магнітним полем, тож його не використовуємо для порівняння.

Отримані результати засвідчують, що перші три штами є перспективними продуцентами глутатіону для промислових масштабів, тому саме ці мікроорганізми будуть надалі порівнюватися за такими критеріями як вартість поживного середовища та умовна вартість 1 г цільового продукту, оскільки порівняння самого технологічного процесу є недостатнім.

Порівняльна характеристика ціни складу поживних середовищ та 1 г глутатіону представлена в табл. 2.2 і 2.3.

Таблиця 2.2

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
продуцентів глутатіону**

Біологічний агент	Концентрація кожного компонента середовища, г/л	Ціна компонента поживного середовища, грн/кг	Вартість компонента (грн) для приготування 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Pichia pastoris</i> D18	Глюкоза – 129;	19,50	2,52	[1]
	Дріжджовий екстракт – 5;	936,0	4,68	[1]
	(NH ₄)SO ₄ – 11;	50,00	0,55	[1]
	K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O – 7;	150,00	1,05	[6]
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 5;	50,00	0,25	[3]
	CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,5;	45,00	0,02	[1]
	KCl – 0,5;	46,08	0,02	[5]
	Глутамат – 2,94;	250,00	0,74	[4]
	Цистеїн – 2,42;	1400,00	3,39	[4]
	Гліцин – 1,5;	310,00	0,47	[7]
Вартість 1 л середовища – 13,69 грн				

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GB Italy	Глюкоза – 80;	19,50	1,56	[1]
	Цитрат натрію – 10;	31,40	0,31	[5]
	Цистеїн – 4;	1400,00	5,6	[4]
	Гліцин – 4;	310,00	1,24	[7]
	(NH ₄)SO ₄ – 7;	50,00	0,35	[1]
	KH ₂ PO ₄ – 3,5;	55,00	0,19	[2]
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5;	50,00	0,03	[3]
Вартість 1 л середовища – 9,28 грн				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 26-2	Глюкоза – 50;	19,50	0,98	[1]
	Дріжджовий екстракт – 15;	936,00	14,04	[1]
	Сухий солодовий екстракт – 10;	160,00	1,6	[8]
	Кукурудзяний сироп – 10;	80,00	0,8	[1]
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 5;	50,00	0,25	[3]
	KH ₂ PO ₄ – 1;	55,00	0,06	[2]
	ZnSO ₄ – 0,00001;	40,00	0,01	[4]
	FeSO ₄ – 0,000012;	3,50	0,01	[1]
	CuSO ₄ – 0,000012;	125,00	0,01	[2]
	MnSO ₄ – 0,00001;	25,60	0,01	[5]
	Глутамат – 0,88;	250,00	0,22	[4]
	Цистеїн – 0,73;	1400,00	1,02	[4]
	Гліцин – 0,45;	310,00	0,14	[7]
	Вартість 1 л середовища – 19,15 грн			

Примітка. 1 - <https://prom.ua> ; 2- <https://him-component.com.ua> ; 3 - <https://ecovod.biz> ; 4 - <https://prostorhim.com.ua> ; 5 - <https://himfarminvest.com.ua> ; 6 - <https://runainter.com> ; 7 - <https://profiprot.com.ua> ; 8 - <https://my-beer.com.ua> ;

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г глутатіону при культивуванні *Pichia pastoris* D18,

Saccharomyces cerevisiae GB Italy та *S. cerevisiae* 26-2

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація глутатіону, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного глутатіону за 1 год, г/год
<i>Pichia pastoris</i> D18	13,69	4,260	3,22	50	0,085

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GB Italy	9,28	3,20	2,90	48	0,058
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 26-2	19,15	2,256	8,49	35	0,06

Узагальнюючи дані, наведені в табл. 2.2 і 2.3, зазначимо, що найнижча вартість 1 г цільового продукту була 3,22 і 2,90 грн за культивування *P. pastoris* D18 та *S. cerevisiae* GB Italy відповідно. Зазначимо, що і вартість, і технологічна організація культивування *S. cerevisiae* GB Italy у порівнянні з *P. pastoris* D18 є значно простішою, оскільки амінокислоти і весь субстрат вносяться на початку культивування, що значно знижує ризики контамінації.

Тому, з огляду як на технологічні, так і на економічні критерії у порівнянні синтезувальної здатності глутатіону в еукаріот, кращим біологічним агентом було обрано штам *S. cerevisiae* GB Italy.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування – 48 год, концентрація глутатіону 3200 мг/л (3,2 г/л), концентрація біомаси 14 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу глутатіону. Як джерело вуглецевого живлення для біосинтезу глутатіону використовується глюкоза

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 3,2 г глутатіону. Молекулярна маса глутатіону $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ становить 307,32 г/моль. Отже, у 307 г глутатіону міститься 120 г Карбону, а в 3,2 г глутатіону $(3,2 \times 120) / 307 = 1,25$ г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах вуглеводів міститься 1,25 г Карбону. Молекулярна маса глюкози становить 180 г/моль. Отже, у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 1,25 г Карбону міститься у $(180 \times 1,25) / 72 = 3,1$ г глюкози. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на таких вуглеводах як глюкозі близько 40 % субстрату окиснюється до CO_2 , то для одержання енергії,

необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме $(3,1 \times 0,4) + 3,1 = 4,34$ г/л.

Потреба для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 14 г біомаси становить $14 \times 0,5 = 7,0$ г. Знаючи, що молекулярна маса глюкози становить 180 г/моль. То у 180 г глюкози міститься 72 г Карбону, а 7,0 г Карбону міститься у $(180 \times 7,0) / 72 = 17,5$ г глюкози.

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 14 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(17,5 \times 0,4) + 17,5 = 24,5$ г глюкози.

Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (14 г/л) та глутатіону (3,2 г/л), становить $4,34 + 24,5 = 28,84$ г.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Як джерело азотного живлення для біосинтезу глутатіону використовується амоній сульфат.

Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 14 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 1,4 г.

Розрахуємо кількість сульфату амонію, необхідну для одержання 14 г/л біомаси. Молекулярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ становить 132. Отже, у 132 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 1,4 г Нітрогену буде міститись у $(132 \times 1,4) / 28 = 6,6$ г солі.

Для одержання 14 г/л біомаси вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у середовищі культивування повинен становити 6,6 г/л.

Потреби для синтезу глутатіону. Нітроген входить до складу не тільки біомаси, а ще і глутатіону ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$). Тому нам треба розрахувати кількість солі, необхідної для синтезу 3,2 г глутатіону.

Молекулярна маса глутатіону становить 307,32 г/моль. У 307 г глутатіону міститься 42 г Нітрогену (N), тоді у 3,2 г глутатіону вміст Нітрогену становить $(3,2 \times 42) / 307 = 0,4$ г. Далі розрахуємо, в якій кількості $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ міститься необхідна кількість Нітрогену. У 132 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 0,4 г Нітрогену буде міститись у $(132 \times 0,4) / 28 = 1,9$ г солі.

Для одержання 3,2 г/л глутатіону вміст сульфату амонію в середовищі повинен становити 1,9 г/л.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі культивування

У біомасі міститься приблизно 3% фосфору (за елементом Р). Отже для синтезу 14 г біомаси вміст Фосфору в середовищі повинен бути $14 \times 0,03 = 0,42$ г.

Джерелом Фосфору для біосинтезу глутатіону є калій дигідрогенфосфат (K_2HPO_4). Молекулярна маса K_2HPO_4 складає 136 г. Тобто у 136 г K_2HPO_4 міститься 31 г Фосфору, тоді 0,42 г Фосфору міститься у $(136 \times 0,42) / 31 = 1,8$ г солі.

Отже, середовище для культивування продуцента глутатіону містить 1,8 г/л K_2HPO_4 .

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

Морфолого-культуральні ознаки. Вегетативні клітини округлої форми. Величина клітин в 2-добовій культурі 6-9.5 x 6,5-10 мкм. Культури на суслоагарі світло-кремового кольору, в процесі старіння можуть змінювати колір до темно-бежевого, колонії мають округлу форму у вигляді квітки. Поверхня колоній, вирощених на сусло агарі, була матовою, плоскою, структура – м'якої консистенції, пастоподібна, легко відділяється від агару [12].

Фізіолого-біохімічні ознаки. Є факультативним анаеробом, що володіє і дихальним і бродильним типами метаболізму. Температурний діапазон зростання складає близько 30 °С. Оптимальне значення рН – 5,0. Зброжує і засвоює глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, рафінозу. Не засвоює лактозу, розчинний крохмаль. Зі спиртів не засвоює інозит. З органічних кислот засвоює молочну кислоту. З азотистих речовин засвоює пептони, сірчаноокислий амоній і аспарагін, не засвоює нітрат калію і етіламінгідрохлорід. Арбутин не розщеплює. Желатин не розріджує [13].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Saccharomyces cerevisiae* наведена згідно on-line бази даних MycoBank [14].

Царство – *Fungi*

Підцарство – *Dikarya*
Відділ – *Ascomycota*
Підвідділ – *Saccharomycotina*
Клас – *Saccharomycetes*
Підклас – *Saccharomycetidae*
Порядок – *Saccharomycetales*
Родина – *Saccharomycetaceae*
Рід – *Saccharomyces*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Біотехнологія отримання глутатіону має важливе значення у сучасному світі. На практиці глутатіон широко застосовується у медичній та косметичній промисловості, а також у харчовій промисловості як харчова добавка.

Широке поширення глутатіону у медицині та харчовій промисловості пов'язане з широким спектром біологічних функцій і має фундаментальне значення для численних біохімічних і метаболічних процесів.

Глутатіон за рекомендацією лікаря вживають до раціону харчування як дієтичну добавку для профілактики порушень функцій печінки, зниженні функціональної активності антиоксидантної системи внаслідок старіння організму, при надмірному вживанні жирів і вуглеводів з одночасним зменшенням їх витрати, при дерматологічних захворюваннях та імунодефіцитних станах а також при підвищених фізичних навантаженнях, у зимово-весняний період при збідненні раціону харчування антиоксидантами (токоферолами, біофлаваноїдами, убіхіноном). При цих показаннях з ціллю профілактики радять вживати по 1 капсулі в день незалежно від прийому їжі, а тривалість прийому зазвичай становить до 30 днів.

Як лікарський засіб глутатіон призначають при проявах токсичної дії і неконтрольованого застосування лікарських засобів, онкологічних захворюваннях, туберкульозі, хронічних обструктивних захворюваннях легень. Досить важливим є таке показання для застосування глутатіону як профілактика нейропатії, індукованої хіміотерапією цисплатином або іншими подібними речовинами.

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Шовкань Д.О.							
Перевір.		Стабніков В.П.					21	98	
Консультан						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

Тож, використовуючи статистичні дані за 2016 рік [15] розрахуємо приблизну річну потребу у глутатіоні для українців.

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в глутатіоні

Захворювання (профілактика) [16, 17]	Доза препарату на добу, мг [16, 17]	Тривалість прийому, днів [16, 17]	Кількість хворих в Україні на 2016 рік [15]	Загальна кількість препарату
Профілактика порушень функцій печінки	500 (1 капсула)	30 днів, за необхідності продовжити	393935	5 909 кг
При зниженні функціональної активності антиоксидантної системи внаслідок старіння організму	500 (1 капсула)	30 днів, за необхідності продовжити	20740	311,1 кг
При підвищених фізичних навантаженнях	500 (1 капсула)	30 днів, за необхідності продовжити	292774*	4391,6 кг
При дерматологічних захворюваннях	500 (1 капсула)	30 днів, за необхідності продовжити	32640	489,1 кг
Всього:				11100,8 кг

* - розраховано згідно даних Державної служби статистики, станом на 2016 рік 10 % від міського населення Дніпропетровської області

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Для визначення необхідної кількості препарату будемо використовувати дані наведені в таблиці 3.1. Сумарний об'єм глутатіону в препаратах 11 100,8 кг. Для подальших розрахунків доцільним буде обрати 1 % від загальної кількості необхідного препарату 111,008 кг.

Таким чином ми зможемо забезпечити деякий відсоток ринку профілактики порушень функцій печінки. Так, цільовими споживачами будуть люди, що споживають алкоголь, живуть у великих містах з високою забрудненістю повітря, адже постійне токсичне навантаження на печінку веде до зниження кліренсу ксенобіотиків, неповного знешкодження ендогенних продуктів метаболізму і накопичення в тканинах і органах сполук, що

викликають вторинні ушкодження токсичної і алергічної природи з наступним виснаженням системи антиоксидантного захисту. Глутатіон ефективно усуває наслідки оксидативного стресу, перешкоджаючи пошкодженню клітин і прогресуванню захворювань печінки.

Задану кількість глутатіону можна отримати при культивуванні *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy, який продукує 3,2 г/л цієї речовини за 48 годин [9]. Тому для отримання 111 008 г глутатіону необхідна наступна кількість культуральної рідини:

$$A = \frac{111\,008}{3.2} = 346\,90 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (40%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$B = \frac{346\,90}{1-(0,3+0,1)} = 57\,816,6 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Розрахуємо кількість культуральної рідини яку необхідно отримати за цикл ферментації, для подальшого розрахунку кількості стадії приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) = 330, тоді кількість продукту на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = \frac{C}{T_{рд}} = \frac{57\,816,6}{330} = 192,72$$

Кількість продукту за цикл ($V_{пц}$) буде становити:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1.2 * 192,72 * 55}{24} = 529,98 \text{ л/цикл}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (7 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,2$. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

529,98 л культуральної рідини ($V_{\text{цк}}$) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{\Gamma} = \frac{V_{\text{цк}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{529,98}{0,6} = 883,3 \text{ л}$$

$K_{\text{зап}} = 0,6$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\Gamma} = 1 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{цк}}}{V_{\Gamma}} = \frac{529,98}{1000} = 0,52$, не перевищує задане значення, отже дане значення залишаємо незмінним.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримуємо $V_{\text{цк}} = 529,98$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини враховуємо її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{Φ}), які становлять 10%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{цк}}}{1 - E_{\Phi}} = \frac{529,98}{1 - 0,1} = 588,86 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{Φ}), що становить:

$$V_{\Phi} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{588,86}{0,6} = 981,4 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\Phi} = 1 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\Phi}} = \frac{588,86}{1000} = 0,58$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\Phi 1}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + E_{\Phi 1}} = \frac{588,86}{1 + 0,1} = 535,32 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 588,86 - 535,32 = 53,54 \text{ л}$$

Для одержання 53,54 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплинності через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 2}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{53,54}{1 - 0,1} = 59,48 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить:

$$V_{\phi 1} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{59,48}{0,6} = 99,13 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\phi 1} = 0,1 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\phi 1}} = \frac{59,48}{100} = 0,59$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi 2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + E_{\phi 2}} = \frac{59,48}{1 + 0,1} = 54,07 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 59,48 - 54,07 = 5,41 \text{ л}$$

Для одержання 5,41 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплинності через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 3}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{5,41}{1 - 0,1} = 6 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить:

$$V_{\phi 2} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{6}{0,6} = 10 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ф2} = 0,01 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = \frac{V_{роб.3}}{V_{ф2}} = \frac{6}{10} = 0,6$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{ф3}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.3}}{1+E_{ф3}} = \frac{6}{1+0,1} = 5,45 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 6,01 - 5,45 = 0,55 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм3} = 0,55 \text{ л}$ можна одержати культивуванням *S. cerevisiae* GB Italy у колбах на качалці. Для цього використовуємо качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становить:

$$N = \frac{V_{пм3}}{V_{колб} * K_{зк}} = \frac{550}{750 * 0,2} = 3,66$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Тоді, стадії культивування:

I стадія – вирощування продуцента в колбах на качалці об'ємом 750мл;

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

III стадія – вирощування в ферментері об'ємом 100 л;

IV стадія – вирощування в ферментрі об'ємом 1000 л або 1 м³;

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу глутатіону у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи, де четвертий етап – етап виробничого біосинтезу.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

При вирощуванні штаму дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy основним джерелом вуглецю та енергії є глюкоза. Частково до шляху катаболізму може залучатися і цистеїн з гліцином, а також цитрат натрію, однак тільки після вичерпання основного, легкодоступного джерела – глюкози. Тому для побудови схеми біосинтезу як джерело вуглецю та енергії ми розглядаємо саме глюкозу [9].

У Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату саме у заданого штаму – *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy, тому для побудови шляху метаболізму глюкози обираємо *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast) [18].

Використовуючи як основу для створення катаболічного шляху глюкози катаболізм цукрів – гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes для заданого мікроорганізму, можемо навести схему перетворення глюкози (рис. 4.1).

α -D-Глюкоза за участю ферменту гексокінази (КФ.2.7.1.1) перетворюється на α -D-глюкозу-6-фосфат. Далі за дії глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9) перетворюється на β -D-фруктозу-6-фосфат. Після цього фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення попередньої сполуки у β -D-фруктозу-1,6-фосфат. Фруктозодифосфатальдолоза (КФ.4.1.2.13) діє на β -D-фруктозу-1,6-фосфат з подальшим утворенням гліцеральдегід-3-фосфату та діоксіацетонфосфату, який під дією тріозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. Гліцеральдегід-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12) в свою чергу зумовлює перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на 1,3-дифосфогліцерат. Той

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Шовкань Д.О.							
Перевір.		Стабніков В.П.					27	98	
Консультант						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

під дією фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. В подальшому під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

Таким чином, схему катаболізму глюкози у заданого мікроорганізму *Saccharomyces cerevisiae* шляхом гліколізу наведено на рис. 4.1.

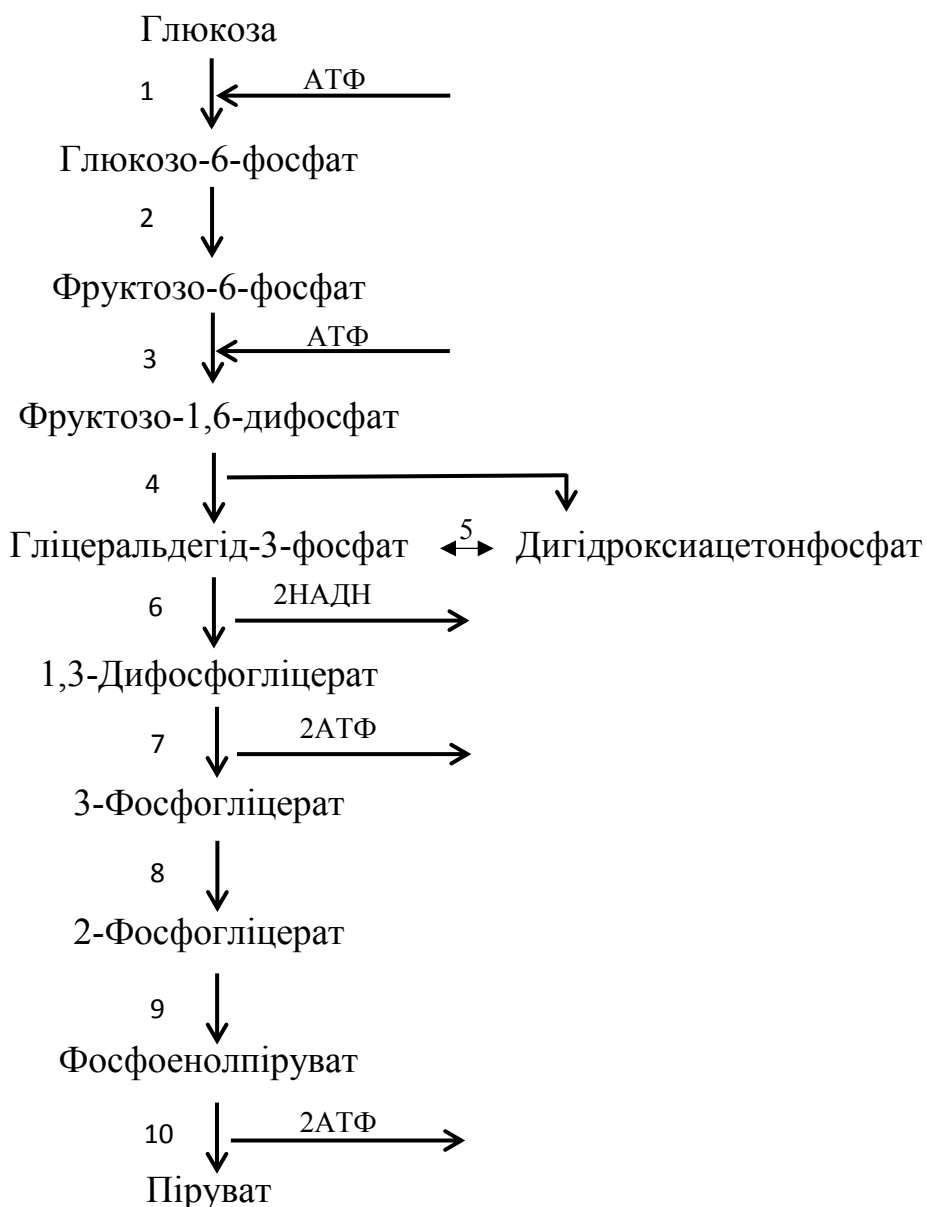


Рис. 4.1. Катаболізму глюкози у *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast). Шлях Ембдена-Меейргофа-Парнаса

Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ.2.7.1.1); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – фосфоглюкокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 8 – фосфогліцератфосфомутаза (КФ.5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

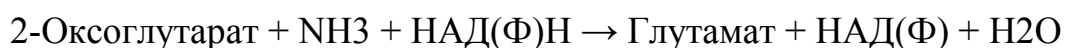
Під час росту *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy з використанням глюкози як джерела вуглецю утворюється піруват, що далі залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Усі необхідні для синтезу білків 20 амінокислот утворюються з певних метаболічних попередників, а саме: глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники ароматичних амінокислот – фосфорибозилпірофосфат (попередник гістидину) і еритрозо-4-фосфат. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники фенілаланіну, тирозину і триптофану. З 3-фосфогліцерату, в свою чергу утворюються серин, гліцин та цистеїн.

Аланін, валін та лейцин утворюються з пірувату. З оксалоацетату, що є інтермедіатом ЦТК, утворюються аспартат, аспарагін, метіонін, лізин, треонін та ізолейцин. З 2-оксоглутарату, що теж є інтермедіатом ЦТК, утворюються амінокислоти глутаматної родини (глутамат, глутамін, аргінін та пролін).

Цільовий продукт – глутатіон – є первинним метаболітом, його попередниками є цистеїн, глутамат та гліцин. Тож, розглянемо ближче шляхи їх біосинтезу.

Синтез глутамінової кислоти відбувається в результаті ферментативного відновлювального амінування 2-оксоглутарату за рахунок НАД⁺- (КФ.1.4.1.2) або НАДФ⁺ (КФ.1.4.1.4) -залежної глутаматдегідрогенази:



Попередником цистеїну та гліцину є серин. Він синтезується з 3-фосфогліцерату – проміжного продукту гліколізу. Спочатку відбувається

окиснення 3-фосфогліцерату до 3-фосфогідропірувату за допомогою фосфогліцератдегідрогенази (КФ.1.1.1.95), після чого трансамінування до фосфосерину під дією фосфосеринамінотрансферази (КФ.2.6.1.52) з наступним дефосфорилуванням до серину, що індукує фермент фосфосерин фосфатаза (КФ.3.1.3.3).

Гліцингідроксиметилтрансфераза (КФ.2.1.2.1) індукує синтез гліцину з серину.

Цистеїн в свою чергу синтезується з серину та гомоцистеїну, що виступає донором сульфогрупи. Реакції протікають у дві стадії під дією ферментів цистатіонін бета-синтази (КФ.4.2.1.22) та цистатіонін гамма-ліази (КФ.4.4.1.1).

Подальше утворення глутатіону відбувається так: цистеїн взаємодіє з глутаматом під дією глутамат-цистеїнліази (КФ.6.3.2.2) з утворенням L-γ-глутамілцистеїну, що в свою чергу взаємодіє з гліцином під дією глутатіонсинтази (КФ.6.3.2.3).

Схема біосинтезу глутатіону, що представлена в KEGG, а також схему біотрансформації ростового субстрату к кінцевий продукт наведено в додатках 1, 2 відповідно [19].

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

S. cerevisiae GB Italy – дріжджі роду *Saccharomyces*, які є хлібопекарським комерційним штамом.

Оптимальними умовами для біосинтезу глутатіону штамом GB Italy є температура 28 °C і pH 5,3. Зважаючи на вказані параметри культивування даний штам є мезофільним ацидофілом. Враховуючи, що зазначені умови культивування є сприятливими і для розвитку сторонньої мікрофлори, тому весь процес ферментації проводять в строго асептичних умовах. Оскільки дотримання асептичних умов є неможливим за твердо-фазного культивування, тому GB Italy вирощують глибинним способом. Для забезпечення асептичних умов упродовж культивування проводиться стерилізація обладнання, комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря та піногасників. З метою запобігання контамінації у ферментері створюється надлишковий тиск подачею стерильного повітря.

Отже, культивування *S. cerevisiae* GB Italy для біосинтезу глутатіону проводять глибинним способом.

S. cerevisiae GB Italy є облигатним аеробом, тому штам GB Italy вирощують за безперервної подачі стерильного повітря до ферментера через кільцевий барботер, який встановлений в нижній частині апарату. Надлишок повітря виводиться з ферментеру через штуцер встановлений у кришці апарату.

На теперішній час переважна більшість продуктів мікробного синтезу одержують періодичним способом культивування.

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Шовкань Д.О.			Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					31	98
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Зважаючи, що глутатіон є первинним метаболітом, який досягає свого максимального вмісту через 48 год від початку культивування *S. cerevisiae* GB Italy, тому можливим варіантом є безперервне культивування продуцента. Проте беручи до уваги те, що глутатіон є частково внутрішньоклітинним метаболітом, – реалізація безперервного культивування є недоцільною. Отже, культивування *S. cerevisiae* GB Italy для отримання глутатіону проводять періодичним способом.

Таким чином, для культивування *S. cerevisiae* GB Italy з метою отримання глутатіону проводять періодичне культивування глибинним способом при безперервній аерації середовища в асептичних умовах.

При виборі ферментера ж слід звертати увагу на культурально-морфологічні та фізіологічно-біохімічні особливості продуцента цільового продукту.

Обраний нами продуцент глутатіону є облігатним аеробом, тому процес ферментації потребує постійного доступу кисню в достатній кількості. Оскільки мікроорганізм культивується глибинно, тому доцільним є використання ферментера з перемішуючим пристроєм і барботером для подачі повітря.

Встановлення мішалки забезпечує високий коефіцієнт масообміну в товщі рідини. При виборі мішалки враховують можливий вплив надлишкових зрізових зусиль на клітини продуцента. Тому в табл. 5.1. наведено основні параметри перемішуючих пристроїв, які дозволять нам обрати оптимальний варіант.

Таблиця 5.1

Основні параметри різних типів перемішуючих пристроїв

Тип мішалки	Об'єм рідини, що перемішується однією мішалкою, м ³	Вміст твердої фази під час суспензування, %	Динамічна в'язкість рідини, Па×с	Окружна швидкість мішалки, м/с	Частота обертання мішалки, с ⁻¹
Лопатеві	до 1,5	до 5	до 0,01	1,7–5,0	0,3–1,35
Пропелерні	до 4,0	до 10	0,5– 3	4,5–17,0	8,5–20,0
Турбінні: відкриті	до 10,0	до 60	0,1– 4	3,8–10	0,7–10,0
закриті	до 20,0	до 60 і >	10– 40	2,6–7	1,7–6,0
Спеціальні	до 20,0	до 75	до 10	2,1–8,0	1,7–25,0

Доцільно обрати ферментер з механічним перемішуванням рідини барботажного типу. Перевагою такого типу перемішування є його простота, ефективність та відносна економічність. В якості перемішуючого пристрою буде слугувати турбінна мішалка закритого типу, оскільки вона зможе забезпечити інтенсивне перемішування рідини по всій площині ферментера, на відміну від, наприклад, лопатевих мішалок, адже такі мішалки забезпечують перемішування рідини лише поблизу неї [20].

В апараті з турбінною мішалкою здійснюється механічне перемішування, тому вона додатково оснащена відбійними перегородками.

Зазначимо, що в ході ферментації можливим є утворення піни. Тому для зменшення рівня піни може бути використаний синтетичний або механічний піногасник. Зазначимо, що використання механічного піногасника є більш економічно вигідним вирішенням піноутворення, ніж використання хімічного чи органічного піногасника, оскільки не потребує додаткових затрат на закупівлю комерційного піногасника.

Зважаючи на зазначені вище вимоги до ферментаційного обладнання було обрано ферментер об'ємом 1000 л від компанії БІОТЕХНО. На рис. 5.1 зображено вищезгаданий ферментер [21].



Рис. 5.1. Виробничий ферментер компанії БІОТЕХНО об'ємом 1000 л

Відповідно до специфікації даний ферментер витримує високі температури (до +150°C), різний тиск (від -1 до +20 бар), оснащений SIP мийкою, обладнаний сорочкою та необхідним перемішуючим пристроєм, а також стерильними фільтрами для газів та рідин. Окрім стандартних датчиків (датчики рН, рО₂, піни та температури) ферментер обладнаний датчиками мутності, окисно-відновного потенціалу (ОВП), рівня, ваги, а також витратним датчиком для газів та рідин.

Отже, вибір ферментаційного обладнання залежить від вимог, встановлених для культивування обраного біологічного агенту. Для культивування *S. cerevisiae* GB Italy ферментер повинен бути обладнаний сорочкою для підтримання необхідного температурного режиму, барботером для подачі повітря, мішалкою для покращення масообмінних процесів, датчиком рН для підтримання необхідного рівня іонів H⁺ (5,3) в середовищі культивування упродовж ферментації, датчиком для отримання значень розчиненого кисню, а також механічним піногасником, який являє собою мішалку, встановлену у верхній частині інокулятора (ферментера) і заважає піноутворенню в результаті зрізових зусиль. Обраний нами ферментер компанії БІОТЕХНО відповідає всім зазначеним вище характеристикам і з успіхом може бути використаний у біотехнологічній практиці.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

S. cerevisiae GB Italy є obligатним аеробом, тому штам GB Italy вирощують за безперервної подачі стерильного повітря до ферментера через кільцевий барботер, який встановлений в нижній частині апарату.

Підготовка аераційного повітря, зважаючи на малий об'єм виробництва, проводиться в окремому приміщенні та містить стадії:

1. Забір атмосферного повітря для наступної його очистки здійснюють за допомогою спеціального повітрязабірника на висоті ≈ 12 м від підлоги першого поверху будівлі у найвищій точці;
2. Очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;

3. Стиснення повітря в компресорах або турбоповітрעדувках (при цьому повітря нагрівається до температури 120-200 °C);

4. Охолодження стисненого повітря до температури «точки роси», за якої волога повітря конденсується;

5. Видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері. Крім того ресивер зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;

6. Стабілізація показників (тиск, температура) підігріванням до температури 49-50 °C парою у відповідному теплообміннику;

7. Очищення у фільтрах тонкої очистки до ступеня очищення $E = 99 \%$;

8. Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом чи інокулятором. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E = 99,995 \%$.

Очищення відпрацьованого повітря. Відпрацьоване повітря подають на фільтри для очищення та знешкодження, що встановлені на ферментері, зважаючи на невеликий об'єм виробництва.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Обґрунтування вибору миючого засобу для оброблювальних об'єктів. За сучасними критеріями оцінки, мийно-дезінфікуючі засоби мають відповідати таким вимогам: мати високу віруліцидну активність, бути безпечними при застосуванні, не пошкоджувати матеріали, які піддають обробці, бути економічними, стійкими до органічного навантаження, швидко діяти (мати коротку експозицію), не мати різкого запаху, бути вибухо- і пожежобезпечними, бути простими у приготуванні, використанні та утилізації [22].

Перевага ж віддаватиметься таким функціональним та ергономічним властивостям миючих засобів, як ціна, миюча здатність, універсальність використання, обсяг розфасування, екологічні властивості, оформлення упаковки, діапазон температурного використання [23].

Контроль за приготуванням мийних та дезінфекційних засобів (концентрація активної речовини в препараті і робочому розчині)

покладається на технологічну лабораторію підприємства. Так, наприклад, згідно державних санітарних правил концентрація синтетичних миючих, засобів у миючому розчині не повинна перевищувати 0,5 % - при ручному митті обладнання, 1,0 % - при механічному митті обладнання. Концентрація каустичної соди у миючому розчині не повинна перевищувати 0,2 % - при ручному митті обладнання, 2,0 % - при механічному митті обладнання. А при митті обладнання із алюмінію концентрація кальцинованої соди у миючому розчині не повинна перевищувати 0,5 % - при ручному митті обладнання, 2,0 % - при механічному митті обладнання [24].

Миючим засобом для миття оброблювальних об'єктів таких як робочі поверхні, підлога, стіни, двері тощо, зважаючи на все вищевикладене, оберемо один із запропонованих деззасобів з Державного реєстру дезінфекційних засобів (2020 року) [25]. Обираємо деззасіб для поверхонь «Біонол», що відповідає всім поставленим критеріям. Випускається у формі порошку, у складі алкілбензолсульфонату натрію. «Біонол» повністю розчиняється у воді, добре змивається з поверхонь, не залишає слідів. Добре пініться у гарячій та холодній воді, утворює стійку стабільну піну, що дозволяє відмивати вертикальні поверхні та важкодоступні місця. Використовується згідно з МВ МОЗ України №206-2013 від 12.04.2013 [26].

Для миття ж оброблювальних об'єктів таких як ферментери та інокулятори краще вибрати розчин, що доведено не викликає корозії металів та може застосовуватися для подібного типу обладнання. Оберемо один із запропонованих деззасобів з Державного реєстру дезінфекційних засобів (2020 року). Обираємо рідкий дезінфекційний засіб широкого спектру дії, що відповідає усім заявленим вище вимогам, з миючим ефектом на основі четвертинних амонієвих сполук та третинних амінів «Деланол». Робочі розчини засобу не пошкоджують об'єкти, що виготовлені із корозійностійкого матеріалу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу та поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбовими, гальванічним та полімерним покриттям. Добре змиваються, не залишають нальоту.

Використовують засіб згідно з МВ МОЗ України №307-2013 від 25.11.2013 р [27].

Обґрунтування вибору деззасобу. Асортимент дезінфікуючих засобів включає різні групи хімічних сполук, за складом яких комерційні препарати поділяють на групи.

Кількість дезінфікуючих засобів за групами діючих речовин на ринку України понад 210 найменувань як вітчизняного, так і зарубіжного виробництва.

Найбільша частка препаратів представлена пінними і безпінними лужними засобами. Їх кількість складає 66 найменувань (31,43 %), в тому числі 17 вітчизняного виробництва (OXIN® LD 201, OXIN® LV 210, Эксан-Про-Дез, Контакт, Supra, Сантана ДЕЗ, Басікс, Ultima active, Сантек (ДЕЗ), Fortis, Multisteril sansanit та ін.).

Майже 22,86 % (48 найменувань) асортименту ринку України представляють пінні і безпінні кислотні деззасоби. Із загального числа кислотних деззасобів 20 засобів є вітчизняного виробництва. Асортимент представлений засобами: Сантек К7, Бланідас-А Ацид, Акваклин, Ацетик, Сандим-Д, Делаксон, Биолюфт, Дезокс, СІД 2000, НРРА, Селко, ПЗ-оксонія актив 150, Унівайт, Оргасепт та ін. Препарати даної групи добре очищають поверхні від органічних забруднень, мають широкий спектр дії та мікробіоцидний ефект, добре розчиняються у воді, утворюють в повітрі і воді активні суспензії, емульсії, тумани і аерозолі. Вони здатні до тривалої активності в середовищі, не пошкоджують поверхні об'єктів, а також мають низьку токсичність та алергічну дію.

Кисневмісні дезінфекційні засоби теж займають свою нішу (11 найменувань – 5,24 %). Активно діючими речовинами є активний кисень у складі перекису водню, перекисних сполук, надкислот, перборати, озон та композиційні засоби на їх основі (Пероксимед, Виркон, Сантек, Делаксон, Биолюфт, Дезокс, Екоцид, Унівайт, Оргасепт та ін.). Найсильнішими активаторами перекису водню є мурашина, молочна, щавлева і оцтова кислоти. Більшість засобів не має запаху, але кородують метали. Дані засоби

мають широкий спектр антимікробної активності та проявляють здатність розчиняти біологічні субстрати. В навколишньому середовищі розпадаються на екологічно безпечні речовини. Активні при низьких та високих температурах.

Дещо менше представлені на ринку України дезінфікуючі засоби на основі альдегідів. Використовуються для дезінфекції формальдегід, гліоксалевий і глутаровий альдегід –активно діючі речовини вітчизняних і закордонних препаратів. На вітчизняному ринку 10 засобів, що складає 4,76 %. Засоби даної групи є високоактивними сполуками з широким антимікробним спектром дії.

Високою антимікробною активністю володіють хлорорганічні сполуки. На ринку України вони представлені 9 препаратами (4,29 %), лише три з яких вітчизняного виробництва. Хлорорганічні сполуки володіють високою антимікробною активністю, основою якої є процеси окиснення, денатурація білка та нуклеїнових кислот. Недоліками є низька активність у присутності органічних речовин, подразнююча дія на зовнішні покриви і слизові оболонки, корозійні властивості щодо м'яких металів та екологічна небезпека.

Значну групу (близько 33 препаратів – 15,71 %) представляють дезінфектанти на основі четвертинних амонійних сполук (ЧАС), які складаються з вуглеводного радикалу, метального, етильного або бензольного радикалу, хлору, броду, йоду.

Із групи спиртових засобів широко використовують засоби на основі композицій ізопропілового та етилового спиртів, пропанолу-1, пропанолу-2, 2-етилгексанолу, н-пропанолу. Дані засоби проявляють активну бактерицидну дію мікобактерій, грибів, вегетативних форм бактерій та оболонкових вірусів [28].

Отже, проаналізувавши наявні на сьогодні на ринку України дезінфіканти, оберемо один із запропонованих деззасобів з Державного реєстру дезінфекційних засобів (2020 року). Тож, обираємо засіб дезінфікуючий СВК-ДЕЗ-К-2.

Випускається у вигляді концентрату від безкольорової до світло- жовтої прозорої рідини з слабким запахом. У складі має діючі речовини – четвертинні амонійні сполуки – 15-30%, спирт ізопропіловий 5-15% та гліцерин. Має антимікробну дію відносно грамнегативних і грампозитивних бактерій, вірусів, грибів.

При приготуванні робочих розчинів необхідно керуватися інструкціями по санітарній обробці обладнання та спеціальною таблицею розведення. Так, для приготування 1 л розчину маємо взяти 999 мл води та 1 г концентрату засобу [29].

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Особливості підготовки і стерилізації ПС для одержання інокуляту в колбах на качалці. Склад поживного середовища для отримання інокуляту *S. cerevisiae* GB Italy не містить в своєму складі амінокислот, оскільки вони є попередниками синтезу глутатіону, а також має деякі відмінності у сольовому складі.

Тому склад середовища для інокуляту, г/л:

Глюкоза – 20;

Солодовий екстракт – 20;

Пептон – 1;

Інокулят вирощують упродовж 24 год за температури 28°C і pH 5,8.

Для вирощування початкового посівного матеріалу необхідно у колбі об'ємом 1 л приготувати 600 мл поживного середовища. Оскільки об'єм ПС невеликий, тому стерилізацію проводимо в автоклаві.

Наведене вище середовище для посівного матеріалу ділимо на наступні композиції залежно від режиму стерилізації окремих його складових.

Композиція А: глюкоза, солодовий екстракт та пептон;

Композиція А, яка складається з термолабільних речовин, стерилізують в автоклаві при 112°C і тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Особливості підготовки і стерилізації ПС для вирощування інокуляту в посівних апаратах. Далі інокулят вирощують в посівних апаратах об'ємом 10 та 100 л. Так, для посівного апарату об'ємом 10 л –

Композиція А: глюкоза, солодовий екстракт та пептон;

Для даної стадії біосинтезу потрібно 6 л поживного середовища, тому композицію А готують і стерилізують в збірнику об'ємом 10 л. Режим стерилізації композиції А: 112°C, 0,05 МПа, тривалість 30 хв. Після стерилізації композицію А зі збірника за допомогою насоса подають у посівний апарат об'ємом 10 л, обладнаний сорочкою і мішалкою.

Для посівного апарату об'ємом 100 л –

Композиція А: глюкоза, солодовий екстракт та пептон;

Для даної стадії біосинтезу потрібно 60 л поживного середовища, тому композицію А готують і стерилізують в збірнику об'ємом 100 л. Режим стерилізації композиції А: 112°C, 0,05 МПа, тривалість 30 хв.

Після стерилізації композицію А подають в посівний апарат об'ємом 100 л, обладнаний сорочкою і мішалкою, за допомогою насоса.

Особливості підготовки і стерилізації ПС для виробничого біосинтезу.

Для виробничого біосинтезу склад поживного середовища, г/л:

Глюкоза – 80;

Цитрат натрію – 10;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 7;

KH_2PO_4 – 3,5;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5;

Цистеїн – 4;

Гліцин – 4.

Для одержання середовища об'ємом 600 л ПС ділять на наступні композиції поживного з урахування фізико-хімічних особливостей компонентів:

Композиція А: глюкоза, гліцин;

Композиція Б: цитрат натрію, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 ;

Композиція В: цистеїн;

Композиція А, яка складається з глюкози та гліцину, готується в збірнику об'ємом 100 л і стерилізується в ньому при 112°C тиску 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Композицію Б, яка складається тільки з солей, готують у збірнику, проте стерилізують у ферментері. З метою уникнення випадання в осад фосфорних і основних солей, композицію Б доводять до рН 4,5 6%-м розчином хлоридної кислоти. Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°C, 0,15 МПа упродовж 40 хв.

Амінокислоту, яка входить до складу композиції В, готують у збірнику, стерилізують за допомогою мікрофільтраційної установки.

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника.

Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в ферментері об'ємом 1 м³. Для приготування 1,0 л 6%-ї хлоридної кислоти до 200 мл 36%-ї HCl додають 800 мл питної води при постійному перемішуванні.

Підготовка розчину 6%-го натрій гідроксиду для підлужнення середовища після стерилізації його у ферментері об'ємом 1 м³. Для приготування 1,0 л розчину 6%-го розчину натрій гідроксиду на технічних терезах зважують 60 г кристалічного їдкого натру. До наважки додають 1 л питної води. Стерилізують у автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

Вибір піногасника. В ході ферментації можливим є утворення піни. Тому для зменшення рівня піни може бути використаний синтетичний або механічний піногасник. Зазначимо, що використання механічного піногасника є більш економічно вигідним вирішенням піноутворення, ніж використання хімічного чи органічного піногасника, оскільки не потребує додаткових затрат на закупівлю комерційного піногасника. Отже, вибраний ферментер має бути обладнаний механічним піногасником, який являє собою мішалку, встановлену у верхній частині інокулятора (ферментера) і заважає піноутворенню в результаті зрізових зусиль.

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Глутатіон – трипептид, γ -L-глутаміл-L-цистеїнілгліцин, основний компонент загальної стресової відповіді майже у всіх живих організмів, найпоширеніший небілковий тіол. Організм не приймає глутатіон, що надходить в нього з їжею. Трипептид приносить користь тільки в тому випадку, якщо вироблений всередині тіла людини. Однак його можна отримати ззовні, приймаючи у вигляді харчових добавок. Отже, кінцевим продуктом виробництва буде порошок, виготовлений для подальшого перетворення у дієтичні добавки.

Під час культивування дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy глутатіон виробляється як внутрішньо- так і позаклітинно [9]. Тож, для його виділення маємо спочатку дезінтегрувати клітини, після чого видалити уламки для повного вилучення твердої фази. Отримаємо розчин, що містить глутатіон. Але, так як концентрація його буде доволі низькою, наступним етапом виділення буде концентрація вищезгаданого розчину. Після концентрування глутатіон виділяють за допомогою іонообмінної колони, знову концентрують, доочищають концентрат, концентрують та осаджують. Осаджений глутатіон відділяють за допомогою центрифугування. Наступною стадією отримання глутатіону є сушіння з подальшим подрібненням та просіюванням, в результаті чого отримують білий порошок.

Обґрунтування вибору способу дезінтеграції клітин. Для руйнування (дезінтеграції) клітин використовують набір методів, що належать до трьох груп: фізико-механічні, хімічні та ензиматичні (ферментні). Усі процедури мають бути достатньо жорсткими, аби зруйнувати клітинну стінку, але водночас достатньо м'якими, аби виключити денатурацію або руйнування цільового продукту [30]. Розглянемо кожен метод детальноше.

Головною перевагою фізико-механічних методів руйнування клітин є відносна дешевизна. Проте, обробка може негативно вплинути на якість цільового продукту.

Хімічним методом руйнування клітинної стінки більш обережне. Частіше за все, обробку клітин хімічними реагентами проводять перед ензиматичною, а іноді і фізико-механічною дезінтеграцією.

Для ензиматичної дезінтеграції використовують досить широкий спектр ферментів та ферментних комплексів. Метод широко використовується у лабораторних дослідженнях [31].

Проаналізувавши вищезазначені методи дезінтеграції клітин, обираємо фізико-хімічний метод. Отриману біомасу суспендуємо в демінералізованій воді, після чого діємо на неї, використовуючи комбінацію низького рН (1-1,6 з сульфатною кислотою) та високої температури (75 °C) [32].

Обґрунтування вибору способу видалення уламків клітин. Отриману суспензію маємо звільнити від ядер та уламків клітинних мембран. Зробити це можна за допомогою фільтрування, сепарування або ж центрифугування.

Фільтрування – розділення фаз під час перепускання суспензії через фільтр – найчастіше ж використовують у виробництвах, де цільовий продукт міститься у культуральній рідині. Основний недолік: накопичення осаду на фільтрувальній перегородці, що призводить до суттєвого зменшення швидкості процесу.

Центрифугування має головну перевагу – високу продуктивність процесу за рахунок дії відцентрових сил. Недоліки ж можна назвати такі: складність конструкції та висока вартість її.

Сепарування широко застосовують для розділення дріжджових суспензій. Застосування його має свої плюси: висока продуктивність, концентрування мікроорганізмів без істотних втрат і змін цільових продуктів, компактність використовуваного обладнання. Проте, цей спосіб потребує великих затрат енергії [33].

Зважаючи на вищевикладені переваги та недоліки кожного з методів, видаляємо уламки клітин сепаруванням.

Обґрунтування вибору способу концентрування. Існує декілька способів концентрування розчину: випарювання або ж застосування баромембранних процесів.

Дивлячись на те, що глутатіон витримує дію відносно високих температур [4], можемо розглянути спосіб випарювання. При випарюванні утворюється парова фаза, випарювання настає при температурі кипіння, при якій тиск насиченої пари рідини дорівнює зовнішньому тиску. Проте, цей спосіб не є доцільним через часткову інактивацію цільового продукту, якої можна уникнути, якщо застосувати баромембранні процеси.

До них можна віднести ультрафільтрацію та зворотній осмос. Ці процеси принципово аналогічні – рушійною силою їх є градієнт тиску. Різниця в тому, що для зворотного осмосу використовують мембрани меншого розміру та вищий тиск, ніж для ультрафільтрації. Так як глутатіон – низькомолекулярна речовина, доречніше буде провести зворотній осмос. Це дозволить більш ефективно сконцентрувати розчин з меншими втратами глутатіону.

Для достатнього ступеню концентрування встановимо на установці зворотнього осмосу 4 мембрани.

Обґрунтування вибору способу виділення глутатіону. Сконцентрувавши розчин, маємо виділити глутатіон.

Деякі дослідники [34] пропонують осаджувати глутатіон одразу після концентрування, застосовуючи для цього етанол, метиловий спирт тощо. Проте, таким методом отримують глутатіон низької чистоти, тож технологію розширимо.

Виділимо глутатіон за допомогою використання іонообмінної колонки. Так, використовувати будемо сильнокислотну катіонообмінну смолу Амберліт IR120 Н [35]. Це смола гелевого типу на основі сульфованого полімеру стиролу та дивінілбензолу. Іонна форма – H^+ . Її основними характеристиками є фізична та хімічна стабільність, термостійкість, іонообмінна кінетика та висока обмінна ємність. Отже, очищення глутатіону буде досягнуто перколяцією концентрованого розчину, отриманого на минулому технологічному етапі, в колонці, упакованій Амберлітом. Потім деіонізованою водою промивають смолу, перед елююванням глутатіону H_2SO_4 . Таким чином, отримують близько 85 % вихідного глутатіону.

Для використання у якості дієтичної добавки, у більшості випадків, чистота глутатіону має складати близько 98 %. Отже, для створення конкурентоспроможного на ринку продукту, глутатіон потребує доочищення.

Для цього концентрований елюат просочимо у колонці з неіоногенною пористою смолою SP207 [36]. SP207 представляє собою синтетичний адсорбент на ароматичній основі, в якій бром входить в ароматичне кільце. Це забезпечує адсорбцію високогідрофільних органічних молекул, навіть якщо поверхня пор надто гідрофобна. Тож, концентрований елюат пропускають крізь смолу SP207, що збирає домішки, при цьому глутатіон, що залишається на стінках, промивають демінералізованою водою і збирають фракції. Отриманий розчин з глутатіоном концентрують для подальшого осадження [32].

Обґрунтування вибору способу осадження глутатіону. Осадження – процес, в якому при додаванні певних реагентів виникає випадання розчиненої речовини в осад. Розглянемо можливі методи.

Висолювання використовується найчастіше для осадження ферментів, але і для очищення від домішок. Так, у осадах, отриманих при висолюванні, міститься досить великий відсоток (25-80 %) солі, тож препарати харчового або медичного призначення буде необхідно піддати додатковому очищенню, що не є рентабельним.

Осадити цільовий продукт можемо за допомогою органічного розчинника. Недоліками є те, що реагенти порівняно дорогі та отруйні, тому необхідне чітке виконання відповідних правил та заходів безпеки, а також те, що при використанні порівняно великих об'ємів розчинника є необхідність його регенерації.

Отже, для осадження у отриманий на минулому технологічному етапі сконцентрований розчин додають етанол. Процес осадження проходитиме за температури 5 °C та перемішуванні (300 об/хв) [32].

Обґрунтування вибору способу відділення глутатіону. Розділити суспензію можна за допомогою центрифугування або мікрофільтрації.

Застосування мембранних методів розділення має суттєвий недолік: у міру накопичення затримуваних частинок у поверхні мембрани пори забиватимуться, що призведе до зменшення швидкості фільтрування. Крім цього, з економічної точки зору застосування мембранної фільтрації теж недоречно: мембрани мають високу вартість, потребують постійного очищення та заміни.

При невеликому оброблюваному об'ємі найдоцільнішим варіантом слугує центрифугування, що при високій продуктивності не потребує великих затрат.

Тож, для відділення глутатіону центрифугуємо отриманий раніше розчин за 8000 об/хв упродовж 10 хв.

Після центрифугування отриманий порошковий осад додатково промивають етанолом за допомогою ДРУК-фільтра.

Вибір способу сушіння та сушарки. Сушіння – процес видалення вологи з вологого матеріалу. Найчастіше використовуваними для сушіння продуктів мікробіологічного синтезу є розпилювальна, сублімаційна сушки, сушарки з киплячим шаром, а також вакуум-сушильні шафи.

Сушарки з киплячим шаром найчастіше використовують для висушування пастоподібних, рідких матеріалів. Головна перевага їх – ефективність і швидкість процесу при низьких експлуатаційних витратах, проте така сушарка складна в експлуатації.

Розпилювальні сушарки не потребують точного забезпечення і витримки потоку теплоносія, температура якого може бути порівняно невисокою. Такі сушарки є досить небезпечними та складними, однак їх роботу намагаються автоматизувати.

Сублімаційне сушіння – одне з найефективніших, особливо для термолабільних компонентів. Видалення вологи відбувається переходом її з твердого стану безпосередньо в газоподібний, що дозволяє зберегти молекулярну структуру та об'єм висушеного матеріалу.

Варто розглянути також і вакуум-сушильні шафи, що особливо зручні для малотоннажних виробництв. Шафи мають просту будову та досить дешеві у експлуатації. Головні недоліки – невисока продуктивність (особливо в

порівнянні з сублимаційними сушками безперервної дії) – в шафах сушка періодична – та потреба у великих площах.

Проаналізувавши всі вищенаведені варіанти та звернувши увагу на невеликий об'єм виробництва, доцільним буде обрати вакуум-сушіння.

Обґрунтування вибору способу подрібнення глутатіону. Отриманий на попередній стадії глутатіон маємо подрібнити. Тож, розглянемо ймовірні машини для подрібнення [37].

До найпоширеніших дробарок давилльної дії належать валкові дробарки. Робочою частиною їх є горизонтальні валки, кількість яких може бути різною: найчастіше дробарки мають пару валків. Такі дробарки мають просту конструкцію, дешеві в обслуговуванні та ремонті та мають низькі питомі витрати електроенергії. Проте, вони застосовуються зазвичай для крупного і середнього дроблення.

Для дрібного подрібнення застосовують молоткові дробарки та дезінтегратори. У молотковій дробарці сировина подрібнюється від ударів молотків, які обертаються, а також унаслідок ударів матеріалу об ребристу поверхню стінок корпусу. Матеріал вивантажують крізь сито, величина отворів якого визначає ступінь подрібнення матеріалу. Ступінь подрібнення матеріалу залежить від швидкості обертання молотків.

Дезінтегратори належать до дробарок, подрібнення в яких ґрунтується на принципі вільного удару. Перевагами таких дробарок є простота, висока продуктивність та надійність. Але, дезінтегратори характеризуються також значним пилоутворенням і необхідністю встановлення пристроїв, що захищають ротори від потрапляння в них твердих частинок.

Отже, для подрібнення глутатіону обираємо молоткову дробарку.

Обґрунтування стадії пакування. Отриманий порошок глутатіону пакуємо у пакетики з фольги об'ємом у 200 грам, таким чином за один цикл виробництва отримаємо 5 пакетиків з глутатіоном чистотою $\approx 98\%$ [38].

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

Реалізація технологічного процесу потребує проведення допоміжних робіт. Так, для стадії виділення та очищення глутатіону такою роботою є приготування титрувальних агентів.

Тож, для проведення стадії дезінтеграції клітин буде необхідним розвести розчин сульфатної кислоти, що закупляється в концентрації 96 % до концентрації 33 %.

В свою чергу, схожих маніпуляцій потребує стадія іонообмінного виділення, адже елюентом виступає 1 %-ий розчин сульфатної кислоти.

Зважаючи на те, що на одному з технологічних етапів для промивання отриманого порошку глутатіону знадобиться 96 %-ий розчин етанолу і закуплятися він буде у вказаній вище концентрації, додаткових робіт потребуватиме і стадія осадження. Так, для осадження глутатіону маємо розвести концентрований етанол до концентрації 50 %.

5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях

Отже, зважаючи на вищенаведену інформацію, обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

ТП 6. Зберігання культуральної рідини

ТП 6.1. Зберігання культуральної рідини

ТП 7. Дезінтеграція клітин

ТП 7.1. Руйнування дріжджових клітин

ТП 8. Видалення уламків клітин

ТП 8.1. Видалення уламків клітин

ТП 9. Концентрування розчину

ТП 9.1. Концентрування зворотнім осмосом

ТП 10. Іонообмінне виділення глутатіону

ТП 10.1. Іонообмінне виділення

ТП 11. Концентрування елюату

ТП 11.1. Концентрування елюату

ТП 12. Доочищення

ТП 12.1. Доочищення за допомогою пористої смоли SP207

ТП 13. Концентрування доочищеного елюату

ТП 13.1. Концентрування елюату

ТП 14. Осадження глутатіону

ТП 14.1. Осадження глутатіону

ТП 15. Відділення глутатіону

ТП 15.1. Центрифугування розчину з осадженим глутатіоном

ТП 16. Промивання осаду

ТП 16.1. Промивання розчином етанолу

ТП 17. Отримання сухого глутатіону

ТП 17.1. Сушіння у вакуум-сушильній шафі

ТП 18. Подрібнення глутатіону

ТП. 18.1. Подрібнення глутатіону

ПМВ 19. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 19.1. Фасування, пакування, маркування глутатіону

Вихідні дані:

- об'єм культуральної рідини з однієї ферментації – $V_{кр} = 530$ л/цикл;

- концентрація цільового продукту у КР $C_{глут} = 3,2$ г/л;

- концентрація біомаси у КР $C_{БМ} = 14$ г/л;

- втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 40 %:

початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає $530 \text{ л} \times 3,2 \text{ г/л} = 1696 \text{ г} = 1,696 \text{ кг}$; кінцева кількість (з урахуванням 40 % витрат) має становити 1 кг.

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено в таблиці 5.3.

Таблиця 5.3

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потoki на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (разом 40 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 6. Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 6.1. Зберігання культуральної рідини	КР	530 л	-	530 л	Збірник КР 1 м³
ТП 7. Дезінтеграція клітин						
2	ТП 7.1. Руйнування дріжджових клітин	КР	530 л	-	-	Збірник КР 1 м³
		Розчин кислоти	2,65 л	-	-	-
		Клітинний дезінтеграт	-	-	532,65 л	- (подається відразу до сепаратора)
ТП 8. Видалення уламків клітин						
3	ТП 8.1. Видалення уламків клітин	Уламки клітин	7,42 кг (530×14)			на знешкодження
		Фугат	525,23 л (532,65-7,42)	15,8 л (5%)	509,4 л	Сепаратор продуктивністю 1 м³/год
ТП 9. Концентрування розчину						
4	ТП 9.1. Концентрування зворотнім осмосом	Фугат	509,4 л	-	-	- (від сепаратора)
		Концентрат	127,35 л (509,4/4)	1,35 л (1%)	126 л	Установка зворотного осмосу

						продуктивністю 200 л/год
		Пермеат	-	-	382,05 л (509,4- 127,35)	на знешкодження
ТП 10. Іонообмінне виділення глутатіону						
5	ТП 10.1. Іонообмінне виділення	Концентрат	126 л	-	-	- (від зворотного осмосу)
		Смола Амберліт IR120 Н (1 л пермеату до 1 л смоли за годину)	21 л (126/6 годин)	-	-	Іонообмінна колона на 1 м³
		Деіонізова вода (для промивання смоли 30 л на 1 л смоли)	3780 л (21×30×6)	-	-	-
		1 % H₂SO₄ (розчин для елюювання глутатіону 6 л на 1 л смоли за годину)	756 л (6×21×6)	-	-	-
		Елюат	-	37,8 л (5 %)	718,2 л	-
ТП 11. Концентрування елюату						
6	ТП 11.1. Концентрування елюату	Елюат	718,2 л	-	-	- (від колони)
		Пермеат	-	-	538,65 л	на знешкодження
		Концентрат	179,55 (718,2/4)	1,85 л (1 %)	177,7 л	Установка зворотного осмосу

						продуктивністю 200 л/год
ТП 12. Доочищення						
7	ТП 12.1. Доочищення за допомогою пористої смоли SP207	Концентрат	177,7 л	-	-	- (від зворотного осмосу)
		Смола SP207 (5 л концентрату на 1 л смоли за годину)	17,77 л (177,7/5×2)	-	-	Іонообмінна колона на 250 л
		Вода (для елюювання 6 л на 1 л смоли)	213,2 л (17,77×2×6)	-	-	-
		Елюат	-	10,7 л (5 %)	202,5 л	-
ТП 13. Концентрування доочищеного елюату						
8	ТП 13.1. Концентрування елюату	Елюат	202,5 л	-	-	- (від колони)
		Пермеат	-	-	151,9 л (202,5-50,6)	на знешкодження
		Концентрат	50,6 л (202,5/4)	2,5 л (5 %)	48,1 л	Установка зворотного осмосу продуктивністю 200 л/год
ТП 14. Осадження глутатіону						
9	ТП 14.1. Осадження глутатіону	Концентрат	48,1 л	-	-	- (від зворотного осмосу)
		Органічний розчинник	19,25 л (48,1/5×2)	-	-	- (зі складу)

		(50 % етанол 2 л до 5 л концентрату)				
		Розчин з осадженим глутатіоном	67,35 л	-	67,35 л	Збірник об'ємом 100 л
ТП 15. Відділення глутатіону						
10	ТП 15.1. Центрифугування розчину з осадженим глутатіоном	Розчин з осадженим глутатіоном	67,35 л	-	-	- (від збірника)
		Фугат	-	-	55,65 л	на знешкодження
		Осад	11,8 кг	0,1 (1 %)	11,7 кг	Центрифуга
ТП 16. Промивання осаду						
11	ТП 16.1. Промивання розчином етанолу	Осад	11,7 кг	-	-	ДРУК-фільтр
		Органічний розчинник (96 % етанол)	2,34 л	-	-	-
		Вологий осад	11,7 кг	0,1 (1 %)	11,6 кг	- (до сушарки)
ТП 17. Отримання сухого глутатіону						
12	ТП 17.1. Висушування у вакуум-сушарці	Вологий осад	11,6 кг	-	-	Вакуум-сушильна шафа об'ємом 28 л
		Сухий порошок (вологість 10 %)	1,16 кг	0,01 (1 %)	1,15 кг	- (до дробарки)
ТП 18. Подрібнення глутатіону						
13	ТП 18.1. Подрібнення глутатіону	Сухий порошок (вологість 10 %)	1,15 кг	-	-	- (від сушарки)

		Порошок глутатіону	1,15 кг	0,05 (5%)	1,1 кг	Дробарка продуктивністю 20 кг/год
ПМВ 19. Пакування, маркування, відвантаження						
14	ПМВ 19.1. Фасування, пакування, маркування глутатіону	Порошок глутатіону	1,1 кг	-	-	- (від дробарки)
		Упакований порошок глутатіону	1,1 кг	0,05 (5%)	1,05 кг	-

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	К-сть	Технічна характеристика (виробник)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Панельний фільтр G3-G4 NEW FILTER – VOLZ (Німеччина), фільтруючий матеріал - поліестр, E = 90 % [39]
К-3	Компресор	1	Компресор РТ-0013 фірми INTERTOOL (Україна), потужність 500 л/хв, робочий тиск 8 атм [40]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач JHCOOL марки JH151. Продуктивність 6000 м³/год [41]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер серії РВ 500.11.00 фірми «ЛЕТІСС КОМПРЕССОР» (Україна), об'єм 500 л, робочий тиск 10 атм [42]

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 6. Специфікація обладнання				Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Шовкань Д.О.									
Перевір.		Стабніков В.П.								55	98
Консультант									Кафедра БТМ		
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Обігрівач повітря FX5 фірми THERMON (Україна). Потужність 3-35 кВт [43]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Панельний фільтр F9 NEW FILTER – VOLZ (Німеччина), фільтруючий матеріал - поліефір, E = 99,925 % [39]
Д-8 Д-11 Д-14 Д-18 Д-25 Д-31 Д-44	Об'ємно-ваговий дозатор	7	Дозатор ДВС-301-70-1 фірми Сведа ЛТД (Україна). Продуктивність 0,05 – 620 кг/год [44]
P-9	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач БИОТЕХНО оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 5 л, швидкість перемішування 100 об/хв [на замовлення – 45]
Н-10 Н-13 Н-16 Н-20	Насос перистальтичний	4	Перистальтичний насос ELRO серії L:AL з нержавіючої сталі 316L. Продуктивність 500 л/год [46]
P-12	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач БИОТЕХНО оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 50 л, швидкість перемішування 100 об/хв [47]
P-15	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач БИОТЕХНО оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 40 л, швидкість перемішування 100 об/хв [на замовлення – 45]
МФ-17	Мікрофільтраційна установка	1	Установка мікрофільтрації з мембранами BTS [48]

P-19	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач БІОТЕХНО оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 400 л, швидкість перемішування 100 об/хв [на замовлення – 45]
Ф-21 Ф-23 Ф-28	Фільтр індивідуальної очистки	3	НЕРА фільтр H14 NEW FILTER – VOLZ (Німеччина), E = 99,995 % [49]
Ін-22	Інокулятор	1	Інокулятор БІОТЕХНО (Росія) об'ємом 10 л [50]
Ін-24	Інокулятор	1	Інокулятор БІОТЕХНО (Росія) об'ємом 100 л [51]
З-26	Збірник	1	Збірник БІОТЕХНО оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 200 л, швидкість перемішування 100 об/хв [52]
ФР-29	Ферментер	1	Ферментер БІОТЕХНО з нержавіючої сталі (Росія) об'ємом 1 м ³ (H ≈ 3,3 м) [53]
P-32	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач Азовхімсервіс (Україна) хімічний. Загальний об'єм 5 л [54]
З-33	Збірник культуральної рідини	1	Збірник БІОТЕХНО (Росія) з нержавіючої сталі об'ємом 1 м ³ [55]
Н-27 Н-30 Н-34 Н-36 Н-29 Н-41 Н-43 Н-47	Насос відцентровий	8	Відцентровий насос Gardena (Швеція) з нержавіючої сталі, максимальна продуктивність 2,4 м ³ /год [56]

С-35	Сепаратор	1	Сепаратор БИОТЕХНО з барабаном ВТUX 305, продуктивність 1 м³/год [57]
УЗО-37	Установка зворотнього осмосу	1	Установка зворотнього осмосу ECOSOFT MO5000 (Україна), продуктивність 200 л/год, потужність насоса 0,67 кВт, габарити установки 540x405x1450 мм [58]
З-38	Збірник	1	Збірник БИОТЕХНО оснащений перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 1000 л [55]
ІК-40	Іонообмінна колона	1	Іонообмінна колона SCX Columns, Separation Methods Technologies (США). Висота 5000 мм, діаметр 1100 мм, швидкість лінійного фільтрування 50 м/г [59]
ІК-42	Іонообмінна колона	1	Іонообмінна колона WCX-O Columns, Separation Methods Technologies (США). Висота 1250 мм, діаметр 250 мм, швидкість лінійного фільтрування 50 м/г [60]
Р-45	Реактор-змішувач	1	Реактор хімічний Реаторг (Росія) об'ємом 30 л [61]
З-46	Збірник	1	Збірник БИОТЕХНО оснащений перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 100 л [45]
Ц-48	Центрифуга	1	Високошвидкісна центрифуга Німас CR22N (Японія). Ємність 6 літрів, макс. швидкість 22000 об/хв [62]
ДФ-49	ДРУК-фільтр	1	ДРУК-фільтр ДСЕВ 0,2-11-12-01 ЕВРОХИММАШ (Україна). Об'єм 0,063 м³ [63]

СП-50	Вакуум-сушильна шафа	1	Вакуумна сушильна шафа СП-30, об'єм 28 л, розмір робочої камери 360х330х350, потужність 1600 Вт [64]
Д-51	Дробарка	1	Дробарка лабораторна молоткова Perten Instruments LM 120 (Україна) з діаметром отворів сита 0,5 мм, продуктивність 20 кг/год [65]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема синтезу глутатіону дріжджами *S. cerevisiae* GB Italy включає в себе допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ, а також приготування титрувальних агентів) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез цільового продукту, дезінтеграція клітин, видалення уламків клітин, концентрування розчину, осадження, відділення глутатіону, сушіння, подрібнення та пакування).

Технологічну схему біосинтезу глутатіону наведено у графічній частині.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір повітря

Забір атмосферного повітря для забезпечення аераційних процесів виробництва здійснюють на висоті 12 м (ПЗ-1).

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря пропускають через фільтр грубої очистки класу G3-G4 (Ф-2) з фільтруючим матеріалом на основі поліестру, де відбувається відділення крупних часток бруду та затримка пилу (розмір часток до 1 мкм) до ступеня очищення 90%.

ДР 1.3. Подача повітря на компресор

Стиснення повітря проводиться у компресорі (К-3) до тиску 0,4 МПа, температура повітря зростає від 120 до 250 °С.

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення вологи

Після компресування вміст вологи у повітрі збільшується, з метою виведення вологи повітря охолоджують до 18-19 °С у теплообміннику (Т-4). Далі повітря подають до ресивера (Р-5) для мінімізації коливань тиску.

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Шовкань Д.О.			Розділ 7. Опис технологічної схеми			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.							60	98
Консультант								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Пирог Т.П.								

ДР 1.5. Підігрів повітря

З метою зниження ризику конденсації вологи на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, повітря підігрівають у теплообміннику-нагрівачі (Т-6) до температури 30-35 °С.

ДР 1.6. Тонке очищення повітря

Нагріте повітря подають на головний фільтр очистки класу F9 (Ф-7) з фільтруючим матеріалом на основі поліефіру. Ступінь очищення складає $E=99,925\%$.

ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах

Перед кожним інокулятором та виробничим ферментером (Ін-22, Ін-24, ФР-29), установлюють індивідуальні фільтри HEPA класу H14 (Ф-21, Ф-23, Ф-28). При використанні фільтрів такого типу ступінь очищення становить $E=99,995\%$.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в ферментері об'ємом 1 м³

Для приготування 1,0 л 6%-ї хлоридної кислоти до 200 мл 36%-ї HCl при постійному перемішуванні додають 800 мл питної води.

ДР 2.2. Приготування 6%-го розчину NaOH для ферментера об'ємом 1 м³

Для приготування 1,0 л розчину 6%-го розчину натрій гідроксиду на технічних терезах зважують 60 г кристалічного їдкого натру. До наважки додають 1 л питної води. Стерилізують у автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 2.3. Приготування 33 %-го розчину H₂SO₄ для дезінтеграції клітин

Для приготування 2,65 л 33 %-го розчину сульфатної кислоти в реактор-змішувач (Р-32) через об'ємно-ваговий дозатор (Д-31) вносять 1740 мл води додають 310 мл концентрованої 96 %-ї сульфатної кислоти, перемішують.

ДР 2.4. Приготування 1 %-го розчину H₂SO₄ для елюювання

Для приготування 756 л 1 %-го розчину сульфатної кислоти в збірник (З-38) об'ємом 1 м³ вносять 748 л води питної, додають 7,9 л концентрованої 96 %-ї сульфатної кислоти при перемішуванні.

ДР 2.5. Приготування 50 %-го розчину етанолу для осадження

Для приготування 19,25 л 50 %-го розчину етанолу в кислоти в реактор-змішувач (Р-45) об'ємом 30 л через об'ємно-ваговий дозатор (Д-44) при перемішуванні вносять 9,25 л води питної, додають 10 л 96 %-го етанолу.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

Для вирощування інокуляту потрібно 600 мл поживного середовища (ПС). Вміст компонентів для приготування ПС об'ємом 600 мл наведено наведено у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 мл середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 600 мл ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	20	12	Композиція А	600
Солодовий екстракт	20	12		
Пептон	1	0,6		
Вода		600 (мл)		

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 12 г глюкози, 12 г солодового екстракту, 0,6 г пептону і поміщають в колбу об'ємом 1 л. Додають 600 мл дистильованої води і перемішують до розчинення компонентів після чого розчин закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 112 °С 30 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 600 мл посівного матеріалу, також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація гострою парою проходить у збірнику. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композиції А, становить 4,8 л.

Вміст компонентів для приготування 6 л середовища наведено у табл. 7.2.

Таблиця 7.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 6 л ПС, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	120	Композиція А	5
Солодовий екстракт	20	120		
Пептон	1	6		
Вода		4,8 (л)		

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-8) у збірник (Р-9) об'ємом 5 л додають 120 г глюкози, 120 г солодового екстракту, 6 г пептону та 4,8 л води. Для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50-100 об/хв. Стерилізацію термолабільної композиції А проводять у збірнику при 112 °С упродовж 30 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль.

Приготовлений розчин подають в інокулятор.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

Для засіву даного інокулятора потрібно внести 6 л посівного матеріалу, також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація гострою парою проходить у збірнику. Також враховуючи велику кількість глюкози та солодового екстракту (по 1,2 кг), які також займають певний об'єм, тоді необхідна кількість води, потрібної для приготування композиції А, становить 45,6 л.

Вміст компонентів для приготування 60 л середовища наведено у табл. 7.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 60 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 60 л ПС, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	1,2	Композиція А	48
Солодовий екстракт	20	1,2		
Пептон	1	0,06		
Вода		45,6 (л)		

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-11) у збірник (Р-12) об'ємом 50 л поміщають 1,2 кг глюкози, 1,2 кг солодового екстракту, 0,06 кг пептону і 45,6 л води. Для кращого розчинення компонентів у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50-100 об/хв. Враховуючи, що режим стерилізації даної композиції 112 °С упродовж 30 хв, то стерилізацію її проводять у збірнику. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль.

Приготовлене поживне середовище подають в інокулятор.

*ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу *S. cerevisiae* GB Italy у ферментері на 1 м³*

Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³ потрібно внести 60 л посівного матеріалу, також враховується конденсат (10%), оскільки стерилізація гострою парою проходить у ферментері. Враховуючи, що компоненти, які використовуються для приготування 600 л ПС, займають великі об'єми, тоді об'єм води, потрібний для приготування ПС, становить 414 л.

Вміст компонентів для приготування 600 л середовища наведено у табл. 7.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 л середовища

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонентів у 600 л ПС, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	80,0	48,0	Композиція А	320,4
Гліцин	4,0	2,4		
Вода		270 (л)		
Цитрат натрію	10,0	6,0	Композиція Б	136,8
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,0	8,4		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	0,3		
KH ₂ PO ₄	3,5	2,1		
Вода		120 (л)	Композиція В	30,4
Цистеїн	4,0	2,4		
Вода		28 (л)		

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-18) у збірник (Р-19) об'ємом 400 л подають 48 кг глюкози, 2,4 кг гліцину і 270 л води. Для кращого розчинення глюкози у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50-100 об/хв.

Стерилізація композиції А проходить у збірнику при 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-25) у збірник (З-26) об'ємом 200 л подають 6,0 кг цитрату натрію, 8,4 кг (NH₄)₂SO₄, 0,3 кг MgSO₄×7H₂O і 2,1 кг KH₂PO₄. Наважки поміщають у збірник з сорочкою і за допомогою об'ємно-вагового дозатора додають 120 л води.

Для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей до 40 °С при перемішуванні 50-100 об/хв.

Приготовлену композицію Б за допомогою насоса (Н-27) перекачують у попередньо простерелізований ферментер об'ємом 1 м³, обладнаний датчиком рН, додають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять у ферментері при 131 °С (0,15 МПа) упродовж 1 год.

ДР 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-14) у збірник (Р-15) об'ємом 40 л подають 2,4 кг цистеїну, через об'ємно-ваговий дозатор додають 28 л води. Для кращого розчинення амінокислоти у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50-100 об/хв.

Стерилізація композиції В проходить за допомогою мікрофільтраційної установки (МФ-17).

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *S. cerevisiae* GB Italy зберігають у пробірках на скошеному сусло-агарі (СА) у темряві за температури 4 ± 2 °С. Пересіви здійснюють 1-2 рази на місяць. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

*ТП 4.2. Одержання *S. cerevisiae* GB Italy на агаризованому середовищі*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з середовищем сусло-агаром, в асептичних умовах розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з агаризованим суслом. Вирощують при температурі 28 °С упродовж 48 год.

*ТП 4.3. Вирощування робочої культури *S. cerevisiae* GB Italy на агаризованому середовищі*

Ізольовані колонії (від ТП 4.2) в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з сусло агаром до ізольованих колоній (одна ізольована колонія – одна пробірка), що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 48 год при температурі 28 °С.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Вміст колби з композицією А (від ДР 3.1.1) розливають по 100 мл в чотири стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *S. cerevisiae* GB Italy, вирощеною на сусло агарі, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, клітини суспендують, одержану суспензію клітин відбирають і вносять у колби з

розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію клітин, одержану з однієї пробірки.

Штам вирощують у колбі на качалці (180 об/хв) при 28 °С упродовж 24

В асептичних умовах інокулянт з 4 колб переносять в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор (ІН-22) об'ємом 10 л з композицією А (від ДР 2.2) через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 4.4). Включають перемішувач (320 об/хв), аерацію, а в сорочку інокулятора подають пару.

Культивування здійснюють при температурі 28 °С упродовж 24 год, витрати повітря 1 л/(л·хв). Культивують до досягнення концентрації біомаси ($x=7-7,5$ г/л).

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

В інокулятор (ІН-24) об'ємом 100 л з композицією А (від ДР 3.3.1) через трубу перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 4.5). Включають перемішувач (320 об/хв), аерацію, а в сорочку інокулятора подають пару.

Культивування здійснюють при температурі 28 °С упродовж 24 год, витрати повітря 1 л/(л·хв). Культивують до досягнення концентрації біомаси ($x=7-7,5$ г/л).

ТП 5. Виробничий біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез

У ферментер (ФР-29) об'ємом 1 м³ з композицією А (від ДР 3.4.1) подають композицію Б (від ДР 3.4.2) і композицію В (від ДР 3.4.3), рН середовища доводять до 5,3 додаванням 6%-го розчину натрій гідроксиду (від ДР 2.2). Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал (від ТП 4.6).

Біосинтез здійснюють за температури 28 °С упродовж 48 год і перемішуванні 400 об/хв.

За показниками датчика утворення піни автоматично вмикається мішалка для механічного гасіння утвореної піни.

У процесі культивування кожні 4 год відбирають проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю. У пробі, відібраній на 48 год культивування, визначають концентрації глутатіону ($C = 3200$ мг/л) і біомаси ($x = 14-15$ г/л).

ТП 6. Зберігання культуральної рідини

ТП 6.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину з ферментера подають у збірник (З-33) об'ємом 1 м^3 .

ТП 7. Дезінтеграція клітин

ТП 7.1. Руйнування дріжджових клітин

У збірник (З-33) об'ємом 1 м^3 (від ДР 2.3) подають 2650 мл 33%-го розчину сульфатної кислоти. Суміш витримують при температурі 75°C упродовж 20 хв при постійному перемішуванні (60 об/хв). Після чого дезінтеграція охолоджують до 40°C шляхом подачі холодної води в сорочку збірника.

ТП 8. Видалення уламків клітин

ТП 8.1. Видалення уламків клітин

Стабілізований дезінтеграція через насос (Н-34) подають у сепаратор (С-35) з продуктивністю $1\text{ м}^3/\text{год}$, де відбувається відділення уламків клітин. Уламки клітин передають на утилізацію (до ЗВ 20.2).

ТП 9. Концентрування розчину

ТП 9.1. Концентрування зворотнім осмосом

Отриманий розчин (від ТП 8.1) передають насосом (Н-36), концентрують у 4 рази за допомогою установки зворотного осмосу (УЗО-37). Продуктивність установки – 200 л/год . Концентрат накопичується в збірнику, пермеат – на переробку (до ЗВ 20.1).

ТП 10. Іонообмінне виділення глутатіону

ТП 10.1. Іонообмінне виділення

В іонообмінну колону (ІК-40) вносять 21 л сильнокислотної катіонообмінної смоли Амберліт IR120 Н. Після чого в іонообмінну колону подають концентрат (від ТП 9.1) (швидкість 1 л пермеату на 1 л смоли за годину).

Після завантаження пермеату в колону, смолу промивають деіонізованою водою в об'ємі 3780 л (30 л на 1 л смоли). Розчин 1 % H_2SO_4 від ДР 2.4 для елюювання глутатіону (6 л на 1 л смоли за годину) від збірника (З-38) за допомогою насоса (Н-39) подають до колони в об'ємі 756 л. Отриманий елюат направляють до подальшого технологічного етапу.

ТП 11. Концентрування елюату

ТП 11.1. Концентрування елюату

Отриманий елюат (від ТП 10.1) передають насосом (Н-41), концентрують за допомогою установки зворотного осмосу (УЗО-37). Продуктивність установки – 200 л/год. Концентрат накопичується в збірнику, пермеат – на переробку (до ЗВ 20.1).

ТП 12. Доочищення

ТП 12.1. Доочищення за допомогою пористої смоли SP207

Концентрат (від ТП 11.1) подають в іонообмінну колону (ІК-42), завантажену 17,77 л неіоногенною пористою смолою SP207. Потім демінералізовану воду (для елюювання 6 л на 1 л смоли) в об'ємі 213,2 л подають в колону, таким чином забезпечуючи промивання. Отриманий елюат відправляється до наступної технологічної стадії.

ТП 13. Концентрування доочищеного елюату

ТП 13.1. Концентрування елюату

Отриманий елюат (від ТП 12.1) передають насосом (Н-43), концентрують за допомогою установки зворотного осмосу (УЗО-37). Продуктивність установки – 200 л/год. Концентрат накопичується в збірнику, пермеат – на переробку (до ЗВ 20.1).

ТП 14. Осадження глутатіону

ТП 14.1. Осадження глутатіону

Концентрат (від ТП 13.1) подають у збірник (З-46). Туди ж (від ДР 2.5) подають 19,25 л розчину 50 %-го етанолу для осадження глутатіону. Процес проходить за температури 5 °C та перемішуванні (300 об/хв) впродовж 30 хв.

ТП 15. Відділення глутатіону

ТП 15.1. Центрифугування розчину з осадженим глутатіоном

Отриманий (від *ТП 14.1*) розчин з осадженим глутатіоном подають насосом (Н-47) у центрифугу (Ц-48), де його центрифугують за 8000 об/хв упродовж 10 хв. Фугат передають на утилізацію (до *ЗВ 20.1*).

ТП 16. Промивання осаду

ТП 16.1. Промивання розчином етанолу

Вологий осад (від *ТП 15.1*) подають на ДРУК-фільтр (ДФ-49) для додаткового промивання 2,34 л 96 %-им розчином етанолу.

ТП 17. Отримання сухого глутатіону

ТП 17.1. Висушування у вакуум-сушильній шафі

Одержаний порошок (від *ТП 16.1*) сушать у вакуум-сушарці (СШ-50). Сушіння відбувається за температури 100 °С до вмісту води 10 %. В результаті отримують сухий порошок глутатіону, які відправляють на подальше подрібнення.

ТП 18. Подрібнення глутатіону

ТП 18.1. Подрібнення глутатіону

Сухий порошок (від *ТП 17.1*) подрібнюють на молотковій дробарці (Д-51). Після подрібнення порошок просіюють на ситі з отворами 0,5 мм, вивантажують на пересувну ємність і відправляють на наступну стадію.

ПМВ 19. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 19.1. Фасування, пакування, маркування порошку глутатіону

Подрібнений порошок (від *ДР 18.1*) пакують у фольговані пакети місткістю 200 гр вручну, візуально контролюючи якість пакування й маркування.

ЗВ 20. Знешкодження та утилізація відходів

ЗВ 20.1. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи (від *ТП 9.1, ТП 11.1, ТП 13.1, ТП 15.1*) надходять у ємність для збору рідких відходів для усереднення, після чого спрямовуються на водоочисні споруди.

ЗВ 20.2. Утилізація твердих відходів

Тверді відходи (від *ТП 8.1*) збирають у спеціальні ємності та спрямовують на утилізацію.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Карта постадійного контролю доферментаційних процесів виробництва глутатіону наведена у табл. 8.1.

Таблиця 8.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1.1 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 90 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.1.2 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,35-0,5 МПа, t = 220-250 °C
Кт 1.1.3 Охолодження повітря	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 25-40 °C
Кт 1.1.4 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W = 60 %
Кт 1.1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 40 °C
Кт 1.1.6 Тонке очищення повітря	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	E = 99,925 %
Кт 1.1.7 Очищення повітря на індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальних фільтрах	E = 99,995 %

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 8. Контроль виробництва				Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Шовкань Д.О.									
Перевір.		Стабніков В.П.								72	98
Консультант									Кафедра БТМ		
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

Кх, Кт 2.1.1 Приготування та стерилізація титрувальних агентів Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в ферментері об'ємом 1 м ³	Розчин хлоридної кислоти Тиск, температура, час, концентрація	Манометр, термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 40 хв
Кх, Кт 2.2.1 Приготування 6%-го розчину NaOH для ферментера об'ємом 1 м ³	Розчин натрій гідроксиду Тиск, температура, час, концентрація	Манометр, термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 40 хв
Кт, Км 3.1.1, 3.2.1, 3.3.1, 3.4.1 Приготування та стерилізація поживного середовища Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 112 °C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 60 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В Стерильність	Мікробіологіч- ний контроль	Мікробіологіч- ний контроль після стерилізації	ø = 0,45 мкм, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підготовка посівного матеріалу	Колекційна культура S. cerevisiae GB Italy Морфологічна	Годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль кожні 24 год	t = 4 °C, відсутність сторонньої мікробіоти

Підтримання колекційної культури	однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій			
Кт, Км 4.2, 4.3 Одержання та виращування <i>S. cerevisiae</i> GB Italy на агаризованому середовищі	Колекційна культура <i>S. cerevisiae</i> GB Italy Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль кожні 12 год	$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Виращування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал Температура, тривалість виращування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу виращування, мікроскопіюван- ня – кожні 8 годин	$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\omega = 180$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти $C_{\text{біом.}} = 1 - 1,2$ г/л
Кт, Кх, Км 4.5, 4.6 Виращування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 та 100 л	Посівний матеріал Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, мікробіологіч- на чистота культури, концентрація біомаси	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН; мікроскопіюван- ня – кожні 8 годин	$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\omega = 320$ об/хв, рН= 5,3, $C_{\text{біом.}} = 7-7,5$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.1 Виробничий біосинтез	Культуральна рідина Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, рівень піни,	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення, мікробіологічний контроль	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, рівень піни контролюються і підтримуються автоматично весь час культивування;	$t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, $\omega = 400$ об/хв, рН= 5,3, $C_{\text{біом.}} = 14-15$ г/л, $C_{\text{глют.}} = 3,2$ г/л, відсутність сторонньої

	мікробіологічна чистота культури, концентрація глутатіону, концентрація біомаси		мікроскопіювання – кожні 4 години	мікробіоти
--	---	--	-----------------------------------	------------

8.2. Мікробіологічний контроль

Упродовж виробничого біосинтезу *S. cerevisiae* GB Italy з періодичністю у 4 год відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю.

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем і мікроскопування.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій і з сусло-агаром (СА) – для грибів і дріжджів.

Колонії *S. cerevisiae* GB Italy світло-бежеві, в процесі старіння можуть змінювати колір до темно-бежевого, колонії мають округлу форму у вигляді квітки. Поверхня колоній, вирощених на сусло агарі, була матовою, плоскою, структура – м'якої консистенції, пастоподібна, легко відділяється від агару [12].

На рис. 8.1. представлено колонії *S. cerevisiae*.



Рис. 8.1. Колонії *S. cerevisiae*

У масштабах промислового виробництва немає достатнього часу для очікування результатів мікробного контролю висівом на чашки Петрі, тому частіше використовують метод мікроскопіювання.

Чистоту випробуваної культури та її морфологію оцінювали методом оптичної мікроскопії.

Клітини *S. cerevisiae* мають округлу, яйцевидну або еліпсоїдну форму; розмір їх коливається від 2,5 до 10 мкм в ширину і від 4,5 до 21 мкм в довжину. Температурний діапазон зростання дріжджів складає близько 30 °С. Можуть рости в межах рН від 3,0 до 8,0; оптимальне значення 5,0 [12].

На рис. 8.2 зображено вигляд клітин *S. cerevisiae* за оптичної мікроскопії (збільшення $\times 40$) [66].

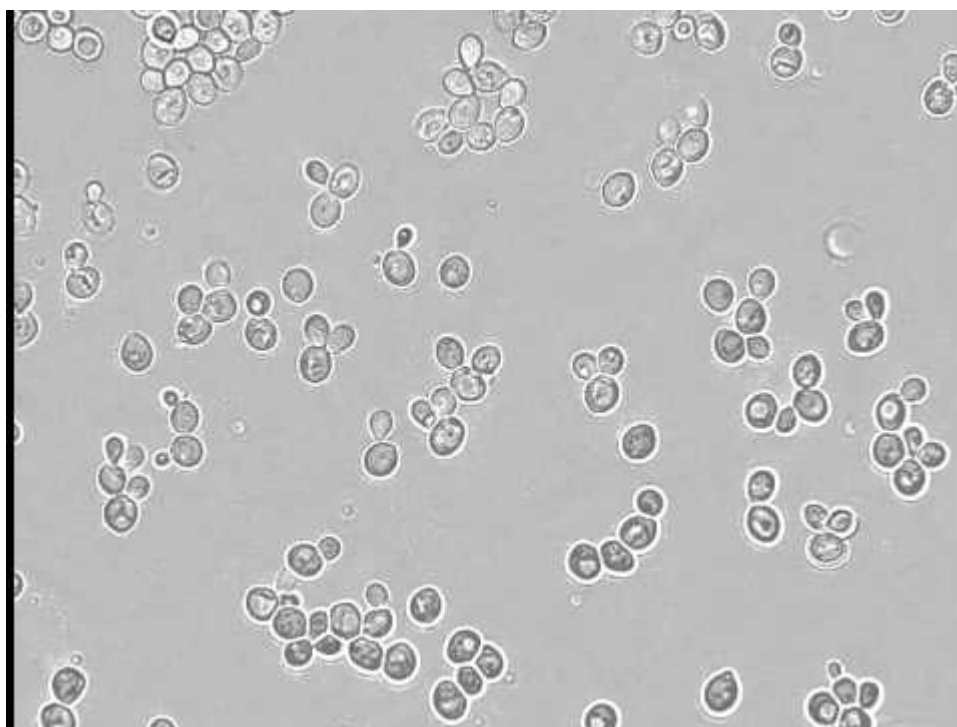


Рис. 8.2. Світлова мікроскопія дріжджів *S. cerevisiae*, $\times 40$

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

Упродовж виробничого біосинтезу *S. cerevisiae* GB Italy з періодичністю у 4 год відбирають проби культуральної рідини для визначення концентрації біомаси, а також вмісту джерел вуглецю (глюкози) та азоту (амоній сульфату).

8.3.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси *S. cerevisiae* GB Italy визначали ваговим методом.

Культуральну рідину центрифугували 7000 об/хв упродовж 10 хв. Відділені клітини дріжджів двічі промивали водою і висушували упродовж 24 год за температури 80 °C [9, 67].

8.3.2. Концентрація цільового продукту

Для визначення кількості внутрішньоклітинного глутатіону культуральну рідину центрифугують 7000 об/хв упродовж 10 хв.

Отримані клітини двічі промивають водою, після чого піддають термічній обробці (100 °C) упродовж 6 хв. Після нагрівання клітини охолоджують у льодяній бані і знову центрифугують (10000 об/хв) упродовж 10 хв. Надосадова рідина містить внутрішньоклітинний глутатіон.

Для кількісного і якісного визначення глутатіону використовують метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з УФ детектором (210 нм). *Принцип* рідинної хроматографії полягає в розділенні компонентів сумішей, засновуючись на відмінності в рівноважному розподілі їх між двома фазами, що не змішуються, одна з яких нерухома, а інша рухома. Суміші нерівно розподіляються між двома фазами завдяки своїй полярності, розміру або іншим властивостям.

Так, визначення проводили за температури 30 °C з використанням колонки 250-4 мм Purospher RP-18 від Merck. Елюція проходила за використання 25 mM NaH_2PO_4 при pH 3,5 зі швидкістю потоку 0,3 мл/хв. Як стандарт було використано глутатіон (відновленої форми) від Sigma [9, 67].

8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Концентрація глюкози. Концентрацію глюкози визначають глюкозооксидазним методом. Глюкозооксидазний метод визнаний сьогодні одним з найбільш точних кількісних методів визначення глюкози.

Принцип методу визначення глюкози заснований на окисненні D-глюкози глюкозооксидазою до глюкуронової кислоти з утворення перекису водню, який під дією пероксидази реагує з 4-аміноантіпірином і фенолом з утворенням сполуки червоного кольору. Інтенсивність забарвлення пропорційна до

концентрації глюкози в досліджуваному зразку і вимірюється фотоколориметрично за довжини хвилі 540 нм.

До 0,01 мл фільтрату культуральної рідини додають 1 мл робочого розчину, витримують 30 хв за кімнатної температури. Вимірювання оптичної густини розчинів проводять за довжини хвилі 540 нм проти незабарвленої проби [68].

Концентрацію глюкози (ммоль/л) розраховують за формулою:

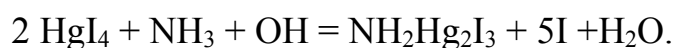
$$C = \frac{E_0}{E_K} \times 10,$$

Де E_0 – оптична густина досліджуваної проби;

E_K – оптична густина калібрувальної проби.

Концентрація азоту. В середовищі культивування *S. cerevisiae* GB Italy джерелом азоту слугує амоній сульфат.

Найчастіше амінний азот визначають методом Несслера. Даний метод базується на тому, що у лужному розчині аміак реагує з тетрайодомеркуратом (II) калію, утворюючи різні жовто-коричневі сполуки, що випадають в осад або (при малих концентраціях) переходять у колоїдні розчини. Реакція описується рівнянням:



Вміст азоту, ртуті та йодиду в осаді виражається співвідношенням 1:2:3, проте можлива присутність в осаді та інших сполук ($\text{OHg}_2\text{NH}_2\text{I}$ і ін.). Деяка невизначеність складу з'єднання, що утворюється, вимагає точного дотримання умов проведення визначення як при аналізі зразку, так і при побудові калібрувального графіка. До таких умов відноситься концентрація лугу. За великого надлишку лугу може відбутися розкладання $\text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3$ з утворенням оксиду ртуті.

Для визначення аміаку до 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 1 мл реактиву Несслера. Коефіцієнт екстинції вимірюють при довжині хвилі 400-425 нм.

Концентрацію аміаку визначають за калібрувальним графіком [69].

8.4. Показники якості готового продукту

Готову продукцію контролюють за вмістом вологи, вмістом глутатіону та на мікробіологічну чистоту.

Вологість. Наважку субстанції масою 1 г поміщали на попередньо відтаровану чашку аналізатора вологості і висушували за температури 105 °С протягом 3 годин. Втрата маси при висушуванні не має перевищувати 10% [70].

Вміст глутатіону. Хроматографічне розділення проводили на приладі «Agilent Technologies 1200 Infinity» (США). Електронні спектри реєстрували за допомогою діод-матричного детектора серії Agilent 1200. Розділення проводили на сталевий колонці Ascentis express C18 2,7 μm $\times$ 100 мм $\times$ 4,6 мм.

Склад мобільного фази включає (А) - 1%-ий водний розчин кислоти мурашиної, (Б) – спирт етиловий. Елюювання здійснювали в наступних умовах: швидкість потоку: 0,5 мл/хв; температура колонки: 35 °С; детекція: 398 нм; обсяг введеної проби: 1 $\mu\text{л}$. Елюювання здійснювали в градієнтному режимі.

Для приготування розчину глутатіону використовували 0,05 Н розчин натрію тетраборату. 0,025 г випробуваного зразка глутатіону поміщали в мірну колбу, об'ємом 25 мл, доливали 10 мл 0,05 Н розчину тетраборату натрію, збовтували до повного розчинення речовини і розчин доводили до мітки тим же розчинником, перемішували. 2 мл приготованого розчину глутатіону поміщали в мірну колбу, місткістю 25 мл, додавали 2 мл 0,1% -ного розчину 4-метокси-2-нітрофеніл-ізотіоціанату, збовтували. Отриманий розчин доводили до мітки етанолом, перемішували і нагрівали в сушильній шафі при температурі 80 °С протягом 30 хвилин. Після закінчення зазначеного часу розчин охолоджували до кімнатної температури і хроматографували. Записують хроматограми, визначають час утримання, обчислюють кількість глутатіону ($\geq 92\%$) [71].

Мікробіологічна чистота. У 100 мл буферного розчину, що містить натрій хлоридом та пептон (рН 7,0) розчиняють 10 г субстанції. Тим часом у чашки Петрі вносять розплавлене поживне середовище МПА (бактерії) або СА (гриби, дріжджі) та дають йому застигнути. Чашки підсушують, наприклад, у ламінарному струмені стерильного повітря або у термостаті. За допомогою

шпателя Дригальського зразок об'ємом 0,1 мл розподіляють по поверхні середовища. При цьому для кожного розведення використовують не менше двох чашок Петрі з кожним поживним середовищем. Посіви інкубують протягом зазвичай п'яти діб при температурі від 30-35 °С (20-25 °С для грибів та дріжджів). Далі чашки, відповідні одному розведенню, для якого кількість колоній на одній чашці Петрі не перевищує 300 (100 колоній для грибів та дріжджів), відбирають, підраховують середнє арифметичне значення числа колоній та визначають число КУО/г. В 1 г не допускається більше 10^3 клітин бактерій і 10^2 клітин грибів та дріжджів.

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Автоматизація виробництва — застосування технічних засобів, економіко-математичних методів і систем керування, що вивільняють людину від функцій управління й залишають за людиною функції контролю та прийняття рішень. Автоматизація сприяє загальному технологічному прогресу суспільства й полягає у створенні можливостей для поліпшення умов і продуктивності праці, зростання якості продукції і, як результат, – підвищенню конкурентноспроможності продукції на ринку.

Автоматизація процесів хімічних і фармацевтичних технологій значною мірою визначає наявність відповідних приладів, що фіксують температуру, рівні тиску, витрати, склад і властивості речовин і готової продукції. Можливість визначення діапазону показників хімічних, фізичних і фізико-хімічних процесів, висока точність і швидкість зробили реальною автоматизацію багатьох процесів. На роботу пристроїв автоматики впливають глибокий вакуум, високий і надвисокий тиск, дуже низькі та надзвичайно високі температури, великі швидкості реакцій, висока вологість, агресивність середовища, вогне- і вибухонебезпека й інші особливі властивості речовин і середовищ.

Для автоматизації обираємо ділянку сушіння цільового продукту – глутатіону – у вакуум-сушарці.

Сушіння – процес видалення вологи з вологого матеріалу. Найчастіше використовуваними для сушіння продуктів мікробіологічного синтезу є розпилювальна, сублімаційна сушки, сушарки з киплячим шаром, а також вакуум-сушильні шафи.

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Шовкань Д.О.					81	98
Перевір.		Стабніков В.П.						
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

Вакуум-сушильні шафи особливо зручні для малотоннажних виробництв. Шафи мають просту будову та досить дешеві у експлуатації. Головні недоліки – невисока продуктивність (особливо в порівнянні з сублимаційними сушками безперервної дії) – в шафах сушка періодична – та потреба у великих площах.

Таким чином, отриманий на минулому технологічному етапі вологий порошок вручну завантажують у вакуум-сушарку, при чому контролюється маса його на вході в апарат. Сушіння проводять згідно параметрів, що контролюються: температура сушіння в межах 100 °C, що регулюється за допомогою зміни витрати пари, а тиск в межах 10 кПа. Контролюється також і маса порошку на виході з апарату – це дає можливість оцінити ефективність процесу.

Таблиця 9.1

Завдання на розробку системи автоматизації ділянки сушіння цільового продукту

№ з.п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Вакуум- сушарка	Маса на вході в апарат	11,7 кг	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
2		Температура сушіння	100 °C ± 2 °C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
3		Тиск (вакуум) в апараті	10 кПа ± 2 кПа	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
4		Маса на виході з апарату	1,17 кг	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора

У відповідності з завданням, сформованим у таблиці 9.1 у першому контурі автоматичного контролю і управління у вакуум-сушарці необхідно контролювати масу вологого порошку, що подається в апарат. Це значення відображається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) значень в його архіві. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

У другому контурі автоматичного контролю і управління у вакуум-сушарці необхідно контролювати та регулювати температуру пари, що має припустиме значення $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві.

Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок зміни витрати пари, яка змінюється пневматичним виконавчим механізмом.

Враховуючи, що вимірювання температури відбувається неперервно у часі в певному діапазоні, необхідно розглядати приклади контролю в яких від датчика отримується аналоговий (неперервний) сигнал. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

У третьому контурі автоматичного контролю і управління у вакуум-сушарці необхідно контролювати тиск, який має припустиме значення $10\text{ кПа} \pm 2\text{ кПа}$. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві.

Враховуючи, що вимірювання тиску відбувається неперервно в часі в певному діапазоні, тому необхідно розглядати приклади контролю в яких від датчика отримується аналоговий (неперервний) сигнал. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

У четвертому контурі автоматичного контролю і управління у вакуум-сушарці необхідно контролювати масу отриманого сухого порошку. Це значення відображається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) значень в його архіві. При цьому сам датчик розташований «по місцю».

Таблиця 9.2

Специфікація приладів

№ прикладу	№ позиції за схемою	Параметр	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, модель	Виробник
1	2	3	4	5	6
1	1a	Маса на вході в апарат	Тензометричний датчик SIWAREX WL200, матеріал виготовлення: нержавіюча сталь, номінальне навантаження 100т, клас точності 0,1	CP-S SB	Siemens
2	2a	Температура сушіння	Біметалевий термометр, діапазон вимірювань: 0...+250 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 25бар, під'єднання G1/2, довжина штуцера 100мм, клас точності 1,0	ТБ	ПАО „Склоприбор”, Україна
	2б		Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20 мА, вихідний сигнал 20...100 кПа	2713-WP	Dwyer
3	3a	Тиск (вакуум) в апараті	Тензометричний перетворювач тиску, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, діапазон вимірювання -0,4...60МПа, під'єднання G1/2, клас точності 0,25, вихідний сигнал аналоговий	ПД-И-30	ПАО „Склоприбор”, Україна
4	4a	Маса на виході з апарату	Тензометричний датчик SIWAREX WL200, матеріал виготовлення: нержавіюча сталь, номінальне навантаження 100т, клас точності 0,1	CP-S SB	Siemens

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологія одержання глутатіону включає в себе допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ, а також приготування титрувальних агентів) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез цільового продукту, дезінтеграція клітин, видалення уламків клітин, концентрування розчину, осадження, відділення глутатіону, сушіння, подрібнення та пакування).

1. Санітарна підготовка виробництва. Даний етап включає щоденне і генеральне прибирання приміщення із застосуванням миючих засобів «Біонол» і «СВК-ДЕЗ-К-2». Після обробки відпрацьований мийний розчин надходить до каналізації. Миття резервуарів обладнання здійснюють за допомогою СІР-мийки із застосуванням засобу «Деланол». Після обробки промивна вода надходить до каналізації, а відпрацьований розчин повторно використовується для обробки у СІР-мийці. Передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії невеликих об'ємів рідких відходів.*

2. Приготування і стерилізація розчинів для титрування. Етап передбачає підготовку 6 %-го розчину хлоридної кислоти, 6 %-го розчину гідроксиду натрію, 33 %-го та 1 %-го розчинів сульфатної кислоти, а також 50 %-го розчину етанолу. Розчини подаються для підкислення композиції Б до рН 4,5 з метою уникнення випадання в осад фосфорних і основних солей, регуляції рівня рН до 5,3 під час виробничого біосинтезу, дезінтеграції клітин, елюювання та осадження відповідно.

					НУХТ БТЕК 04.01.28 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Шовкань Д.О.			Розділ 10. Охорона довкілля	Літ.	Арк.
Перевір.		Стабніков В.П.					86
Консультант							98
Н. Контр.						Кафедра БТМ	
Затверд.		Пирог Т.П.					

Рідкі відходи на даному етапі виробництва можуть утворюватися лише у випадку невідповідності титрувальних розчинів нормативним показникам і рівню асептики. Так, *відходи титрувальних агентів не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.*

3. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу. На даному етапі існує можливість виявлення невідповідності сировини заявленим нормам із наступним її відбракуванням. Тверді відходи даного етапу представлені пакувальними матеріалами від сировини для приготування поживного середовища. Передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

4. Підготовка посівного матеріалу. Етап передбачає отримання і масштабування посівного матеріалу в інокуляторах. Зважаючи на те, посівний матеріал використовується для засіву ферментера і, як наслідок, виробничого біосинтезу, *відходи від посівного матеріалу не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.*

Варто зауважити, що культура-продуцент *Saccharomyces cerevisiae* GB Italy належить до облігатних аеробів, під час культивування необхідно забезпечити достатній рівень аерації поживного середовища. Відповідно, у процесі культивування виникає великий об'єм відпрацьованого повітря, що потребує доочистки. Так, передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*

5. Виробничий біосинтез. Даний етап передбачає отримання культуральної рідини, у якій накопичується цільовий продукт – глутатіон. Оскільки культуральна рідина далі надходить до збірника для виділення цільового продукту, рідкі відходи на даному етапі не враховуємо. Відпрацьоване повітря на виході з виробничого ферментера містить CO₂. Передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*

6. Виділення та очищення. На етапах виділення та очищення глутатіону уламки клітин видаляють за допомогою сепарації, а отже виникає необхідність утилізувати відділені уламки клітин.

Також звернути увагу необхідно на наявність етапу концентрування розчину шляхом зворотнього осмосу, де утворюється велика кількість пермеату. Велика кількість рідких відходів утвориться і на стадії іонообмінного виділення. Окрім цього, рідкі відходи утворюватимуться і на етапі відділення цільового продукту шляхом центрифугування. Враховуючи вищесказане, можна сказати, що *даний етап є місцем емісії великих об'ємів рідких відходів*.

7. Сушіння. Отримання сухого глутатіону відбувається шляхом сушіння отриманого раніше порошку у вакуум-сушарці. Сушіння відбувається за температури 100 °C до вмісту вологи 10 %. Зважаючи на невеликі об'єми виробництва, передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії невеликих об'ємів газоповітряних відходів*.

10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Біохімічне очищення стічних вод проводитиметься за допомогою мембранного біореактора. Мембранний біореактор поєднує в собі процеси мікрофільтрації та ультрафільтрації, а також процес аеробного біологічного очищення стічних вод. Мембрани служать в МБР в якості бар'єру, що дає можливість очищати воду від забруднень, які містяться в ній, з високою селективністю (високомолекулярні сполуки, що й потребує виробництво).

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Тверді відходи етапу санітарної підготовки виробництва і підготовки поживних середовищ представлені пакувальною тарою для мийних засобів і компонентів поживного середовища. Тара для мийних засобів виготовлена із поліетилену високої щільності HDPE-2, який піддається вторинній переробці. Вторинній переробці також піддається і поліпропілен PP, в якому приходять деякі компоненти поживного середовища (наприклад, глюкоза). А деякі інші компоненти поживного середовища поставляються в упаковці з полівініл хлориду PVC-3, який вважають важко піддається вторинній переробці і тому його заборонено утилізувати разом з іншими видами пластику. Так, окрім вищезгаданого, є компоненти які дозапаковують в сумки з алюмінієвої фольги, що теж перероблюються окремо.

Тож, для утилізації тари від миючих засобів і компонентів поживного середовища їх попередньо сортують і відправляють до пунктів прийому вторсировини.

10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Відпрацьоване очищене повітря після ферментації, яке містить вуглекислий газ, деякі дослідники [72] пропонують очищати за допомогою каталітичного окиснення. Для цього використовують марганцеві, мідно-хромові та такі, що містять метали платинової групи каталізатори. Отож, очищати відпрацьоване повітря після ферментації від надлишку CO_2 можемо за допомогою мідно-марганцевого каталізатору, ефективність поглинання якого 93 %.

10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Для зменшення об'ємів рідких відходів, а саме відпрацьованих миючих засобів, використовуватимемо СІР-мийку, яка дає можливість повторно використовувати мийний розчин після його фільтрування.

Необхідності зменшення твердих відходів, зважаючи на невеликі об'єми виробництва, немає. Проте, звертаючи увагу на поширення принципів відповідального споживання, усі необхідні компоненти закуповуватимемо оптом напряду від виробника, що дозволить зменшити кількість відходів пакувальних матеріалів.

Узагальнена інформація про знешкодження відходів виробництва наведена у табл. 10.1.

Знешкодження відходів виробництва

Назва складової	Речовини, які входять до складу	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва	Клас небезпеки	Спосіб знешкодження
Рідкі відходи				
«Біонол»	Алкілбензолсульфонат натрію	17,8 л	IV	Усереднення, очищення в мембранному біореакторі
«СВК-ДЕЗ-К-2»	Четвертинні амонійні сполуки – 15-30%, спирт ізопропіловий 5-15%)	8,9 л	IV	
Пермеат	-	1,1 м³	IV	
Промивна вода	-	4 м³	IV	
Фугат	Сліди етанолу	55,65 л	IV	
Тверді відходи				
Пластикові тару для мийних засобів	HDPE-2 – поліетилен високої щільності	0,1 кг	IV	Сортування, відправка на повторну переробку (до пунктів прийому вторсировини)
Упаковка для компонентів поживного середовища	HDPE-2 – поліетилен високої щільності, PP – поліпропілен, PVC-3 – полівініл хлорид, фольга	0,3 кг	IV	
Газоподібні відходи				
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ	8,64 м³	IV	Каталітичне окиснення

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
2. Li Y., Wei G., Chen J. Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 2004, 66(9): 233–242. doi:10.1007/s00253-004-1751-у
3. Lu S. C. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013, 1830(5): 3143–3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008
4. База даних PubChem – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutathione>
5. Бабак О.Я. Глутатион в нормі і при патології: біологічна роль і можливості клінічного застосування. *Здоров'я України.* 2015, (1):1-3.
6. Ubiyvovk V.M., Ananin V.M., Malyshev A.Y., Kang H.A., Sibirny A.A. Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *BMC Biotechnol.* 2011, 11(8). doi:10.1186/1472-6750-11-8
7. Kobayashi J., Sasaki D., Bamba T., Hasunuma T., Kondo A. Sustainable production of glutathione from lignocellulose-derived sugars using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 103(3): 1243–1254. doi:10.1007/s00253-018-9493-4
8. Fei L., Wang Y., Chen S. Improved glutathione production by gene expression in *Pichia pastoris*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2009, 32(6):729–735. doi:10.1007/s00449-009-0297-x
9. Rollini, M., Musatti, A., Manzoni, M. Production of glutathione in extracellular form by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry.* 2010, 45(4):441–445. doi:10.1016/j.procbio.2009.10.016
10. Wang M., Sun J., Xue F., Shang F., Wang Z., Tan T. The effect of intracellular amino acids on GSH production by high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011, 168(1):P.198–205. doi:10.1007/s12010-011-9435-4

11. Santos L. O., Alegre R. M., Garcia-Diego C., Cuellar J. Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. 2010, 45(8): 1362–1367. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.008
12. Халилова Э. А., Исламмагомедова Э. А., Котенко С. Ц., Абакарова А. А., Аливердиева Д. А. Морфолого-культуральные особенности клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* различной ploидности в условиях осмотического стресса. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2018, 20(2-1): 160-166. doi: 10.24411/1990-5378-2018-00012
13. Bekatorou A., Psarianos C., Koutinas A. Production of Food Grade Yeasts. *Food Technol. Biotechnol*. 2006, 44 (3): 407–415.
14. База даних MycoBank – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/97958>
15. ДССУ 2016: статистичний збірник «Заклади охорони здоров'я та захворюваність населення України у 2016 році», К.– 2018.
16. База даних «Аптека 1» – [Електронний ресурс] Режим доступу: https://apteka1.net/catalog/medikamenty/setrija_setria_kaps_30
17. Онлайн-магазин iHerb – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ua.iherb.com/c/L-Glutathione>
18. Кіотська енциклопедія генів та геномів: GLYCOLYSIS – [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00010
19. Кіотська енциклопедія генів та геномів: GLUTATHIONE METABOLISM – [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sce00480
20. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ. – 2009. – 336 с.
21. Инжиниринг и комплексные поставки биотехнологического оборудования. Промышленный ферментер 1000-2000 л для фармацевтики – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biotechno.ru/catalog/promyshlenniefementery/promyshlennyy-fermenter-1000-2000-l-dlya-farmatsevtiki/>
22. Соловйов С., Трохименко О., Костенко О., Дзюблик І. Пошук нових моделей тест-вірусів для підвищення ефективності експертної оцінки віруліцидної

дії дезінфікуючих засобів. *Сучасні аспекти військової медицини*. 2010, 16: 433-437 – [Електронний ресурс] Режим доступу: http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?C21COM=2&I21DBN=UJRN&P21DBN=UJRN&IMAGE_FILE_DOWNLOAD=1&Image_file_name=PDF/Savm_2010_16_78.pdf

23. Вакуліч. А., Курінна І., Харкута О. Основні тенденції та прогноз розвитку ринку миючих засобів в Україні. *Академічний огляд*. 2010, 2 (33): 147-151 – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://acadrev.duan.edu.ua/images/PDF/2010/2/22.pdf>

24. Державні санітарні правила для підприємств, що виробляють маргаринову та майонезну продукцію: ДСП 4.4.4.089-2002 – [Електронний ресурс] Режим доступу: http://search.ligazakon.ua/1_doc2.nsf/link1/ST001880.html

25. Державний реєстр дезінфекційних засобів станом на 2020 рік.

26. Каталог деззасобів Лагос – [Електронний ресурс] Режим доступу: https://lagos.com.ua/bionol_ua

27. Каталог деззасобів Лагос – [Електронний ресурс] Режим доступу: https://lagos.com.ua/delanol_ua

28. Касяненко О., Березовський А., Касяненко С., Долбоносова Р. Аналіз ринку дезінфікуючих засобів в Україні. *СНАУ*, 2019. doi: 10.36359/scivp.2019-20-2.56

29. Інструкція із застосування засобу дезінфікуючого СВК-ДЕЗ-К2 від 21 квітня 2020 р. № 0104/2020 – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://public.docs.openprocurement.org/get/f6eccf6c5cf346b4bd516d13c034273e?KeyID=52462340&Signature=I4RWV4SklesSrimLuhPHG5J274ZzIXV1twKdC%2FUQDZvreOy%2FGkT1lc%252BufMHGSJ88099oGE6nl2SiqVAolviFDg%253D%253D>

30. Рибалкін М. В. Визначення оптимального методу дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2014, 2(15): 71-75. – [Електронний ресурс] Режим доступу: http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/689/1/AP_1402_071-075.pdf

31. Шапхаев Э. Г., Цыренков В. Ж., Чебунина Е. И. Дезинтеграция клеток в биотехнологии – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2005. – 94 с.

32. Benedetti, A., Berardi, E., Manzoni, M., Nichele, M., et al. Process for producing glutathione. 2005, United States Patent 6902912 – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/US6902912B2/en>
33. Карлаш Ю. В., Омельчук Є. О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
34. Патент CN102286069B – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/CN102286069B/en>
35. Онлайн-каталог Lenntech – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Amberlite-IR-120-H-L.pdf>
36. Онлайн-каталог Lenntech – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Mitsubishi-DIAION-Catalogue.pdf>
37. Черевко О. І., Пеперечний А. М. Процеси і апарати харчових виробництв – Х.: Світ Книг, 2014. – 167 с.
38. Інтернет-магазин Made-in-China – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://yljbio.en.made-in-china.com/product/WZtJngqrqzVU/China-Pharmaceutical-Grade-Wholesale-Price-Glutathione-Powder-Medical-Grade.html>
39. Інтернет-магазин NEW FILTER – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/panelni-ramkovi-filtri-do-ventilyatsiyi.html>
40. Онлайн-каталог INTERTOOL – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ua.intertool.ua/catalog/kompressori/kompressori-porshnevie/>
41. Інтернет-магазин 7-VZ – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://7-vz.com.ua/category/ohladiteli-vozdusha-jhcool/>
42. Інтернет-магазин LETISS – [Електронний ресурс] Режим доступу: https://letiss.com.ua/aircast-remeza-resiveri/vozdushniy_vertikalniy_resiver_rv_500_1100
43. Інтернет-магазин BSX – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://bsx.com.ua/ua/cabels/vzryvozashhishhennye-elektricheskie-obogrevateli-vozdusha-fx5/>

44. Интернет-магазин SWEDA – [Электронный ресурс] Режим доступа:
<https://sweda.com.ua/produktsiya/dozator-dlia-legko-sypuchikh-tekuchikh-materialov/>
45. Онлайн-каталог БИОТЕХНО – [Электронный ресурс] Режим доступа:
<https://biotechno.ru/catalog/emkosti-i-rezervuary/emkosti-na-zakaz/>
46. Онлайн-каталог Мир насосов – [Электронный ресурс] Режим доступа:
https://mir-nasosov.com.ua/sites/default/files/1_1.pdf
47. Онлайн-каталог БИОТЕХНО – [Электронный ресурс] Режим доступа:
<https://biotechno.ru/catalog/pilotnaya-fermentatsiya/reaktor-s-meshalkoy-50-l/>
48. Онлайн-каталог BTS Engineering – [Электронный ресурс] Режим доступа:
https://bts.net.ua/membrane_filter/
49. Интернет-магазин NEW FILTER – [Электронный ресурс] Режим доступа:
<https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/hepa-filtri-dlya-sistem-ventilyatsiyi.html>
50. Онлайн-каталог БИОТЕХНО – [Электронный ресурс] Режим доступа:
<https://biotechno.ru/catalog/bioreaktory-laboratornye/laboratornyy-bioreaktor-pro-lab-s-dvumya-kulturalnymi-sosudami-obemom-7-12-l/>
51. Онлайн-каталог БИОТЕХНО – [Электронный ресурс] Режим доступа:
<https://biotechno.ru/catalog/pilotnie-fermentery/pilotnyy-fermenter-biotechno-obemom-50-150-l/>
52. Онлайн-каталог БИОТЕХНО – [Электронный ресурс] Режим доступа:
<https://biotechno.ru/farm/emkosti-i-rezervuary/peredvizhnoy-reaktor-s-sistemami-cip-sip-obem-200-l/>
53. Онлайн-каталог БИОТЕХНО – [Электронный ресурс] Режим доступа:
<https://biotechno.ru/catalog/fermentery/promyshlenny-fermenter-1000-2000-l-dlya-farmatsevtiki/>
54. Интернет-магазин Пром – [Электронный ресурс] Режим доступа:
<https://prom.ua/p941168498-reaktor-himicheskij-steklyannyj.html?&primelead=MS4yNQ>
55. Онлайн-каталог БИОТЕХНО – [Электронный ресурс] Режим доступа:
<https://biotechno.ru/catalog/emkosti-i-rezervuary/reaktor-s-meshalkoy-1000-l/>
56. Интернет-магазин IN-GREEN – [Электронный ресурс] Режим доступа:
[https://in-green.com.ua/gardena/gardena-\(01490-2000000\)](https://in-green.com.ua/gardena/gardena-(01490-2000000))

57. Онлайн-каталог БИОТЕХНО – [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/pilotnye/separator-biotechno-s-barabanom-btux-305/>
58. Интернет-магазин ECOSOFT – [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://ecosoft.ua/ua/kommercheskaya-sistema-obratnogo-osmosa-ecosoft-mo-5000/>
59. Онлайн-каталог SMT, Inc. – [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://separationmethods.com/product-category/ion-exchange-columns/scx-columns/>
60. Онлайн-каталог SMT, Inc. – [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://separationmethods.com/product-category/ion-exchange-columns/wcx-o-columns/>
61. Онлайн-каталог Реаторг – [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.reatorg.ru/upload/iblock/815/katalog-reatorg-2017_fin.pdf
62. Онлайн-каталог BIORUS – [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/vysokoskorostnye-centrifugi-koki-holdings/vyisokoskorostnaya-czentrifuga-s-oxlazhdeniem-himac-cr22n.html>
63. Интернет-магазин ГК ЕВРОХИММАШ К.О. – [Электронный ресурс] Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ru/druk_filtr_ru.php
64. Интернет-магазин ХИМТЕСТ Україна+ – [Электронный ресурс] Режим доступа: https://chemtest.com.ua/ua/sushilnye_shkafy_cp30-c
65. Интернет-магазин ХИМТЕСТ Україна+ – [Электронный ресурс] Режим доступа: https://chemtest.com.ua/laboratornaya_molotkovaya_melnica_perten_instruments_lm_1_20
66. UCDavis. Microscopy for the winery – [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/microscopy>
67. Rollini M., Manzoni M. Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochemistry. 2006, 41(7): 1501–1505. doi:10.1016/j.procbio.2006.02.011
68. Ле Ань Туан. Применение психротолерантных дрожжей для биоконверсии вторичных ресурсов переработки растительного сырья: Автореф. Дис. канд. тех. наук. Казань, 2016. 167 с.

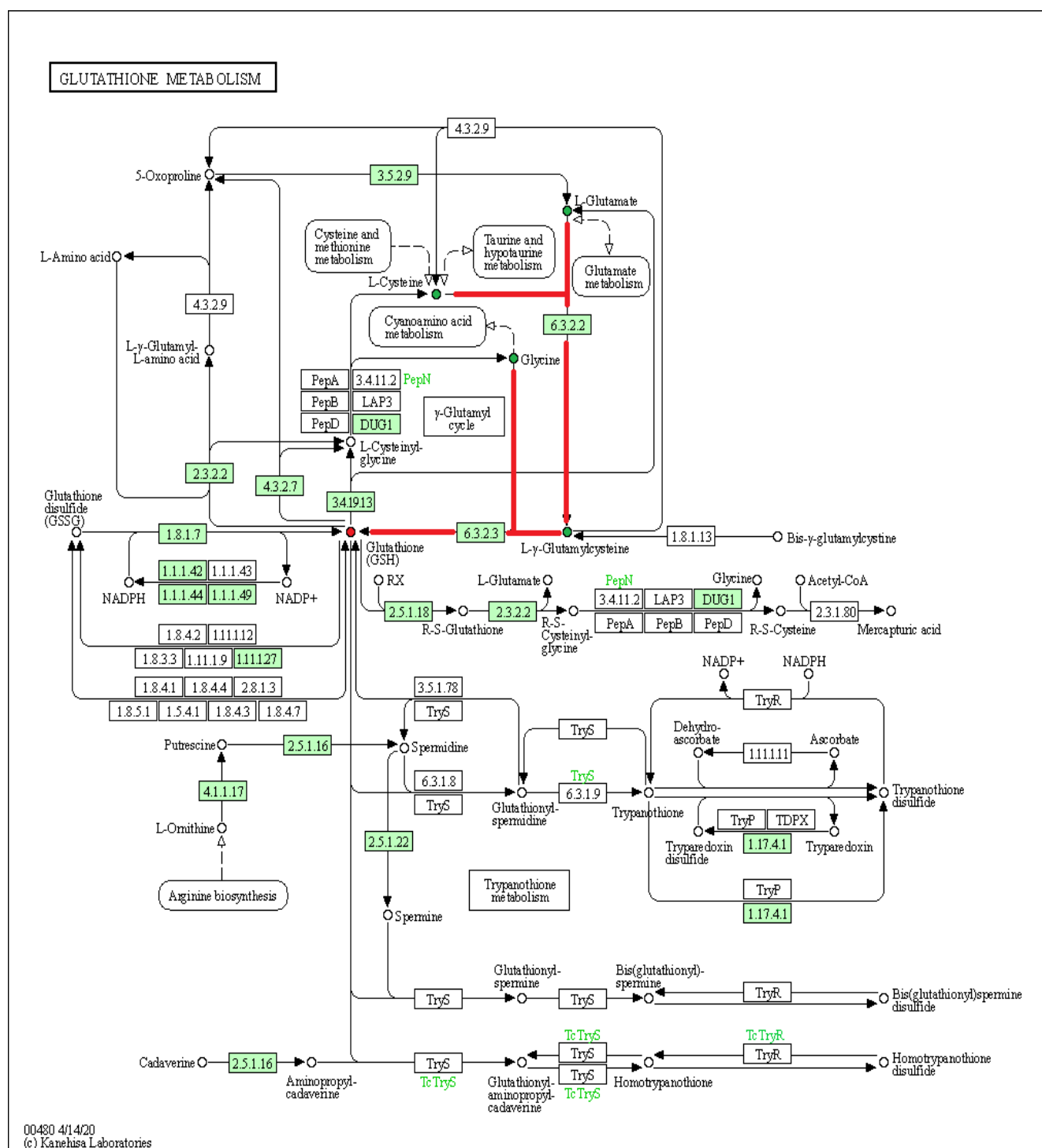
69. Лившиц Н.А., Бутакова Н.В., Счастлива Н.В. Роль микроорганизмов в функционировании живых систем: фундаментальные проблемы и биоинженерные приложения. Издательство СО РАН. – 2010. – 475 с.

70. Glutathione. EUROPEAN PHARMACOPEIA 6.0 – [Электронный ресурс]
Режим доступа: <http://www.uspbpep.com/ep60/glutathione%201670e.pdf>

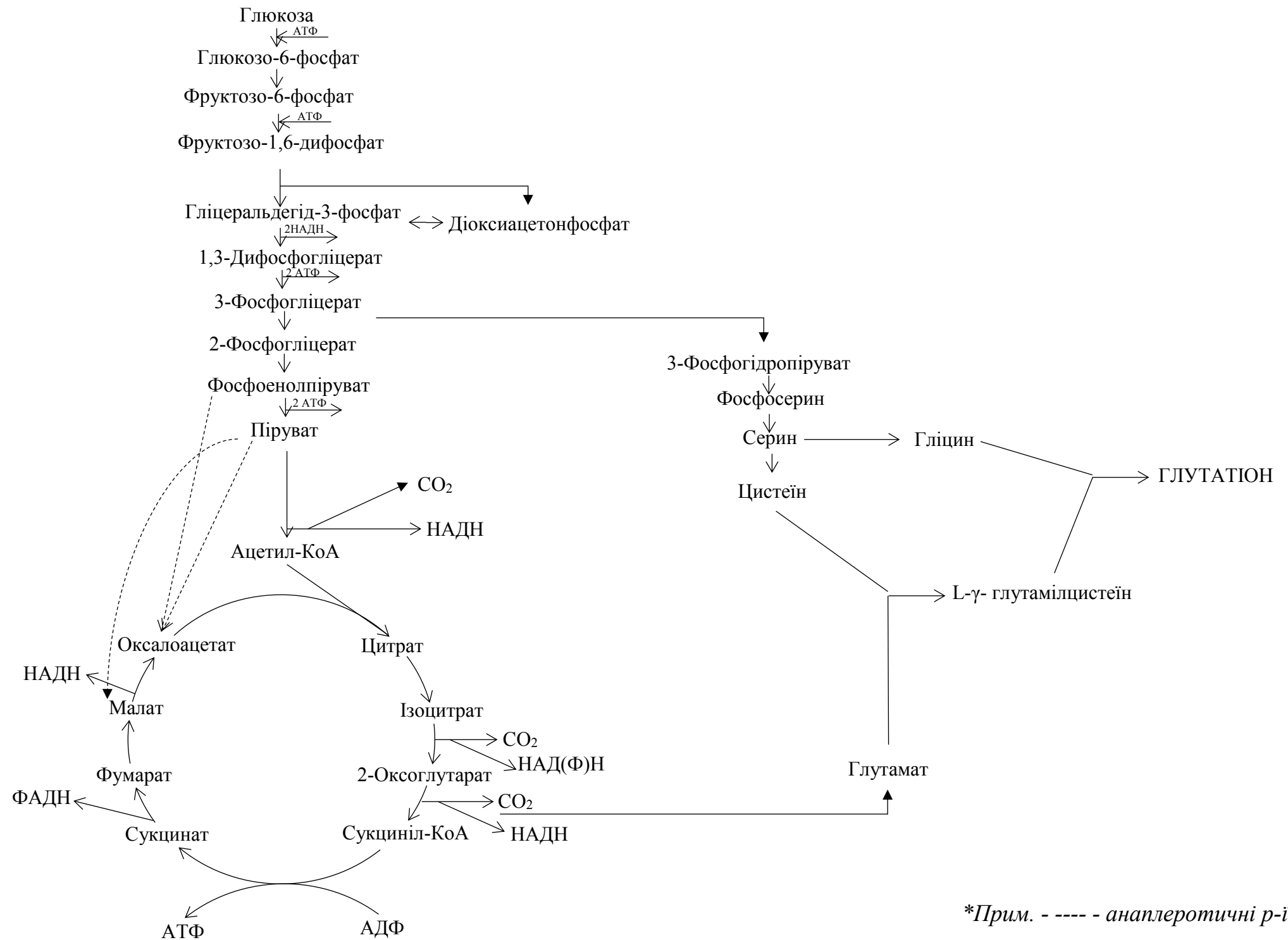
71. Алексеева К. А., Писарев Д. И., Новиков О. О., Малютина А. Ю. Разработка методики предколоночной дериватизации глутатиона восстановленного 4-метокси-2-нитрофенилизотиоционатом для определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Pharmacy&Pharmacology* 2018, 6(3): 229-239. doi:10.19163/2307-9266-2018-6-3-229-240

72. Джигола Л. А., Тихонова К. С., Реснянская А. С. Новая каталитическая система для очистки воздуха от монооксида углерода. *Natural Sciences*. 2017, 1(58): 98-101

Додаток 1. Схема біосинтезу глутатіону, що представлена в KEGG



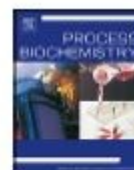
Додаток 2. Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт





Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbioProduction of glutathione in extracellular form by *Saccharomyces cerevisiae*

Manuela Rollini*, Alida Musatti, Matilde Manzoni

DiSIAM, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università degli Studi, Via G. Celoria 2, 20133 Milano, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2009

Received in revised form 14 September 2009

Accepted 23 October 2009

Keywords:

Glutathione

Saccharomyces cerevisiae

Extracellular metabolite

Cell permeabilization

Baker's yeast

Extracellular release

ABSTRACT

The present research was aimed at inducing, in a post fermentative procedure (biotransformation) and by modifying cell permeability, glutathione (GSH) accumulation and subsequent release from cells of *Saccharomyces cerevisiae*. With the aim of limiting process costs, research considered the possibility of employing baker's yeasts (*S. cerevisiae*), inexpensive cells source available on the market, in comparison with a collection strain. The tested yeasts showed different sensitivity to the chemical/physical treatments performed to alter cell permeability. Modest effects were evidenced with Triton, active only on Zeus yeast samples (1.7 g GSH/l, near 60% of which in extracellular form). Lauroyl sarcosine showed an interesting action on GB Italy sample (2.8 g GSH/l, near 80% extracellular). Lyophilization evidenced good performance with Lievitalia yeast strain (2.9 g GSH/l, 90% extracellular). The possibility of obtaining GSH directly in extracellular form represents an interesting opportunity of reducing GSH production cost and furthering the range of application of this molecule.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2.1. Microorganisms

For GSH production *S. cerevisiae* NCYC 2959 (National Collection of Yeast Cultures, Aberdeen, UK) was comparatively employed together with three *S. cerevisiae* commercial baker's yeast in compressed form (GB Italy, Lievitalia Spa and Zeus Industria Biologica Alimentare SpA).

As regards *S. cerevisiae* NCYC2959, cells were pre-grown in MEB culture medium, having the following composition (g/l): malt extract 20 (Costantino, Turin), soybean peptone (Costantino, Turin) 1, glucose 20, pH adjusted to 5.8, sterilization at 118 °C for 20 min. Cells production was carried out in 1000 ml Erlenmeyer flasks, each containing 100 ml of the culture medium MEB. Cultures were inoculated (10%, v/v) with a 24 h-old culture prepared in the same medium, and then incubated at 28 °C on an alternative shaker (60 rpm, 4 cm run) for 48 h. The obtained culture was centrifuged at 10,600 × g for 10 min. Supernatant was discharged and separated cells were washed twice with distilled water and subsequently employed in biotransformation trials, after having determined cell dry weight.

2.2. Biotransformation conditions

Cells were suspended (10% dry weight) in a reaction solution having the following composition (g/l): glucose 80, sodium citrate 10, cysteine 4, glycine 4, ammonium sulphate 7, KH₂PO₄ 3.5, magnesium sulphate 0.5, pH 5.3, tap water. Biotransformation trials were carried in 1000 ml Erlenmeyer flasks, each containing 100 ml reaction mixture, incubated at 28 °C on an alternative shaker (60 rpm, 4 cm run). Experiments involving modified cell permeability were performed by adding to the reaction mixture (0.2–0.5 g/l) CTAB, Digitonin, Mega 10, octyl-glucoside, Tweens (20, 40 and 80), Triton-X 100 and lauroyl sarcosine (Sigma), for comparison purposes. Lyophilization was carried out as follows: yeast cells were suspended in distilled water (20% dw), placed in stainless steel trays as a thin layer, and then frozen at –40 °C for 4 h; cell disidration phase was carried out at 25 °C and 1.33 Pa for 30 h (Edwards Minifast MFD 01, UK) (maximum residual humidity 5–8% dw).

2.3. Analytical procedures

Intracellular GSH was determined according to Rollini and Manzoni [12]. Samples at different incubation time were centrifuged (10,600 × g, 6 min), and obtained cells were washed twice with H₂O, then thermally treated at 100 °C for 12 min. After cooling in ice bath, samples were centrifuged (15,300 × g, 15 min) and, on obtained supernatant fractions, intracellular GSH was evaluated. Extracellular GSH was directly determined on supernatants obtained from cell-culture separation, the first centrifugation step. GSH identification and quantification were carried out by HPLC, equipped with a UV detector (210 nm), at 30 °C using a (250 × 4) mm Purospher RP-18 endcapped column (Merck), eluted with 25 mM NaH₂PO₄, pH 3.5, at 0.3 ml/min. Standard GSH (reduced form) and GSSG (oxidized form) were purchased by Sigma.

Lievitalia	24	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1
	48	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0
Zeus	24	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.3	0.2 ± 0.1
	48	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2	0.1 ± 0.1

and glycine, as GSH precursors, glucose as energy source, and ammonium and magnesium salts [13,16]. Table 1 reports intracellular, extracellular and total GSH levels (g/l) obtained at 24 and 48 h incubation. No GSSG production was observed, and GSH present in samples resulted stable in the reaction conditions as well as during the permeabilization procedure and subsequent analysis. Samples pH was always found in the range between 4.5 and 5.5, without any correlation with GSH accumulation. To evaluate the equilibrium between intra- and extracellular GSH forms, intracellular levels were expressed as concentration (g GSH/l biotransformation solution) and not as content percent of dry cell weight, as usually reported in the literature.

In these trials GSH, as expected, was mainly found as intracellular metabolite at interesting levels in all yeast samples. Trials carried out by suspending cells in a solution not containing the precursor aminoacids (cysteine and glycine) evidenced that intracellular GSH remained at stable low levels during incubation (0.2–0.3 g/l, data not shown). Extracellular GSH was always found in the range 0–0.2 g/l, thus confirming its intracellular physiological nature. The best results were obtained at 24 h reaction with GB Italy compressed baker's yeast (1.4 g/l, corresponding to 2.8% dw, 0.06 g/l h productivity), and at 48 h with Zeus (1.7 g/l, 3.4% dw, 0.02 g/l h productivity). For the reference collection *S. cerevisiae* strain, yields of 0.7–0.8 g GSH/l with the highest values for intracellular form, 0.03–0.06 g/l h at 24 h, to decrease to 0.004–0.02 g/l h from 24 to 48 h.

Results obtained in this phase were considered as reference data, and used to evaluate GSH release from cells.

3.2. Extracellular GSH production

The addition of surface-active agents to the reaction solution



US006902912B2

(12) **United States Patent**
Benedetti et al.(10) **Patent No.:** **US 6,902,912 B2**
(45) **Date of Patent:** **Jun. 7, 2005**(54) **PROCESS FOR PRODUCING GLUTATHIONE**

OTHER PUBLICATIONS

(75) Inventors: **Alberto Benedetti**, Cernusco sul Naviglio (IT); **Enrico Giuseppe Roberto Berardi**, Orosei (IT); **Matilde Manzoni**, Segrate+Milan (IT); **Marina Nichele**, Vanzaghella (IT); **Hermes Pagani**, Sesto San Giovanni (IT); **Manuela Rollini**, Corsico (IT)(73) Assignee: **Gnosis Srl**, Cairate (IT)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **10/609,561**(22) Filed: **Jul. 1, 2003**(65) **Prior Publication Data**

US 2004/0048337 A1 Mar. 11, 2004

content of cell extracts, obtained by re-suspending the cell in 1 ml perchloric acid, adding 0.5 g glass beads (Sigma #G-9268), stirring 1 min $\times$ 3, precipitating the solid phase by centrifugation, and pipetting on the extract, according to the method of Akerboom and Sies "Methods in enzymology", vol. 27, pp.373-384, 1981, Academic Press Inc.

Table 1 shows some significant results obtained with the five cultures, expressed as percentage of the weight levels per unit biomass.

C. Alfafara, et al., Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 37, No. 2, XP-001032594, pp. 141-146, "Cysteine Addition Strategy for Maximum Glutathione Production in Fed-Batch Culture of *Saccharomyces cerevisiae*", 1992.

C. G. Alfafara, et al., Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 36, No. 4, XP-008012042, pp. 538-540, "Effect of Amino Acids on Glutathione Production by *Saccharomyces cerevisiae*", 1992.

G. R. Willsky, et al., Journal of Cellular Biochemistry-Supplement, No. 21A, XP-002179477, p. 251, "Vanadate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*", 1995.

H. Shimizu, et al., Biotechnology and Bioengineering, vol. 38, XP-002179478, pp. 196-205, "Optimal Production of Glutathione by Controlling the Specific Growth Rate of Yeast in Fed-Batch Culture", 1991.

Derwent Publications, AN 1986-078827, XP-002179483, JP 61-027999, Feb. 7, 1986.

Derwent Publications, AN 1974-42553V, XP-002179481, JP 49-014680, Feb. 8, 1974.

Derwent Publications, AN 1978-11596A, XP-002179480, JP 52-156994, Dec. 27, 1977.

* cited by examiner

Stage 8

The biomass obtained from the previous stage was re-suspended in demineralised water to a concentration of 7 g/l (biomass dry weight). 10 liters of this concentrated biomass suspension (CoBS) were permeabilised using a combination of low pH (1-6.5, with concentrated H₂SO₄) and high temperature (75° C. $\times$ 3 min). The biomass was then removed by filtration (0.2 mm ceramic membranes), and the GSH containing solution was concentrated by reverse osmosis so as to reach about 6 g/l GSH.

US 6,902,912 B2

9

Tab. 3 summarizes the GSH yields (%) obtained at various pH, using the aforementioned CoBS.

TABLE 3

pH	6.5	5	4	3	1.5
E. 1	0.50	0.55	0.61	0.68	0.98
E. 2	0.48	0.52	0.58	0.72	1.02
E. 3	0.42	0.49	0.64	0.73	0.95

E. = Experiment

These tests show that, under the conditions employed, cell permeabilisation is favoured by low pHs.

Stage 9

The purification of GSH was achieved by percolating 1 l of the concentrated GSH solution (about 6 g/l) in a column packed with Amberlite (1 l, IR120H), at a flow rate of 1 BV/h. 30 BV of demineralised water are then applied to wash the resin, before eluting the GSH with 1% H₂SO₄. 6 l of the resulting eluates are concentrated to 5 l by reverse osmosis, yielding about 85% of the initial GSH.

Stage 10

The concentrated eluates were percolated in a column packed with 1 l of non-ionic porous resin i.e. SP207 (Resindion, Mitsubishi), previously regenerated at 1 BV/h. GSH was then eluted with water, and fractions 2 to 9 were collected. The GSH aqueous solution thus obtained was concentrated to 500 g/l. GSH was finally precipitated by a 50% ethanol solution. 4 g of white crystalline powder was obtained, with 98% GSH content.

10

other two media; also the relative final yields, which differ considerably among the three media, show that B allows to obtain the best results.

Stage 2

Biomass obtained from the previous stage was collected by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min (5° C.), washed twice with deionized water and re-suspended to 7% concentration (dry biomass, w/v) in the following solution (g/l):

Glucose	82
Sodium tetrates	10
Adenine	4
Cysteine	4
Methionine	3.5
KH ₂ PO ₄	3.5

The "biomass activation" process was then started in a 3 l fermenter for 24 h, with the following operating conditions: agitation speed, 500 rpm; aeration rate, 3 vvm; temperature, 28° C.

Table 5 summarizes the GSH yields of four activation experiments, employing biomass obtained either in B medium, or in YPG medium.

TABLE 5

E.	Fermentation medium	GSH Yield (% of dry biomass)	
		Before activation	After activation