

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан факультету)

_____ Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

« ___ » лютого 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ Віктор СТАБНИКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« ___ » лютого 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

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

на тему: Біосинтез аргініну *Brevibacterium flavum*

Виконала: здобувачка V курсу, групи 1

_____ МИЛОБОГ Кристина Олегівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

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

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Я як здобувачка Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

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

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ
« 30 » жовтня 2023 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МИЛОБОГ Кристини Олегівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез аргініну *Brevibacterium flavum*

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023 року № 915-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 29.01.2024

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Brevibacterium flavum*, цільовий
продукт: аргінін, об'єм ферментера 3 м³, коефіцієнт заповнення – 0,6.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика
біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору
технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль
виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу ергостерину - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу ергостерину - 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>30.10.2023 – 10.11.2023</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>11.11.2023 – 21.11.2023</i>	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>22.11.2023 – 02.12.2023</i>	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	<i>03.12.2023 – 11.12.2023</i>	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>12.12.2023 – 21.12.2023</i>	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>22.12.2023 – 05.01.2024</i>	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>06.01.2024 – 11.01.2024</i>	
8.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>12.01.2024 – 16.01.2024</i>	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>17.01.2024 – 22.01.2024</i>	

Здобувач _____
(підпис)

Кристина МИЛОБОГ _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Тетяна СУЛЕЙКО _____
(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	8
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА 10	
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	10
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	14
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	16
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	17
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	18
3.1. Потреба у цільовому продукті	18
3.2. Розрахунок потужності виробництва	19
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і геометричного об'єму ферментера	20
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	21
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	23
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	23
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	25
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	26
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	26
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	27
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	28
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	31
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	32
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	34
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	44
8.1. Карта постадійного контролю.....	44
8.2. Мікробіологічний контроль	46
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	47
8.3.1. Концентрація біомаси	47
8.3.2. Концентрація цільового продукту	48
8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	48
8.4. Показники якості готового продукту	49
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	51
РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	54
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	54
10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	55
10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	55
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	56
10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів	56
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів	57
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	58
ДОДАТКИ	62

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню ділянки виробничого біосинтезу отримання амінокислоти аргінін за використання бактеріального штаму *Brevibacterium flavum*, який синтезує на середовищі з глюкози 40 г/л цільового продукту. Аргінін - це одна з 20 основних амінокислот, які входять до складу білків та виконують різноманітні функції в організмі людини. Розрахована потужність його виробництва становить 47,3 м³ культуральної рідини. Робота включає в себе вступ, десять розділів, графічні частини (2 креслення формату А1) та список використаних джерел із 40 найменувань.

Загальний об'єм пояснювальної записки – 64 сторінок, 7 рисунків, 12 таблиць, 2 додатки, 2 креслення формату А1.

Під час написання вступу було проаналізовано інформацію про амінокислоти, їх функціональне призначення та особливості хімічного та біотехнологічного синтезу. У ході роботи було обґрунтовано використання *Brevibacterium flavum*, що володіє найвищою синтезувальною, та умов його культивування.

Технологічний процес складається з допоміжних (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, підживлюючого розчину глюкози та запасного розчину вітамінів для виробничого біосинтезу та ін.) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 3м³ із коефіцієнтом заповнення 0,6).

Технологічна схема біосинтезу аргініну представлена у графічній частині проекту на 1 аркуші формату А1.

Ключові слова: аргінін, амінокислоти, штам-продуцент, бактерія *Brevibacterium flavum* НК1009, глюкоза, біосинтез.

ВСТУП

Амінокислоти є основою всіх природних білків і найважливішим компонентом їжі людини та кормів для тварин. Фізіологічна важливість амінокислот різна. Деякі амінокислоти не синтезуються організмом людини або тварини в достатніх пропорціях і в необхідних кількостях. Вони називаються незамінними амінокислотами. До них належать валін, аргінін, гістидин, лізин, лейцин, ізолейцин, метіонін, треонін, триптофан і фенілаланін. Інші синтезуються в організмі: аспарагін, пролін, аланін, глютамінова кислота, серин, тирозин, цистин і цистеїн.

У цій статті розглядаються можливі методи виділення та очищення амінокислоти аргініну.

Препарати на основі цієї амінокислоти широко застосовують у складі комплексних схем лікування хронічного гепатиту, серцево-судинних захворювань, діабету II типу, непереносимості глюкози та багатьох інших захворювань. Вони також використовуються як харчові добавки для поліпшення здоров'я і підвищення ефективності тренувань у спортсменів.

Основною вимогою для виробництва таких препаратів є висока якість сировини. Оскільки в Україні аргінін дуже мало виробляється, а сировина закупається з-за кордону, що автоматично підвищує ціни на ліки та зменшує їх постачання пацієнтам, завданням роботи було розробити схему виробництва субстанцій аргініну.

Одним із можливих підходів для одержання аргініну є культивування *Brevibacterium flavum*. Цей вид бактерій володіє здатністю синтезувати аргінін з доступних нутрієнтів. *Brevibacterium flavum* є грам-позитивною бактерією, яка зустрічається в різних природних середовищах, зокрема в ґрунті та ґрунтових водах.

Мета даного дослідження полягає в вивченні можливості культивування *Brevibacterium flavum* для одержання аргініну. Це передбачає встановлення

					НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Милобог К.О.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				1	64
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
ВСТУП							

оптимальних умов середовища для росту та розвитку бактерії, а також оптимізацію процесу синтезу аргініну.

Виходячи з мети можна окреслити наступні **завдання класифікаційної роботи**. Вибір та підготовка культури *Brevibacterium flavum* для культивування. Оптимальні фізико-хімічні умови (температура, рН, концентрація поживних речовин) для росту та синтезу аргініну. Методи виявлення та кількісного визначення аргініну у культурі *Brevibacterium flavum*. Оптимізація процесу культивування для забезпечення максимального виходу аргініну.

Новизна роботи. Новизна даної роботи полягає у використанні штаму *Brevibacterium flavum* НК1009. Цей штам продукує 55,5 г/л амінокислот в результаті біосинтезу [1].

					НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Милобог К.О.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					1	64
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

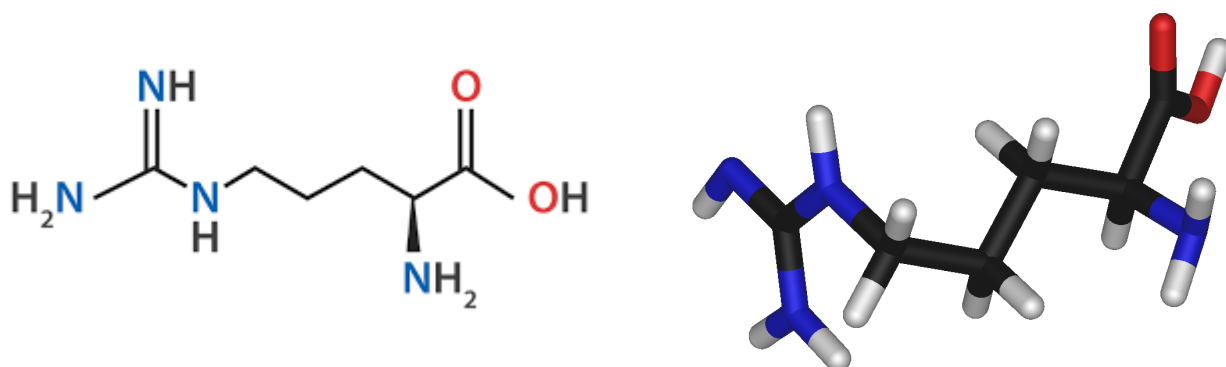


Рис.1.1. Структурна формула аргініну

Аргінін (2-аміно-5-гуанідин-пентанова кислота або α -аміно- δ -гуанідил- n -валеріанова кислота) - білі кристали без запаху.

Фізико-хімічні властивості: загальна формула C₆H₁₄N₄O₂, молярна маса 174 г/моль, температура плавлення 260°C, температура кипіння 368°C. Ця амінокислота має густину 14,87 г/100 мл (20°C), добре розчинна у воді, мало розчинна в етанолі та нерозчинна в етиловому ефірі. Аргінін - незамінна амінокислота, яка входить до складу багатьох білків і пептидів, особливо гістонів (білків з двома основними функціями: регулювання транскрипції та трансляції та приймають участь в упакуванні ниток ДНК).

Застосування: Аргінін відіграє дуже важливу роль в організмі людини. Насамперед він слугує субстратом для синтезу оксиду азоту - вільнорадикальної сполуки, яка знищує пухлинні клітини, затримує розвиток остеопорозу і ущільненню кісток.

Аргінін також виконує імунну функцію в організмі. Він бере участь в утворенні антитіл і Т-лімфоцитів, підвищує антимікробну активність нейтрофілів і збільшує вміст гормону росту в крові. Аргінін підвищує секрецію інсуліну і стимулює вивільнення гістаміну, який сприяє звуженню судин. Він сприяє

					НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Милобог К.О.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				1	64
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту		

нейтралізації аміаку в печінці, полегшує перетворення аміаку на сечовину і зв'язує токсичні іони амонію, які утворюються під час катаболізму білків [26].

Симптоми дефіциту аргініну є підвищений артеріальний тиск, погіршення роботи мозку, ризик розвитку діабету та передчасного старіння. І навпаки, надлишок цієї амінокислоти в організмі може призвести тремтіння кінцівок, низького кров'яного тиску та дратівливості.

Аргінін доступний в аптеках у вигляді розчину для ін'єкцій та капсул. Розчин для ін'єкцій застосовується:

- печінкова енцефалопатія, прекома та кома з гіперамоніємією;
- гостра алкогольна інтоксикація від помірного до важкого ступеня, включаючи енцефалопатію та кому. Постотруєння внаслідок вживання алкоголю;
- ускладнення 3-го триместру вагітності: пізній гестоз, включаючи ускладнені форми пізніх термінів вагітності, фетоплацентарну недостатність і стани, пов'язані з гіперамоніємією;
- комплексне лікування гострих і хронічних гепатитів різної етіології: отруєння гепатотоксичними речовинами (хімічні речовини, лікарські засоби), цироз печінки, лептоспіроз (включаючи стани з гіперамоніємією).

Протипоказання. Підвищена чутливість до діючої речовини або інших компонентів препарату та лихоманка. Аргінін в капсулах застосовують як дієтичну добавку з наступною метою:

- підтримка нормального рівня артеріального тиску;
- серцево-судинні захворювання;
- зниження в крові рівня холестерину;
- поліпшення коронарної мікроциркуляції;
- підтримка імунної системи;
- концентрація сперматозоїдів у чоловічій спермі;
- прискорює загоєння виразок, ран, опіків і переломів;
- секреція гормонів росту та інсуліноподібних факторів росту.

Цей продукт не є фармацевтичним препаратом [27].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Вибір біологічних агентів для виробництва аргініну має вирішальне значення для ефективного та рентабельного виробничого процесу. У цьому дослідженні буде розглянуто можливість використання мікроорганізмів, здатних виробляти аргінін з найвищою продуктивністю та ефективністю.

Аргінін - одна з 20 амінокислот, що входять до складу білків, і важливий проміжний продукт обміну речовин в організмі людини. Оскільки аргінін не може самостійно вироблятися в організмі, він має бути отриманий з зовнішніх джерел. Тому його виробляють спеціальними методами. Одним зі способів використання різних мікроорганізмів для отримання аргініну є застосування мікробіологічного синтезу амінокислот через використання ауксотрофних мутантних штамів.

Таблиця 2.1.1

Порівняльна характеристика продуцентів аргініну

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Процес
<i>Brevibacterium flavum HX0901</i>	Глюкоза – 120 Кукур.екстракт – 25 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 50 KH ₂ PO ₄ – 1,5 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5 FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,02 MnSO ₄ ×5H ₂ O – 0,02 Біотин – 0,00008 L-гістидин – 0,0005 CaCO ₃ – 30	22,3	72	pH=7,0-7,2 t=30 850 об/хв

					НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Милобог К.О.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					1	64
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

<i>Escherichia coli</i>	Глюкоза – 100 Сульфату амонію – 9 KH ₂ PO ₄ – 1 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,4 FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,02 MnSO ₄ ×5H ₂ O – 2 Тіамін – 0,4 L-ізолейцин – 0,3	19,3	42	pH=7,0 t=32 700 об/хв
<i>Brevibacterium flavum НК-19А</i>	Сахароза – 150 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 45 KH ₂ PO ₄ – 4 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 2 FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,01 MnSO ₄ ×5H ₂ O – 0,01 СаСО ₃ – 50 Тіамін – 0,0003 Біотин – 0,0003 L-ізолейцин – 0,0002	13	72	pH=7,6 t=30 230 об/хв
<i>Brevibacterium flavum НК1009</i>	Глюкоза – 100 Сечовина – 1 Кукур.екстракт – 25 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 40 KH ₂ PO ₄ – 1,1 K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O – 0,5 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5 Біотин – 0,00005 L-гістидин – 0,001 Тіамін гідрохлорид – 0,0002	55,5	66	pH=7,08 t=30-31 230 об/хв

На основі даних, наведених у таблиці 2.1.1, можна прийти до висновку, що штам *Brevibacterium flavum НК1009* проявляє вищий потенціал у порівнянні з іншими штамми для можливого використання. Завдяки своїй високій здатності до синтезу аргініну, а також наявності достатньої кількості вуглецю в поживному середовищі, спостерігається надсинтез аргініну. Крім вуглецю, поживне середовище містить також додаткові фактори, які стимулюють ріст. Щоб переконатись у економічній доцільності обраного штаму *Brevibacterium flavum НК1009*, потрібно знати вартість поживного середовища. Тому у таблиці 2.1.2 наведена вартість всіх поживних середовищ.

Вартість поживного середовища продуцентів аргініну

Біологічний агент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6
<i>Brevibacterium flavum HX0901</i>	Глюкоза	120	51	6,12	11
	Кукур.екстракт	25	25	0,625	15
	(NH ₄) ₂ SO ₄	50	32	1,6	8
	KH ₂ PO ₄	1,5	65	0,0975	10
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	20	0,01	9
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,02	65	0,0013	12
	MnSO ₄ ×5H ₂ O	0,02	30	0,0006	5
	Біотин	0,00008	6352,53	0,0005	14
	L-гістидин	0,0005	162,25	0,00008	3
	CaCO ₃	30	5,20	0,156	7
Вартість 1 л середовища – 7,10 грн.					
<i>Escherichia coli</i>	Глюкоза	100	51	5,1	11
	(NH ₄) ₂ SO ₄	9	32	0,288	8
	KH ₂ PO ₄	1	65	0,065	10
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	20	0,008	9
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,02	65	0,0013	12
	MnSO ₄ ×5H ₂ O	2	30	0,06	5
	Тіамін	0,4	1848	0,7392	13
	L-ізолейцин	0,3	670	0,201	2
Вартість 1 л середовища – 6,46 грн.					
<i>Brevibacterium flavum HK-19A</i>	Сахароза	150	90	13,5	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	45	32	1,44	8
	KH ₂ PO ₄	4	65	0,26	10
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	2	20	0,04	9
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	65	0,00065	12
	MnSO ₄ ×5H ₂ O	0,01	30	0,0003	5
	CaCO ₃	50	5,20	0,26	7
	Тіамін	0,0003	1848	0,0006	13
	Біотин	0,0003	6352,53	0,002	14
	L-ізолейцин	0,0002	670	0,0001	2
Вартість 1 л середовища – 15,5 грн.					
<i>Brevibacterium flavum HK1009</i>	Глюкоза	100	51	5,1	11
	Сечовина	1	45	0,045	6
	Кукур.екстракт	25	25	0,625	15
	(NH ₄) ₂ SO ₄	40	32	1,28	8
	KH ₂ PO ₄	1,1	65	0,0715	10
	K ₂ HPO ₄	0,5	131	0,0655	4

	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	20	0,01	9
	Біотин	0,00005	6352,53	0,0003	14
	L-гістидин	0,001	162,25	0,0002	3
	Тіамін	0,0002	1848	0,0004	13
Вартість 1 л середовища – 7,19 грн.					

- <https://www.covalent.com.ua/ru/shop/sucrose/>
- <https://flagma.ua/izoleycin-o9357832.html>
- <https://prom.ua/p1811987171-gistidin-gidrohlorid-kitaj.html>
- <https://prom.ua/p1716961836-digidroortofosfat-kaliya.html>
- <https://prom.ua/p663698888-sulfat-margantsa-meshki.html>
- <https://flagma.ua/uk/sechovina-karbamid-o13622997.html>
- <https://flagma.ua/uk/gidroksid-kalciya-o13135175.html>
- <https://flagma.ua/uk/sulfat-amoniyu-amoniy-sirchanokisliy-basf-o13622847.html>
- <https://flagma.ua/uk/magniy-sulfat-sulfat-magniya-kristally-7-o4501403.html>
- <https://flagma.ua/uk/monokaliyfosfat-izrail-25kg-o12408536.html>
- <https://flagma.ua/uk/hliukoza-kharchova-o14569072.html>
- <https://prom.ua/ua/p610003424-zhelezo-sernokisloe-zheleznyj.html>
- <https://flagma.ua/uk/vitamin-b1-tiamin-o13538864.html>
- <https://xn---utbcjbgv0e.com.ua/biotin-vitamin-b7-1-kg.html>
- <https://flagma.ua/uk/kukurudzyaniy-ekstrakt-o5052730.html>

На підставі даних, наведених у таблиці 2.1.2, можна зробити висновок про значну різницю у вартості 1 літра середовища для культивування штаму *Brevibacterium flavum* НК-19А порівняно з штамами *Brevibacterium flavum* НХ0901, *Escherichia coli*, *Brevibacterium flavum* НК1009. З урахуванням цього, використання штаму *Brevibacterium flavum* НК-19А не є економічним, оскільки його поживне середовище є найбільш витратним. Запропонованими біологічними агентами, з економічної точки зору, доцільно використовувати штам *Brevibacterium flavum* НК1009, оскільки ціна майже однакова з штамами *Brevibacterium flavum* НХ0901, *Escherichia coli*, а оптимальна концентрація аргініну становить 55,5 г/л.

Для того, щоб підтвердити правильність вибору біологічного агента, рекомендується порівняти концентрацію цільового продукту, який синтезується протягом 1 години, оцінити вартість 1 г цільового продукту та проаналізувати дані, які містяться в таблицях 2.1.1 та 2.1.2.

Таблиця 2.1.3

Узагальнююча таблиця

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація ціл. продукту синтезу за год, г/л	Умовна вартість 1г ціл. продукту, грн/г
<i>Brevibacterium</i>	7,10	22,3	72	0,309	0,318

<i>flavum HX0901</i>					
<i>Escherichia coli</i>	6,46	19,3	42	0,459	0,335
<i>Brevibacterium flavum НК-19А</i>	15,5	13	72	0,181	1,192
<i>Brevibacterium flavum НК1009</i>	7,19	55,5	66	0,841	0,129

Аналізуючи таблицю 2.1.3, можна зробити висновок, що штам *Brevibacterium flavum НК1009* виявляється перспективним для виробництва аргініну. Цей висновок базується на кількох факторах: оптимальному синтезі цільового продукту у кількості 55,5 г/л, швидкості виробництва за короткий проміжок часу - всього 66 години, а також не високої вартості поживного середовища, що складає 7,19 гривень за 1 літр [1,33,34,40].

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Розрахунок складу поживного середовища для вирощування *Brevibacterium flavum НК1009* – продуцента аргініну. Тривалість культивування 66 год, концентрація аргініну в культуральній рідині 55,5 г, концентрація біомаси – 37,6 г/л [1].

Розрахуємо, скільки вуглецю міститься в 55,5 г аргініну. Молекулярна маса аргініну $[C_6H_{14}N_4O_2]$ становить 174. Отже, у 174 г аргініну міститься 72 г Карбону, а в 55,5 г аргініну $(72 \cdot 55,5) / 174 = 22,96$ г Карбону. Потім розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 22,96 г Карбону. Отже, Молекулярна маса глюкози – $C_6H_{12}O_6$ - становить 180; у 180 г глюкози міститься 72 г вуглецю, а 22,96 г вуглецю міститься в $(22,96 \cdot 180) / 72 = 57,4$ г. Так як мікроорганізми ростуть на вуглеводах (таких як глюкоза) близько 40 % субстрату окиснюється до CO_2 для отримання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі є наступним: $(57,4 \cdot 0,4) + 57,4 = 80,36$ г/л глюкози.

Потреби для синтезу біомаси.

У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 37,6 г біомаси становить $37,6 \cdot 0,5 = 18,8$ г. Кількість Карбону міститься у $(18,8 \cdot 180) / 72 = 47$ г глюкози. Враховуючи 40% втрат субстрату на «інертне окислення», для отримання

37,6 г/л біомаси у середовище потрібно $(47 \cdot 0,4) + 47 = 65,8$ г/л глюкози. Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (37,6 г/л) та аргініну (55,5 г/л), становить $80,36 + 65,8 = 146,16$ г/л.

Таку кількість субстрату не можна додавати у середовище відразу, початкова концентрація глюкози у середовищі становить максимум 60 г/л, а решту субстрату частково вносять в процесі культивування (підживлення).

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.

Потреби для синтезу біомаси. Наприклад, біомаса містить 10 % Нітрогену. Отже, у 37,6 г біомаси вміст азоту міститься 3 г. Продукент аргініну засвоює мінерали (амонійний) та органічний Нітроген, як джерела азотних поживних речовин. Для отримання аргініну в промислових умовах використовується середовище, що містить сульфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Розрахуємо кількість сульфату амонію, необхідну для одержання 37,6 г біомаси. Молекулярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ становить 132. Отже, у 132 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 3 г Нітрогену буде міститись у $(132 \cdot 3) / 28 = 14,14$ г солі. Для одержання 37,6 г/л біомаси вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у середовищі культивування повинен становити 14,14 г/л.

Потреби для синтезу аргініну. Нітроген входить до складу біомаси та аргініну. Розрахуємо вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у середовищі, необхідний для одержання 55,5 г аргініну. Молекулярна маса аргініну $[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2]$ становить 174. Отже, у 174 г аргініну міститься 56 г Нітрогену (N), тоді у 55,5 г аргініну вміст Нітрогену становить $(55,5 \cdot 56) / 174 = 17,8$ г. Потім розрахуємо, в якій кількості $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ міститься ця кількість Нітрогену. У 132 г сульфату амонію міститься 28 г Нітрогену (N), тоді 17,8 г Нітрогену містить у $(132 \cdot 17,8) / 28 = 83,9$ г солі. Для одержання 55,5 г/л аргініну вміст сульфату амонію в середовищі буде становити 83,9 г/л.

Слід зазначити, що таку концентрацію солі не можна додавати в культуральне середовище відразу. Як правило, початкова концентрація мінеральних джерел азоту в культурах, що продукують аргінін, становить 2-3%. Решту додають у вигляді живильного розчину. Кількість азоту, необхідна для біомаси та синтезу аргініну, становить $83,9 + 17,8 = 101,7$ г/л.

Розрахунок вмісту у середовищі джерел мінерального Нітрогену.

Якщо сульфат амонію є єдиним джерелом мінерального азоту в середовищі продуцента аргініну, концентрація цієї солі повинна становити $(132 \cdot 101,7) / 28 = 479,4$ г/л, щоб забезпечити бактерії азотом (101,7 г/л). Однак така концентрація сульфату амонію вносить в середовище занадто багато сірки, тому для заміщення частини азоту у вигляді амонію, необхідного бактеріям, використовується хлорид амонію. Припустимо, що початкова концентрація сульфату амонію в середовищі становить 25 г/л, а решта азоту у вигляді амонію надходить до середовища у складі поживного розчину у формі NH_4Cl .

Розрахуємо необхідну сумарну кількість хлориду амонію. У 25 г сульфату амонію міститься $(25 \cdot 28) / 132 = 5,3$ г Нітрогену. Отже, у вигляді NH_4Cl у середовище потрібно внести $101,7 - 5,3 = 96,4$ г/л Нітрогену. Така кількість Нітрогену міститься у $(96,4 \cdot 55,5) / 14 = 382$ г/л хлориду амонію.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

Brevibacterium flavum

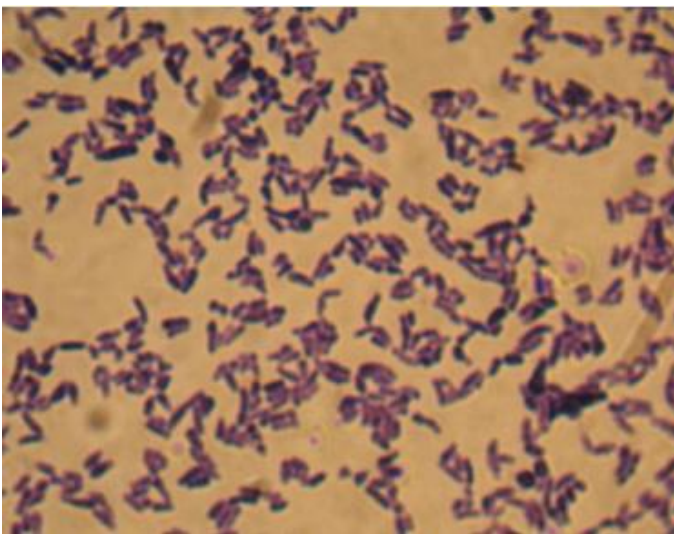


Рис. 2.3.1. Клітини мутантного штаму *Brevibacterium flavum*

Brevibacterium flavum має розмір та форму клітин, які характерні для бактерій з роду *Brevibacterium*. У цієї бактерії клітини овальні, часто розташовані під кутом, паличковидні, розміром $0,6-2,0 \times 0,2-1,0$ мкм (Рис. 2.3.1), нерухомі, аспорогенні, грам та каталазо позитивні. Паличковидні клітини з часом можуть вкорочувалися до коковидних [35].

Фізіолого-біохімічні ознаки *Brevibacterium flavum*. Мутантний штам *Brevibacterium flavum* НК1009 є аеробом, який не розріджує желатин, не засвоює нітратний азот, але засвоює азот (амонійних солей) та сечовину. Гетеротроф. Потребує біотин, тіамін та L-гістидин для росту на мінімальному середовищі.

Ріст штаму здійснюється при температурі від 24 до 42 °С, оптимальна температура 31 ± 1 °С. Ріст штаму здійснюється на середовищах з рН від 6,0 до 8,0, оптимальне значення рН 6,8-7,2. Спосіб одержання штаму: мутагенез та ступінчата селекція. Мутантний штам *Brevibacterium flavum* НК1009 використовують для синтезу аргініну 55,5 г/л [35].

2.4. Таксономічний статус *Brevibacterium flavum*

Рід *Brevibacterium* належить до паличкоподібних бактерій, є представником класу Actinobacteria. Види *Brevibacterium* облігатні, або факультативні аероби [36].

Таксономічний статус *Brevibacterium flavum*:

Таксон	Латинська назва
Домен	Bacteria
Клас	Actinobacteria
Порядок	Actinomycetales
Підряд	Micrococccineae
Родина	Brevibacteriaceae
Рід	Brevibacterium
Вид	flavum

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Аргінін - одна з найбільш універсальних амінокислот у клітинах людей та тварин, яка служить попередником для синтезу не тільки білків, але й оксиду азоту, сечовини, поліамінів, проліну, глутамату, креатину та агматину [2].

Аргінін (2-аміно-5-гуанидин-валеріанова кислота) - одна з амінокислот, що входять до складу білків; надає пластичне, гепатопротекторну дію. Аргініну володіє тонізуючу ефектом.

Показання для прийому аргініну:

- в комплексній терапії гострих і хронічних гепатитів різної етіології, в тому числі при отруєнні гепатотропними отрутами (блідою поганкою, хімічними та лікарськими речовинами), цирозі печінки, лептоспірозі.
- печінкова енцефалопатія, прекома та кома, що супроводжуються гіперамоніємією.
- стан гострого алкогольного отруєння середнього та важкого ступеня, в тому числі алкогольна енцефалопатія і кома.
- ускладнення в III триместр вагітності: пізній гестоз, включаючи важкі його форми - прееклампсія і еклампсія, фетоплацентарна недостатність, хронічна патологія травної системи у вагітних [3].

Аргінін необхідний організму з кількох причин. Він бере участь в синтезі креатину, який є важливим живильною речовиною, а його дефіцит викликає розумову відсталість. Він також бере участь у виробництві агматину, сигнальної молекули в організмі, і є проміжним продуктом в циклі сечовини разом з L-орнітином і L-цитрулін [4,5]. Аргінін допомагає синтезувати молекули протеїну і стимулювати виділення інсуліну.

					НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Милобог К.О.			РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					1	64
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Оптимальна добова доза аргініну. Здоровий дорослий організм здатен синтезувати аргінін самостійно, але тільки в невеликих кількостях. З цієї причини потрібно додатково приймати аргінін для підтримки його властивостей в організмі. Дитячий організм не синтезує аргінін [6].

Середній запас L-аргініну в раціоні становить близько 5,4 г в день. Однак рекомендована добова доза добавки аргініну точно не визначена. Звичайна доза коливається від 3 до 6 грам, при цьому прийняття більше 10 г аргініну в день може призвести до кишкових розладів та діареї. Приймають аргінін наступним чином: дорослим всередину по 2-3 г аргініну в добу переважно перед їжею. Дітям у віці старше 6 років - 0,5-2 г / добу, залежно від віку. Проводять кілька курсів лікування тривалістю 8-15 днів, кожні 3-4 місяці [4,7].

Надходить аргінін в організм разом з їжею, всмоктується в тонкому кишківнику та транспортується в печінку, де більша його частина утилізується в орнітиновому циклі [8].

На сьогоднішній день на українському ринку представлені десятки компаній, що виробляють аргінін у вигляді лікарського засобу або біологічно активної добавки. Більша частина ринку належить закордонним представникам: Olimp Labs – Польща, Biotech USA Nutrition - Угорщина, Ostovit – Польща, Scitec Nutrition – Угорщина. Серед українських виробників на ринку представлені компанії Артеріум та Фортоген. [9].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

За статистикою станом на 2022 рік в Україні зареєстровано 312 379 чоловік хворих на хронічний гепатит. Аргінін може виявити корисні властивості для лікування хронічного гепатиту через свою участь у регулюванні оксиду азоту, що може мати протизапальні та цитопротекторні ефекти на печінку. Крім того, аргінін має антигіпоксичні та антиоксидантні властивості, що можуть бути корисними при лікуванні ускладнень, пов'язаних з гепатитом. Механізм дії полягає в тому, що аргінін може стимулювати синтез оксиду азоту, що сприяє розширенню судин, покращенню кровообігу та зменшенню запалення в печінці. Середнє денне

використання аргініну для лікування становить 2,0 г аргініну для дорослих. Беручи до уваги те, що аргінін як лікарський засіб, не входить в лікувальні схеми та не включено в державну програму з забезпечення лікарськими засобами, ймовірність застосування аргініну хворими на гепатит вважаємо 5 % [10,11,12].

Таким чином, кількість покупців становить: $312\,379 \cdot 0,05 = 15\,619$ чол.

Враховуючи курс лікування тривалістю 8-15 днів, кожні 3-4 місяці, кількість необхідного для забезпечення потреб аргініну становить:

$$15\,619 \text{ чол} \cdot 2 \text{ г} \cdot 60 \text{ днів} = 1874280 \text{ г/рік або } 1874 \text{ кг/рік}$$

Відомо, що продуктивність *Brevibacterium flavum* становить 55,5 г/л аргініну, виходячи з цього можна розрахувати скільки культуральної рідини потрібно для синтезу аргініну [1].

Застосувавши формулу можна знайти необхідний об'єм культуральної рідини:

$$1874280/55,5 = 33771 \text{ л.}$$

Враховуючи 40 % витрат культуральної рідини при виділенні продукту, загальний її об'єм повинен становити:

$$(33771 + 40\%) = 47279 \text{ л або } 47,3 \text{ м}^3.$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту

Час культивування становить 66 год (2,75 діб). Враховуємо також підготовчі операції: підготовка ферментера (мийка та огляд – 2 год, герметичність – 1 год, підігрів та стерилізація – 1,5 год, охолодження – 1 год, занесення поживного середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год, вивантаження культуральної рідини – 1,5 год).

Розраховуємо час циклу роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 66 + 9 = 75 \text{ год,}$$

де $T_{\text{по}}$ – час підготовчих операцій. Отже загальний час виробничого біосинтезу становить 75 год.

Тривалість процесу культивування 100 діб, тобто кількість циклів:

$$N_{\text{циклів}} = (100 \times 24) / 75 = 32 \text{ цикли.}$$

Кількість культуральної рідини на один цикл становить:

$$47279/32 = 1477 \text{ л (1,5 м}^3\text{) культуральної рідини.}$$

Припускаючи коефіцієнт заповнення 0,6 – об'єм ферментера = 3 м³. Отже, з урахуванням усіх витрат, розрахунок вимагає виробництва 1,5 м³ культуральної рідини. Для цього необхідно використовувати 32 цикли на рік враховуючи час, що необхідний для ферментації та час на підготовку обладнання для ферментації. Тому, для культивування обрано ферментер на 3 м³ з коефіцієнтом заповнення = 0,6.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробниче культивування *Brevibacterium flavum* для отримання аргініну здійснюють у ферментері об'ємом 3 м³ (3000 л) з коефіцієнтом заповнення 0,6. Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{\text{роб}} = 3 \cdot 0,6 = 1,8 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Отже, для отримання 1,8 м³ (1800 л) культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 1,8 \cdot 0,1 = 0,18 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті (300 л) з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для засіву посівного апарату (отримання 0,18 м³ культуральної рідини):

$$V_{\text{роб.2}} = 0,18 \cdot 0,1 = 0,018 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати під час вирощування бактерій у посівному апараті (30) л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для отримання 18 л культуральної рідини необхідно:

$$V_{\text{роб.3}} = 0,018 \cdot 0,1 = 0,0018 \text{ м}^3 \text{ (1,8 л) посівного матеріалу.}$$

Щоб отримати 1,8 л посівного матеріалу треба провести культивування у колбах на качалці (750 мл) з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{роб.3}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 1800 / (750 \cdot 0,2) = 12 \text{ колб.}$$

Отже, процес отримання посівного матеріалу для виробництва аргініну у ферментері (3 м³) з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи. Три з яких – одержання посівного матеріалу в інокуляторах (посівний апарат на 30 л та 300 л, ферментер на 3000 л) та один – отримання посівного матеріалу у колбах на качалках (1,8 л посівного матеріалу).

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Brevibacterium flavum використовує глюкозу як джерело вуглецю. Катаболізм глюкози проходить шляхом гліколізу.

Спочатку відбувається перетворення глюкози на глюкозу-6-фосфат за допомогою глюкокінази (КФ 2.7.1.2). Потім глюкоза-6-фосфат за участю глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9) перетворюється в фруктозу-6-фосфат, яка завдяки 6-фосфоглюкозо-6-фосфат ізомеразі (КФ 2.7.1.11) перетворюється в фруктозо-1,6-дифосфат. Дія фруктозо-1,6-дифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) перетворює останню сполуку на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, що під дією тріозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1) переходить в гліцеральдегід 3-фосфат.

Гліцеральдегід-3-фосфат завдяки гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3 –дифосфогліцерат, який під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Далі на 3-фосфогліцерат діє 2,3-бісфосфогліцерат-незалежна фосфогліцерат-мутаза (КФ 5.4.2.12) перетворює сполуку на 2-фосфогліцерат, на який потім діє енолаза (КФ 4.2.1.11), визиває перетворення у фосфоенолпіруват.

Фінальний етап. Утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Милобог К.О.			РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					1	64
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

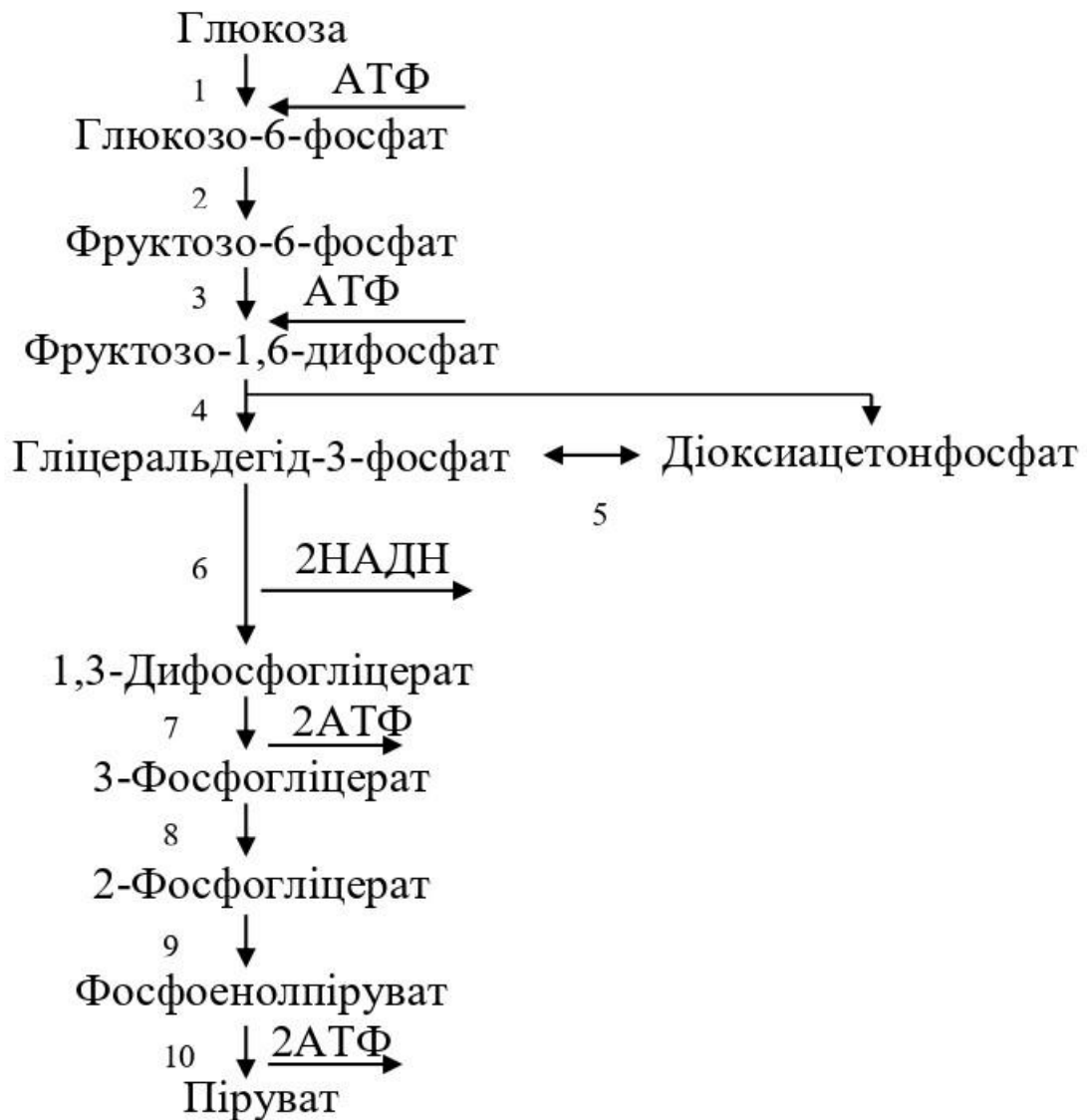


Рис. 4.1. Шлях катаболізму *Brevibacterium flavum*.

Ферменти: 1 – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 - глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – 6-фосфотруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13); 5 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 8 – 2,3-бісфосфогліцерат-незалежна фосфогліцерат-мутаза (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

Таким чином, в результаті гліколізу утворюється піруват, який далі бере участь у циклі 3-карбонових кислот: з 2-оксоглутарату під дією ферменту аспартат амінотрансферази (КФ 2.6.1.1.1) утворюється глутамат, а потім N-ацетилглутамат синтаза (КФ 2.3.1.1.1) діє на глутамат з утворенням N-ацетилглутамат. N-ацетилглутамат-5-фосфат потім утворюється завдяки ацетилглутамат кінази (КФ 2.7.2.8). N-ацетил- γ -глутамілфосфат-редуктаза (КФ 1.2.1. 38) перетворює N-ацетил-глутамат-5-фосфат на N-ацетилглутамат-семіальдегід, на нього діє фермент ацетил орнітин амінотрансфераза (КФ 2.6.1.11) утворюючи N-ацетил-орнітин. Остання сполука перетворюється під дією N-ацетилорнітин карбомаїлтрансферази (КФ 2.1.3.9) утворюючи N-ацетил-L-цитруліну. Ацетилорнітин дезиталаза (КФ 3.5.1.16) перетворює N-ацетил-L-цитрулін на цитрулін, який, у свою чергу, перетворюється на L-аргініносукцинат за допомогою аргініносукцинат синтази (КФ 6.3.4.5). Останнім етапом є перетворення L-аргініносукцинату в L-аргінін за допомогою ферменту аргініносукцинат ліази (КФ 4.3.2.1) [49].

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивувати аргінін можна різними способами: глибинним або поверхневим, періодичним або безперервним.

Brevibacterium flavum є аеробною бактерією. Тому в рідких середовищах з великим об'ємом рідини аеробні бактерії можуть рости тільки на поверхні, оскільки далі від поверхні вони наближаються до анаеробних умов. Аерація необхідна для нормального росту аеробних бактерій у глибших шарах рідкої культури. Процес культивування здійснюється шляхом аерації та перемішування, що дозволяє рости в глибших шарах [17].

Щоб обрати між періодичним та безперервним культивуванням, слід враховувати переваги та недоліки.

Періодичне культивування мікроорганізмів є трудомістким. Однак варто зазначити, що штам *Brevibacterium flavum* НК1009 потребує дуже невеликої кількості глюкози для надмірного синтезу аргініну і цей процес здійснюється в періодичному способі. Методи безперервного культивування - це методи, в яких свіже поживне середовище безперервно подається в ферментер, в якому вирощуються бактерії, і в той же час культуральне середовище, що містить бактеріальні клітини і метаболіти, видаляється з тією ж швидкістю. Цей тип культури може до певної міри наближатися до ідеальних умов. При постійній концентрації субстрату та інших незмінних умовах можна до певної міри наблизитися до ідеальних умов, коли клітини перебувають у фазі тривалого експоненціального росту. Концентрація субстрату та інші умови також незмінні. Однак цей метод не забезпечує стерильних умов культивування. Таким чином, можна зробити висновок, що штами *Brevibacterium flavum* НК1009 слід культивувати періодично-глибинним способом з регулярною аерацією [19].

					НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Милобог К.О.			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					1	64
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Для виробництва аргініну з використанням штаму *Brevibacterium flavum* НК1009 можна вибрати ферментатор Sartorius з подачею повітря, датчиком рН і відкритою турбінною мішалкою. Їх ферментатори доступні в широкому діапазоні ємностей і конфігурацій, а також оснащені подачею повітря, датчиками рН і мішалками.

Ферментатор Sartorius BIOSTAT® Cplus3 призначений для досліджень і промислового виробництва біологічних продуктів. Ферментатор оснащений різними датчиками і системами управління, які автоматизують контроль рН, температури, рівня рідини, аерації та перемішування. Модульна конструкція налаштовується для роботи з різними типами продуктів. Ферментатор Sartorius BIOSTAT® Cplus3 також оснащений датчиками для контролю рівня піни і рівня рідини в резервуарі, що забезпечує безпеку і стабільність процесу культивування мікроорганізмів (рис. 5.1):



Рис. 5.1. Ферментатор Sartorius BIOSTAT® Cplus3

Запропоноване мною обладнання має високі технічні характеристики і дозволяє легко перемикає режими перемішування і масообміну, гарантуючи рівномірний розподіл мікроорганізмів і компонентів поживного середовища.

Оскільки *Brevibacterium flavum* НК1009 є аеробним організмом, ферментатор оснащений сучасною електронікою (контролером і датчиками) для забезпечення точного контролю рівня кисню. Повністю закрита конструкція гарантує, що повітря не потрапляє в обладнання, що має вирішальне значення для забезпечення асептичних умов культивування [13].

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Brevibacterium flavum - аеробна бактерія. Для синтезу аргініну культурам необхідно забезпечити стерильне аераційне повітря.

Для стерилізації повітря в боксі та в лабораторії, де обробляють посівний матеріал та інокулянт, використовують ультрафіолетові лампи. Одним з найпростіших способів стерилізації повітря є пропускання його через волокнисті або мембранні фільтри для фізичного видалення мікроорганізмів. Цей процес підготовки очищеного вентиляційного повітря складається з декількох етапів: збір повітря з атмосфери; попереднє очищення; стиснення повітря; стабілізація термодинамічних параметрів; очищення головним та індивідуальними фільтрами.

Така система очищення запобігає потраплянню сторонніх мікроорганізмів у поживне середовище та забезпечує ефективну дезінфекцію повітря. Фільтри грубого, тонкого та індивідуального очищення очищають вентиляційне повітря.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та продукції стерилізується за допомогою фільтрів грубого очищення (основний фільтр) та індивідуальних фільтрів (високоєфективні фільтри).

Всмоктування фільтра грубого очищення відбувається на висоті 25 м. Окремі фільтри встановлюються безпосередньо перед ферментатором, посівним апаратом та інокулятором. Основні фільтри заповнені волокнистим наповнювачем і встановлені в головному вентиляційному колекторі під тиском у приміщенні ферментації. Ці фільтри видаляють близько 98% мікроорганізмів, тоді як окремі ультратонкі або волокнисті фільтри затримують до 99,9% мікроорганізмів. Це повітря проходить через колектор до аналогічного головного фільтра, де воно очищується і нейтралізується. Там, де потік повітря низький, такі фільтри встановлюють безпосередньо у ферментаторі [20].

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Для очищення зовнішніх поверхонь використовують метод дезінфекції, який включає нанесення або розпилення робочого розчину дезінфікуючого засобу на обладнання. Запобіжна дія цього процесу залежить від тривалості контакту дезінфікуючого засобу з поверхнею, яка повинна тривати не менше 20 хвилин, а

після завершення обробки залишки засобу змивають, а обладнання промивають водою. Для виконання цих процедур використовують мийні засоби з різними хімічними складами, такими як лужні та кислотні мийні засоби. Також застосовуються мийні засоби на основі синтетичних поверхнево-активних речовин і мийні засоби, що містять протеолітичні ферменти. При аналізі ринку мийних та дезінфікуючих засобів рекомендується звернути увагу на ефективні, відносно доступні та широко використовувані продукти, такі як: каустичну та кальциновану соду, а також «Біомой» та «Хлорантоїн».

Каустична сода, відома також як луг або їдка сода (NaOH), представляє собою безбарвні кристали, які мають гігроскопічні властивості. Він легко розчиняється у воді, утворюючи лужний розчин. Гарячі розчини каустичного натрію ефективно видаляють жири, гідролізують білки та розщеплюють вуглеводи. Проте, зниження температури розчину призводить до зменшення його мийних властивостей. Важливо зазначити, що розчини каустичної соди можуть кородувати алюмінієві предмети.

"Біомой" - інноваційний мийний засіб з багатьма компонентами, який має поліфункціональність і біоактивні властивості, що забезпечують дезінфекційний ефект. Форма випуску препарату - порошок світлих відтінків, допускається наявність забарвлених ферментів. Він легко розчиняється у воді 30 г/дм³. Робочі розчини "Біомою" безбарвні, не пошкоджують оброблювані предмети, мають виразні емульгуючі та мийні властивості, легко видаляють білково-жирові плівки, добре змиваються без залишку на оброблюваних поверхнях. Проте цей засіб несумісний з катіонами поверхнево-активних речовин. Для приготування робочого розчину "Біомою" рекомендується використовувати концентрацію 0,15-0,5%.

«Хлорантоїн» є ефективним засобом дезінфекції, який має багато корисних властивостей. Він представляє собою світлі сипучі порошки зі слабким ароматом хлору, добре розчиняється у воді (не менше 20 г/дм³). Водні розчини Хлорантоїну прозорі, безбарвні і мають легкий запах хлору. Хлорантоїн має широкий спектр антимікробної дії, включаючи бактерії, віруси, а також спори і гриби. Хлорантоїн виявляє дезінфікуючу активність, перевищуючи звичайні засоби і не вимагає

використання лужних миючих засобів. Використання Хлорантоїну дозволяє проводити етапи миття, дезінфекції та предстерилізації в одній операції, що скорочує час санітарної обробки [21,23].

Витрати та собівартість виробництва концентрованих мийних засобів та концентрованих дезінфікуючих засобів наведено в Таблиці 5.3.1.

Таблиця 5.3.1.

Порівняльна характеристика дезінфікуючих засобів

Назва деззасобу та виробник.	Склад	Спектр дії	Необхідна кількість для обробки 1 м ²	Термін зберігання. Вартість	Степінь безпеки
1	2	3	4	5	6
Каустична сода «РСС Rokita», Польща	Їдкий натр	Для миття та дезінфекції виробничого обладнання і комунікацій.	Концентрація робочого розчину – 2%, що еквівалентно 20 г в 1 л води.	1 рік з моменту виготовлення. Вартість – 56 грн/л.	Їдка речовина. Необхідна захист шкіри та очей.
Біомой «Фармакос», Україна	Сульфонал 5,0-8,0; лужна протеаза 1,0-1,1; натрію карбонат; диспергатор; наповнювач.	Для миття та дезінфекції виробничого обладнання і комунікацій, дезінфекції поверхонь в приміщеннях, санітарно-технічного обладнання, гумових килимків, лабораторного посуду, санітарного транспорту.	0,5 % розчин для миття технологічного устаткування 0,15–0,3 % розчини для циркуляційного миття технологічного обладнання і комунікацій та миття скляної і полімерної тари.	2 роки з дати виготовлення. Термін зберігання робочих розчинів – до 14 днів. Вартість – 250 грн/л.	Належить до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас безпеки).
Хлорантоїн «Фармакос», Україна	Дихлорантин 21,5-23,5; 5,5-диметилгідантоїн 12,5-16,5; диспергатор 9,0-12,5; аніонні поверхнево-активні реч. 3,2-5,0; інгібітор корозії до 10,0.	Має бактерицидні, туберкульозні, віруліцидні, спороцидні та фунгіцидні властивості. Застосовується в осередках особливо небезпечних і зоонозних інфекцій.	2 г на 1 л води (0,2% розчин)	Термін зберігання 3 роки з дати виготовлення. Термін зберігання робочих розчинів – до 5 днів. Вартість – 525 грн/л.	(згідно з ГОСТ 12.1.007-76) належить до 4 класу мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру.

Слід зазначити, що дезінфікуючі та миючі засоби слід міняти кожні 2-3 місяці, щоб запобігти розвитку стійких штамів мікроорганізмів. Для забезпечення належного очищення повітря у виробничих приміщеннях на стелі монтують дезінфекційні лампи, які вмикають на 1-2 години після генерального прибирання та коли приміщення порожнє.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для вирощування культури *Brevibacterium flavum* НК1009 було підібрано поживне середовище наступного складу (г/л):

- глюкоза - 100;
- кукурудзяний екстракт – 25;
- сечовина – 1;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 40;
- KH_2PO_4 – 1,1;
- K_2HPO_4 – 0,5;
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5;
- L- гістидин – 0,001;
- тіамін – 0,0002;
- біотин – 0,00005.

Беручи до уваги різні методи стерилізації та умови стерилізації компонентів середовища, загальний склад середовища поділяється на наступні склади:

Композиція I: глюкоза – 40 г/л, кукурудзяний екстракт – 25 г/л, сечовина – 1 г/л. Режим стерилізації: в автоклаві при 112 °С, тиск – 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Композиція II: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 40 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г/л. Режим стерилізації: в автоклаві при 131 °С, тиск – 0,15 МПа упродовж 40 хв.

Композиція III: KH_2PO_4 – 1,1 г/л, K_2HPO_4 – 0,5 г/л. Режим стерилізації: в автоклаві при 131 °С, тиск – 0,15 МПа упродовж 40 хв.

На підживлення піде глюкоза 60 г/л для виробничого біосинтезу та допоміжний розчин L- гістидин – 0,001 г/л; тіамін – 0,0002 г/л; біотин – 0,00005 г/л.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Оснащений металевією сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтруючі матеріали – волокна. Швидкість фільтрування - 0,1 м/с, Е=90%.
К-3	Компресор	1	Потужність - 55 кВт, продуктивність - 0,67 м ³ /хв, робочий тиск - 0,1 МПа.
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Продуктивність - 66 м ³ /год
Р-5	Ресивер	1	Об'єм ресивера - 900 л, робочий тиск - 10 МПа.
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Вироблений із оцинкованої сталі, товщина якого становить 1,0 - 1,5 мм.
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Ефективність очищення 95% та швидкість фільтрування становить 25 м/с.
Д-8; Д-10; Д-12; Д-17; Д-20; Д-25; Д-34; Д-37	Дозатор	8	Об'ємно-ваговий дозатор.
Н-19 Н-22	Насос	2	Герметичні насоси з магнітним приводом. Продуктивністю від 5 до 70 л/хв., напор - до 8 м.
РЗ-9	Реактор-змішувач (приготування та стерилізації розчину каустичної соди)	1	Реактор для змішування обладнаний мішалкою. Загальний об'єм - 40 л.
РЗ-11	Реактор-змішувач (приготування та стерилізації розчину «Хлорантоїн»)	1	Реактор для змішування обладнаний мішалкою. Загальний об'єм 40 л.

НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Милобог К.О.		
Перевір.		Сулейко Т.Л.		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання				
		Літ.	Арк.	Акрушів
			1	64
Кафедра БТМ				

Р-13	Реактор–змішувач для приготування та стерилізації Композиції II та III	1	Реактор для змішування обладнаний мішалкою. Загальний об'єм від 10 л до 5000 л.
ЗП-14	Засівний бачок	1	Бачок для засівання посівного матеріалу об'ємом 3л.
Ф-15; Ф-16 Ф-17; Ф-18	Фільтри індивідуальної очистки	4	Фільтруючий матеріал - фторопласт, Е = 99,9 %.
ІН-15 ІН-24 ІН-33	Інокулятор	3	Загальний об'єм від 10 л до 1000 л.
ФР-32	Ферментер	1	Об'єм (геометричний) - 3 м ³ , ферментер з нержавіючої сталі, швидкість перемішування становить 330 об/хв.
ЗБ-40	Збірник культуральної рідини	1	Загальний об'єм 3 м ³ , з нержавіючої сталі.

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Дана стадія включає в себе підготовку персоналу і приготування миючих та дезінфікуючих розчинів. Цей блок робіт та операцій є невід'ємною частиною технологічного процесу, тому що від нього залежить якість та кількість отриманої продукції.

ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

Апаратура та приміщення має пройти відповідну обробку дезінфікуючими розчинами для уникнення контамінації, що призводить до отримання бракованої продукції.

ДР 1.1.1. Підготовка розчину каустичної соди

Для отримання розчину 2% каустичної соди потрібно 10 л води та 2,5 кг каустичної соди (до ДР 2.1, ДР 3.1).

ДР 1.1.2. Приготування розчинів Хлорантіону

Розчин Хлорантіону готують у промаркованих контейнерах з будь-якого матеріалу, крім оцинкованого заліза; для приготування 10 л розчину Хлорантіону розчиняють 50 г концентрату в 9,95 л води і перемішують протягом 2 хвилин.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання виробничого приміщення повинно проводитися працівниками один раз на зміну. Працівники повинні носити гумові рукавички, взуття та фартухи, щоб запобігти пошкодженню шкіри та одягу дезінфікуючими засобами. Стіни, двері та інші поверхні слід протирати поролоновою губкою, змоченою дезінфікуючим розчином каустичної соди та «Хлорантіон» 0,2 % та миють підлогу.

НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Милобог К.О.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробництва	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					1	64
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання приміщень слід проводити кожні п'ять днів (дні технічного обслуговування обладнання) або негайно на вимогу бактеріолога у разі мікробіологічного забруднення. Перед застосуванням обезточують все обладнання та прилади. Стелі, стіни, двері, вікна, перегородки та обладнання обробляти шляхом зрошення з гідравлічної консолі робочим розчином «Хлорантіону» у концентрації 0,5%. Після зрошення закрийте приміщення на 30-40 хвилин, а потім протріть чистою безворсовою ганчіркою, щоб видалити залишки миючого розчину. Після генерального прибирання увімкніть стерилізаційну лампу для стерилізації повітря.

ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Мийка та дезінфекція вузлів обладнання

Обладнання миють водопровідною водою з 2% розчином каустичної соди. Для миття обладнання слід використовувати інтегровану СІР-мийку. Розчин дезінфікуючого засобу каустичної соди та дистильованої води завантажується в СІР-мийку. Вводяться такі параметри, як температура обраного миючого розчину. Використаний миючий розчин відправляється на утилізацію. Після миття ферментер ополіскують холодною водою протягом 10 хвилин. Відпрацьовану воду зливають і відправляють на стадію переробки відходів.

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Перед стерилізацією обладнання перевіряється на наявність пошкоджень, вм'ятин, впадин, які можуть містити залишкове забруднення, що може призвести до перехресної контамінації. Будь-які виявлені дефекти видаляються.

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

Перевірку на герметичність виконується шляхом подачі стисненого повітря для створення надлишкового тиску. Показання тиску контролюються манометром, падіння тиску свідчить про несправність обладнання. Тиск повітря 0,15-0,2 МПа подається на 15 хвилин для перевірки герметичності прилеглих трубопроводів перед заповненням середовища. Якщо тиск падає, промивають всі з'єднання мийним розчином. При виявленні розгерметизації, скидають тиск, підтягують з'єднання і повторно перевіряють. Для цього знову подають в апарат стиснене повітря під

тиском 0,2 МПа. Якщо тиск не знизиться протягом 30 хвилин, пристрій вважається герметичним.

ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання

Стерилізацію обладнання проводять насиченою водяною парою протягом 1 години при температурі від +135°C до +140°C і під тиском 0,30 МПа. На даній стадії контролюється температура, тиск водяної пари, час стерилізації та відсутність сторонньої мікрофлори. Процес стерилізації апарату та комунікацій здійснюється протягом 1 години.

ДР 1.4. Підготовка персоналу

Особи, які допускаються до виробництва повинні мати відповідну професійну підготовку, а також пройти навчання з питань охорони праці, техніки безпеки та санітарних норм до початку самостійної роботи. Медичне обстеження персоналу проводиться 1 раз на рік. Спеціально обговорюються порядок підготовки, особиста гігієна та поведінка персоналу, а також забезпечення працівників спецодягом і засобами індивідуального захисту, такими як гумові рукавички, халати, респіратори та захисні окуляри.

ДР 2. Підготовка повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря збирається за допомогою центральної повітрязабірної труби. Збирається повітря з висоти 25 м.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

Повітря попередньо очищується за допомогою чарункового фільтра. Під час того, як повітря проходить через фільтр грубого очищення з нього видаляється пил та механічні частинки, а очищене повітря потрапляє у компресор. Ступінь очищення становить $E = 80 \%$.

ДР 2.3. Стиснення повітря

При стисканні повітря компресором температура підвищується з 15–25°C (на вході до 120-200 °C (на виході) з повітродувка. Повітря охолоджують перед тим, як подати на головний фільтр. Виходячи з компресора, повітря має наступні характеристики: $P = 0,35\text{--}0,5\text{МПа}$, $w = 60 \%$.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря подають в охолоджувачі повітря для пониження температури (25-30 °С), щоб видалити надлишкову вологу. Повітря подається в ресивер, де відбувається пом'якшення вібрацій та видалення надлишкової вологи ($W = 60-70\%$).

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Після охолодження повітря нагрівають у теплообміннику до 35 °С, щоб запобігти конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Кількість гарячого повітря для змішування визначають умовами відносної вологості і не має бути перевищена 50%.

ДР 2.6. Очищення в головному фільтрі

Повітря фільтрується у головному фільтрі (ступінь очищення 95%) від мікроорганізмів. Коли фільтр забруднився, став вологим або інфікованим, його необхідно негайно замінити. Фільтр міняють двічі на рік.

ДР 2.7. Очищення в індивідуальному фільтрі

Інокулятори та ферментер обладнані індивідуальними фільтрами для того, щоб остаточно очистити повітря (ступінь очищення 99,9 %). Фільтр міняють раз в місяць.

ДР 3. Підготовка титрувальних агентів.

ДР 3.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища в посівних апаратах об'ємом 30 л, 300 л і 3 м³

Для того, щоб приготувати 36 л 6%-го розчину HCl в збірник об'ємом 40 л додають 29,7 л води, потім додають 6,3 л 36%-го розчину HCl і постійно перемішують.

ДР 3.2. Підготовка та стерилізація підживлювального розчину

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози для виробничого біосинтезу

На вагах зважують 108 кг глюкози, переносять до реактора-змішувача об'ємом 500 літрів. Для цього використовують лічильник, що подає 288 літрів дистильованої води. Щоб поліпшити розчинення компонента, в парову камеру реактора

постачають пару. Отриманий розчин стерилізують у реакторі при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,05$ МПа та $\tau = 30$ хв.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація підживлювального розчину вітамін для виробничого біосинтезу

Зважують на вагах 0,05 мг біотину, 0,2 мг тіаміну та 1 мг L-гістидину. Наважки переносять у 1-літрову колбу та додають 500 мл дистильованої води. Після цього розчин перемішують до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин переливають в 5-літрову колбу і додають 2,25 л дистильованої води. Отриманий розчин стерилізують у реакторі при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,05$ МПа та $\tau = 30$ хв. Простерилізований розчин використовують на стадії вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляту в колбах на качалках

Таблиця 4.1

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 1,8 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	40	72	I	1
Кукур.екстракт	25	45		
Сечовина	1	1,8		
(NH ₄) ₂ SO ₄	40	72	II	0,5
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	0,9		
KH ₂ PO ₄	1,1	1,98	III	0,3
K ₂ HPO ₄	0,5	0,9		

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції I

Для приготування I композиції зважують (на технічних вагах): глюкозу – 72г, кукурудзяний екстракт – 45г та сечовину – 1,8г та переміщують у колбу (3 л), додаючи 1 л дистильованої води. Перемішують та зачиняють ватно–марлевым корком. Стерилізація проводиться за таких умов: автоклав при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,05$ МПа та $\tau = 30$ хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції II

Для приготування II композиції зважують (на технічних вагах): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 72г та $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,9г та переміщують у колбу (3 л), додаючи 500 мл дистильованої води. Перемішують та зачиняють ватно–марлевым корком. Стерилізація проводиться за таких умов: автоклав при $t = 131$ °С, $P = 0,15$ МПа та $\tau = 40$ хв.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції III

Для приготування III композиції зважують (на технічних вагах): K_2HPO_4 – 1,98г, K_2HPO_4 – 0,9г та переміщують у колбу (3 л), додаючи 300 мл дистильованої води. Також подається підживлювальний розчин біотину, тіаміну та L-гістидину (від ДР 3.2.2). Перемішують та зачиняють ватно–марлевым корком. Стерилізація проводиться за таких умов: автоклав $t = 131$ °С, $P = 0,15$ МПа та $\tau = 40$ хв.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 30 л

Таблиця 4.2

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 18 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	40	648	I	10
Кукур.екстракт	25	405		
Сечовина	1	16,2		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40	648	II	8
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	8,1		
K_2HPO_4	1,1	17,82		
K_2HPO_4	0,5	8,1		

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції I

Для приготування I композиції зважують (на технічних вагах): глюкозу – 648г, кукурудзяний екстракт – 405г та сечовину – 16,2г та переміщують у збірник (30 л), додаючи 10 л дистильованої води та перемішують. Стерилізація проводиться за таких умов: $t = 112$ °С, $P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, при помірному перемішуванні направляючи глуху пару у сорочку, потім гостру у збірник. Після стерилізації поживне середовище переміщується та охолоджується, заливаючи холодною водою в сорочку збірника. Після охолодження композиція подається в інокулятор.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції II

Для приготування II композиції зважують (на технічних вагах): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 648г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,1г, KH_2PO_4 – 17,82г, K_2HPO_4 – 8,1г. Також подається підживлювальний розчин біотину, тіаміну та L-гістидину (від ДР 3.2.2). Переміщують у збірник (30 л), додаючи 8 л дистильованої води та перемішують. Перед стерилізацією додають 6%-й розчин хлоридної кислоти. Стерилізація проводиться за таких умов: $t = 131$ °С, $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, при помірному перемішуванні направляючи глуху пару у сорочку, потім гостру у збірник. Після стерилізації поживне середовище перемішується та охолоджується, заливаючи холодною водою в сорочку збірника. Після охолодження композиція подається в інокулятор.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 300 л

Таблиця 4.3

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 180 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	40	6480	I	100
Кукур.екстракт	25	4050		
Сечовина	1	162		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40	6480	II	80
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	81		
KH_2PO_4	1,1	178,2		
K_2HPO_4	0,5	81		

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції I

Для приготування I композиції зважують (на технічних вагах): глюкозу – 6480г, кукурудзяний екстракт – 4050г та сечовину – 162г та переміщують у збірник (300 л), додаючи 100 л дистильованої води та перемішують. Стерилізація проводиться за таких умов: $t = 112$ °С, $P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, при помірному перемішуванні направляючи глуху пару у сорочку, потім гостру у збірник. Після стерилізації поживне середовище перемішується та охолоджується, заливаючи холодною водою в сорочку збірника. Після охолодження композиція подається в інокулятор.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції II

Для приготування II композиції зважують (на технічних вагах): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 6480г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 81г, KH_2PO_4 – 178,2г, K_2HPO_4 – 81г. Також подається підживлювальний розчин біотину, тіаміну та L-гістидину (від ДР 3.2.2). Переміщують у збірник (300 л), додаючи 80 л дистильованої води та перемішують. Перед стерилізацією додають 6%-й розчин хлоридної кислоти. Стерилізація проводиться за таких умов: $t = 131$ °С, $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, при помірному перемішуванні направляючи глуху пару у сорочку, потім гостру у збірник. Після стерилізації поживне середовище перемішується та охолоджується, заливаючи холодною водою в сорочку збірника. Після охолодження композиція подається в інокулятор.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 3 м³ (3000 л)

Таблиця 4.4

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 1800 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	40	64800	I	1000
Кукур.екстракт	25	40500		
Сечовина	1	1620		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40	64800	II	800
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	810		
KH_2PO_4	1,1	1782		
K_2HPO_4	0,5	810		

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції I

Для приготування I композиції зважують (на технічних вагах): глюкозу – 64800г, кукурудзяний екстракт – 40500г та сечовину – 1620г та переміщують у збірник (3000 л), додаючи 1000 л дистильованої води та перемішують. Стерилізація проводиться за таких умов: $t = 112$ °С, $P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, при помірному перемішуванні направляючи глуху пару у сорочку, потім гостру у збірник. Після стерилізації поживне середовище перемішується та охолоджується, заливаючи холодною водою в сорочку збірника. Після охолодження композиція подається в інокулятор.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції II

Для приготування II композиції зважують (на технічних вагах): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 64800г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 810г, KH_2PO_4 – 1782г, K_2HPO_4 – 810г. Також подається підживлювальний розчин біотину, тіаміну та L-гістидину (від ДР 3.2.2). Переміщують у збірник (3000 л), додаючи 800 л дистильованої води та перемішують. Перед стерилізацією додають 6%-й розчин хлоридної кислоти. Стерилізація проводиться за таких умов: $t = 131$ °С, $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, при помірному перемішуванні направляючи глуху пару у сорочку, потім гостру у збірник. Після стерилізації поживне середовище перемішується та охолоджується, заливаючи холодною водою в сорочку збірника. Після охолодження композиція подається в інокулятор.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційна культура *Brevibacterium flavum* поміщається у пробірки зі скошеним МПА та зберігаються при $t = 3 - 4$ °С. Культуру пересівають кожні 3 – 4 місяці. Всі роботи проводяться в суворих асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Культура, яка зберігається у пробірках, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА та інкубують 48 годин при $t = 31$ °С.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані колонії переносять петлею в пробірки зі скошеним МПА на відстані не менше 1 см одна від одної. Вирощування триває протягом 48 год.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для культивування рідкого посівного матеріалу у колбу вносять середовище, яке виготовили від ДР 4.1.1, ДР 4.1.2. та ДР 4.1.3. Потім у пробірку додають 5 мл фізіологічного розчину, відбирають піпеткою отриману суспензію і переносять у колби з налитим поживним середовищем. Після 48 годин росту в колбах на качалці при 120 об/хв., культуральну рідину з колб переносять у стерильну колбу для засіву (5 л).

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

Для культивування рідкого посівного матеріалу в інокуляторі, переносять підготовлену до стерилізації композицію II (ДР 4.2.2), а композиції I (ДР 4.2.1) подають через гребінку та змішують. Процес культивування здійснюється за таких умов: $t = 31 \pm 1$ °С, n - 120 об/хв, τ - 48 год, $P = 0,02$ МПа. Під час вирощування посівного матеріалу відбирають зразки з інтервалом у 6 год.

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л

Для культивування рідкого посівного матеріалу в інокуляторі, за допомогою насосів переносять стерильну композицію II (ДР 4.3.2) у композиції I (ДР 4.3.1) та змішують. Процес культивування здійснюється за таких умов: $t = 31 \pm 1$ °С, n - 120 об/хв, τ - 48 год, $P = 0,02$ МПа. Під час вирощування посівного матеріалу відбирають зразки з інтервалом у 6 год.

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез

Виробниче культивування проводиться у ферментері (3000 л). У стерилізований ферментер за допомогою насосів додають готові композиції I та II (ДР 4.4.1 та ДР 4.4.2) та змішують. Також подається підживлювальний розчин глюкози (від ДР 3.2.1) через кожні 8 год по 9 г/л. Процес культивування здійснюють за таких умов: $t = 31 \pm 1$ °С, n - 320 об/хв, τ - 66 год., P - 0,02 МПа. Під час культивування відбирають зразки з інтервалом у 6 год.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю біосинтезу аргініну

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1. Приготування розчину каустичної соди	Концентрація	Хімічний метод, термометр	Після приготування розчинів	C = 2%
Кх 1.1.2. Приготування розчину «Хлорантоїн»	Концентрація	Хімічний метод, термометр	Після приготування розчинів	C = 0,2 %
Кт, Км 1.2.1, 1.2.2 Підготовка виробничих приміщень	Чистота поверхонь виробничих приміщень	Змиви тампонами або метод відбитків	Після прибирання	В змивах (10*10 см) допускається ріст не більше 50 м
Кт 1.3.1 Технологічний контроль миття обладнань та комунікацій	Обладнання та комунікації, температура	Термометр, годинник	В процесі проведення миття	$\tau = 10$ хв
Кт 1.3.2, 1.3.3 Технологічний контроль герметичності обладнання	Обладнання та комунікації, тиск	Датчик	Після миття обладнання	P = 0,15-0,2 МПа $\tau = 30$ хв
Кт, Км 1.3.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, режим стерилізації, тиск, температура	Манометр, термометр	Температура та тиск визначаються в процесі вироб. процесу	P = 0,30 МПа t = 135-140 °C
Кт 2.2 Очищення від пилу та механічних часточок	Повітря, ступінь очищення	Часточки бруду, манометр	В процесі подачі повітря	E = 80%
Кт 2.3 Стиснення повітря	Повітря, температура, тиск (стиснення)	Термометр, манометр технічний	Після стиснення повітря	P = 0,35-0,5 МПа t = 120-200 °C
Кт 2.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Повітря, температура, вологість повітря	Термометр, психрометричний метод	Після охолодження повітря, видалення зайвої вологи	t = 25-30 °C W = 60-70 %

					НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Милобог К.О.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					1	64
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Кт 2.5 Нагрівання повітря	Повітря, температура	Термометр	Після нагрівання	$t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 2.6 Очищення на головному фільтрі	Повітря, вміст часток, тиск	Манометр, перевірка очищення	Після очищення повітря у головному фільтрі	$E = 95\%$
Кт 2.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря, ступінь чистоти	Часточки бруду, манометр	В процесі подачі повітря	$E = 99,9\%$
Км, Кт 3.1.1 Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення	Розчин соляної кислоти, концентрація	Фізико-хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 6\%$
Км, Кт 3.2.1 Приготування та стерилізація глюкози для підживлення	Розчин глюкози, температура, час, тиск	Температура, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск та час в процесі стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30\text{ хв}$ $P = 0,05\text{ МПа}$
Км, Кт 3.2.2 Приготування та стерилізація розчину вітамін для підживлення	Розчин вітамінів тиск, температура, час	Манометр	Тиск в процесі стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30\text{ хв}$ $P = 0,05\text{ МПа}$
Км, Кт 4.1.1 Приготування та стерилізація поживного середовища А	Композиція А, температура, час, тиск	Манометр, годинник	Тиск в процесі стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30\text{ хв}$ $P = 0,05\text{ МПа}$
Км, Кт 4.1.2 Приготування та стерилізація поживного середовища Б	Композиція Б, температура, час, тиск	Манометр, годинник	Тиск в процесі стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40\text{ хв}$ $P = 0,15\text{ МПа}$
Км, Кт 4.1.3 Приготування та стерилізація поживного середовища В	Композиція В, температура, час, тиск	Манометр, годинник	Тиск в процесі стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40\text{ хв}$ $P = 0,15\text{ МПа}$
Км, Кт, 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск	Манометр, годинний	Тиск в процесі стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30\text{ хв}$ $P = 0,05\text{ МПа}$
Км, Кт, 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск	Манометр, годинник	Тиск в процесі стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40\text{ хв}$ $P = 0,15\text{ МПа}$
Кт, Км 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск	Манометр, годинник	Тиск в процесі стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30\text{ хв}$ $P = 0,05\text{ МПа}$
Кт, Км 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск	Манометр, годинник	Тиск в процесі стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 40\text{ хв}$ $P = 0,15\text{ МПа}$
Кт, Км 4.4.1	Композиція А,	Манометр,	Тиск в процесі	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$

Приготування та стерилізація композиції А	температура, час, тиск	годинник	стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$\tau = 30$ хв $P = 0,05$ МПа
Кт, Км 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск	Манометр, годинник	Тиск в процесі стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131$ °С $\tau = 40$ хв $P = 0,15$ МПа
Кт, Км 5.1. Підтримання колекційної культури	Температура, час, стерильність	Термометр, час, мікробіологічний контроль	Температура, час та зовнішній вигляд в процесі підтримання культури	$t = 3-4$ °С $\tau = 3-4$ міс. відсутність сторонньої мікробіоти
Км, Кт 5.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і зовнішній вигляд в процесі вироб. проц. Мікробіологічний контроль після закінченню процесу	$t = 31$ °С $\tau = 48$ год відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах	Посівний матеріал, час, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 31$ °С $\tau = 48$ год відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування Посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, час, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	В процесі вирощування культури в посівному апараті і в кінці	$t = 31$ °С, $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.5. Вирощування Посівного матеріалу в інокуляторі 30 л	Посівний матеріал, час, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	В процесі вирощування культури в посівному апараті і в кінці	$t = 31+1$ °С, $\tau = 48$ год, $w=120$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 300 л	Посівний матеріал, час, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	В процесі вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу	$t = 31+1$ °С, $\tau = 48$ год, $w=120$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6 Виробничий біосинтез	Посівний матеріал, час, швидкість перемішування, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, рН метр	В процесі вирощування культури у ферментері. Відбір проби культуральної рідини відбувається кожні 8 год	$t = 31+1$ °С, $\tau = 66$ год, $pH = 7,2$ $w=320$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти

8.2. Мікробіологічний контроль

Якість посівного матеріалу можна визначити мікроскопіюванням. Для мікроскопічних спостережень використовують препарати "роздавлена крапля".

Метод приготування препаратів "роздавлена крапля" полягає в тому, що в центр чистого предметного скла поміщують невелику краплю води, наносять невелику кількість живильного середовища, перемішують, накривають покривним склом і проводять мікроскопію [14].

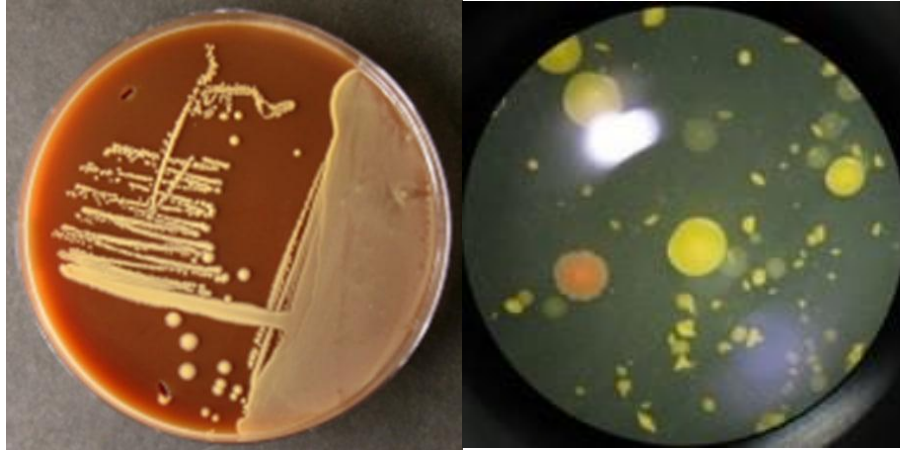


Рис. 8.2.1. *Brevibacterium flavum* на поживному середовищі та клітини мутантного штаму *Brevibacterium flavum* на середовищі.

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначають непрямим методом за оптичною густиною суспензії клітин визначають біомасу, яку перераховують на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка, але через труднощі середовища і технічні характеристики кінцевого продукту біомасу вимірюють на етапі отримання насіння.

Метод заснований на вимірюванні інтенсивності світла при його проходженні через суспензію. Мікробні клітини поглинають і розсіюють світло, інтенсивність залежить від кількості та розміру клітин.

З культурального середовища відбирають 10 мл зразка. Зміна інтенсивності світла при проходженні через суспензію вимірюється за допомогою спектрофотометра. Використовуючи спектрофотометр, обирають довжину хвилі, за якої поглинання світла клітинної суспензії є мінімальною (540-650 нм). При високих концентраціях вторинне розсіювання світла в культуральному середовищі призведе до зниження результатів. Тому висококонцентровані суспензії треба

розбавляти водою перед вимірюванням. Для побудови калібрувальної кривої міряють світлорозсіювання суспензій з різним вмістом клітин, а потім визначають кількість біомаси в кожній суспензії [15].

8.3.2. Концентрація цільового продукту

Концентрацію аргініну вимірюють з надосадової рідини після осадження біомаси. Для цього 100 мл культурального середовища відбирають у центрифужну пробірку і центрифугують при 5000 об/хв протягом 15 хв. Потім до досліджуваного зразка (20 мл) додають 0,1% розчин 8 гідроксихіноліну в ацетоні (10 мл), а потім розчин бромиду (0,2 мл Br₂ в 100 мл 0,5 М NaOH). Реакція з аргініном та іншими гуанідинами проявить помаранчево-червоне забарвлення. Інтенсивність забарвлення вимірюють при 500 нм на спектрофотометрі проти холостого зразка.



Для цього тесту рекомендовано використовувати спектрофотометр ULAB 101. Довжину хвилі цього приладу можна регулювати вручну. Кремнієвий фотодіод і дифракційна решітка 1200 штр/мм забезпечують високу точність вимірювання [18].

Рис.8.3.2. Спектрометр ULAB 101

8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Brevibacterium flavum використовує азот та вуглець як джерела поживних речовин. Для визначення концентрації джерел азоту ((NH₄)₂SO₄, кукурудзяний екстракт та сечовина) й вуглецю (глюкоза) в *Brevibacterium flavum* використовують спеціальні хімічні методи аналізу.

Щоб визначити *концентрацію азоту* використовують метод формольного титрування, який заснований на блокуванні вільних аміногруп за допомогою формальдегіду при рН 7,0 та титрування лугом еквівалентної кількості

карбоксильних груп (титрування визначають потенціометрично). Вносять 2 мл, у склянку на 50 мл, досліджуваного розчину живильного середовища і доводять дистильованою водою до 20 мл. Занурюють електроди потенціометра, рН доводять до 7,0 за допомогою 0,1 М розчину NaOH або HCl. Потім додають 2,0 мл формаліну, перемішують і використовуючи 0,1 М розчин NaOH відтитровують до рН 9,1 [16,22].

Для визначення *концентрацію вуглецю* використовують глюкозооксидазний метод, суть якого полягає в окисненні глюкози з утворенням пероксиду водню, який у подальшому окислює ортотолуїдин з утворенням забарвленої сполуки, оптичну густину якої визначають за довжини хвилі 625 нм [17].

8.4. Показники якості готового продукту

Як фармацевтичні субстанції використовуються кристали аргініну. Фармацевтичні субстанції - це органічні або неорганічні речовини, що використовуються як активні інгредієнти (діюча речовина) або допоміжні речовини у виробництві лікарських засобів для людини. Основними показниками контролю субстанцій є мікробіологічна чистота, вологість продукту і концентрація аргініну.

Аналіз концентрації амінокислот. Цей аналіз виконується за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Хроматографія - це фізико-хімічний метод, який використовується для розділення та аналізу сумішей. В основі методу лежить диспергування суміші компонентів між двома фазами - нерухомою і рухомою.

Експеримент проводять наступним чином: кристали аргініну розчиняють у цитратному буфері при рН 2,2 і аналізують на колонці, заповненій катіонами Ostion LGAN (параметри колонки: № 1: L = 600 мм, d = 8,0 мм; № 2: L = 700 мм, d = 7,0 мм) аналізували методом ВЕРХ. Елементи знаходилися в цитратному буфері (рН = 3,25, 4,25 і 5,28), робочий тиск колонки 1 становив 14-16 кПа/см³, а колонки 2 - 4-8 кПа/см³. Об'єм досліджуваного розчину становив 100 мкл. Використовували стандартне додавання зразків амінокислот у концентраціях 10-1000 пмоль/мкл.

Концентрацію речовини визначали забарвленням з розчином нінгідриду при $t = 100^{\circ}\text{C}$ за допомогою кювети фотометра при $\lambda = 520 \text{ нм}$ [25].

Мікробіологічний аналіз чистоти. Мікробіологічний контроль проводиться в кілька етапів. Першим етапом розчиняють кристали аргініну у дистильованій воді, а отриману суспензію розкладають на чашки Петрі (виснажуючий штрих). Для виявлення бактерій використовують м'ясо-пептонний агар. Для мікроскопії використовується препарат "роздавлена крапля". Цей препарат готують на безмасляному предметному склі, наносять на нього невелику краплю живильного середовища, накривають покривним склом і спостерігають за допомогою об'єктива з 40-кратним збільшенням. Згідно ДФУ допустимою нормою є: загальні аероби 10^3 КУО/г або менше.

Контроль вологості готової продукції. Вологість готової продукції можна перевірити за допомогою термогравіметричного аналізатора вологості. Для проведення вимірювання необхідно зважити 10 г готового продукту, відкалібрувати прилад і визначити початковий вміст вологи. Потім прилад вмикається і ставиться в режим очікування; після завершення аналізу на дисплеї з'являється інформація про вологість і температуру. Вологість готового продукту повинна становити 5% [24].

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації

Фільтрація є одним з найважливіших етапів процесу розділення продукту. Оскільки амінокислоти є екзометаболітами і присутні у фільтраті, хороше або погане відділення біомаси від фільтрату має значний вплив на якість наступних етапів.

Процес фільтрації відбувається наступним чином. З колектора, де культуральне середовище зберігається при температурі 20°C, культуральне середовище за допомогою відцентрового насоса подається в перехресний фільтр і фільтрується під тиском 0,2 МПа. Потім фільтрат подається в колектор. В результаті аналізу технологічного процесу було зроблено висновок, що автоматизація даного технологічного процесу забезпечує:

- контроль і регулювання температури в збірнику фільтрату шляхом зміни подачі пари від ТЕЦ
- контроль та регулювання роботи насосу для подачі культурального середовища на фільтр;
- контроль та регулювання тиску під час фільтрації
- контроль рівня рідини в збірнику фільтрату.

НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Милобог К.О.			РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					1	64
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Технологічні вимоги до системи автоматизації

№ п/п	Машина, апарат, агрегат	Параметр, місце відбору імпульсу	Значення параметру, допустимі відхилення	Система автоматизації		
				Вид системи автоматизації	Характер контролю, регулювання, управління	Додаткові вимоги
1	Збірник культуральної рідини	Температура середовища	20±1°C	Контроль	Відображення	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
2	Збірник культуральної рідини	Рівень рідини в апаратурі	75 ± 3%	Контроль	Відображення	АРМ оператора
				Управління	Захист від переповнення збірника	Вплив на подачу КР в збірник
3	Насос	Ввімкнення та вимкнення	Ввімкнено чи вимкнено	Управління	Ручне та дистанційне	Пуск та зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
4	Cross-flow фільтр	Тиск в апараті	0,2 МПа ± 0,02 МПа	Контроль	Відображення	АРМ оператора
5	Збірник фільтрату	Рівень рідини в апараті	75 ± 3%	Контроль	Відображення	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Дія на подачу фільтрату

Основним завданням при виборі технічних заходів є забезпечення роботи системи автоматизації з достатньою якістю і мінімальними капітальними витратами, при цьому враховуючи можливість зміни конфігурації завдань автоматизації процесів.

9.2.Опис схеми автоматизації

Перший контур. Автоматичний цикл моніторингу та контролю вимагає моніторингу та контролю температури в резервуарі з культуральним середовищем, як показано в таблиці. Стандартне значення становить 20°C з відхиленням ±1°C. Це відхилення відстежується на робочому місці оператора процесу і записується в архів. Температура вимірюється термометром, вбудованим в корпус колектора. З огляду на те, що вимірювання температури відбувається безперервно в часі в певному діапазоні, необхідно використовувати датчик, який отримує аналоговий сигнал. Серед низки пристроїв, доступних на ринку, ми обрали термометр опору TR-30 (виробництва Німеччини). Цей прилад був обраний тому, що його технічні

характеристики повністю відповідають поставленим вимогам (діапазон вимірювання від -50 до 250°C).

Другий контур. Задано дві функції, оскільки другий контур включає в себе сигналізацію аварійного підвищення рівня в колекторі та захист від його переповнення: "контроль" у вигляді повідомлення про аварійну ситуацію оператору на робочому місці техника-оператора і усунення шляхом припинення подачі рідини в колектор у разі перевищення рівня рідини. Оскільки контроль рівня відбувається тільки на верхньому рівні і сигнал є дискретним (два стани: відкритий і закритий), то для реалізації схеми необхідно розглянути приклад сигналізації, що отримує такий сигнал від датчика. Обраний датчик - російський датчик PV-SU-201. Діапазон робочих температур - 45-60°C. Діапазон вимірювання рівня - 0,2-2 м.

Третій контур. Включає в себе завдання керування насосом. Для цього в таблиці наведено функції керування, які дозволяють "запускати" та "зупиняти" насос з робочого місця оператора-механіка. Крім того, для захисту персоналу та обладнання повинна бути передбачена аварійна зупинка насоса за допомогою кнопки "стоп".

Четвертий контур. Має завдання контролювати тиск в апараті. Використовуються тільки функції управління, і це повинно бути реалізовано на робочому місці техника-оператора. З огляду на те, що вимірювання тиску відбувається безперервно в часі в певному діапазоні, слід розглядати датчики, які отримують аналоговий (безперервний) сигнал. Були обрані датчики IFM Electronic з діапазоном вимірювання 0-250 бар і робочою температурою від -2 до 80°C.

П'ятий контур. Заповнює таблицю з тих же причин, що і перший контур.

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

Технологія виробництва амінокислоти аргініну включає наступні стадії: передферментаційні допоміжні процеси (гігієна виробництва, приготування та стерилізація розчинів для титрування, приготування та стерилізація середовища для отримання посівного матеріалу, приготування та стерилізація середовища для біосинтезу аргініну, процес ферментації, постферментаційний процес.

1. Санітарна підготовка виробництва.

Цей етап включає в себе поточне та генеральне прибирання з використанням миючих засобів. В кінці процесу залишки розчину зливаються в каналізаційну систему.

2. Підготовка та стерилізація середовища для виробництва посівного матеріалу та виробничого біосинтезу.

На цьому етапі сировина може не відповідати встановленим стандартам. У такому випадку сировина відбраковується. Тому саме на цьому етапі утворюються викиди твердих відходів (відходи на цьому етапі представлені пакувальними матеріалами, отриманими з сировини).

3. Підготовка посівного матеріалу.

На цьому етапі виробляється насіння, яке потім масштабується в інокулятори. Посівний матеріал використовується для інокуляції у ферментатор і для біосинтезу продукції, тому його відходи не включені до загального обсягу. Оскільки продуцент *Brevibacterium flavum* є аеробною бактерією, необхідно забезпечити належну вентиляцію культурального середовища під час інкубації, що призводить до утворення великої кількості відпрацьованого повітря.

					НУХТ БТЕК 05.01.11 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Милобог К.О.			РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					1	64
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

4. Виробничий біосинтез.

На цьому етапі виробляється культуральне середовище, що містить продукт біосинтезу - амінокислоту аргінін. Оскільки культуральне середовище подається з ферментатора в збірну ємність, призначену для виділення цільового продукту, на цьому етапі немає відходів. Оскільки вихлоп містить спори бактерій, ця стадія є джерелом газоповітряних викидів.

10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

У процесі виробництва амінокислот не використовуються і не утворюються токсичні речовини, тому біологічна активність організмів активного мулу не порушується. Тому слід використовувати анаеробно-аеробну технологію очищення стічних вод.

Спочатку стічні води з високою концентрацією піддаються механічному очищенню. Вони потрапляють на решітку для видалення грубих домішок, а потім у пісковловлювач для видалення дрібних мінеральних домішок, які негативно впливають на роботу очисних споруд. Після механічного очищення стічні води змішуються з менш забрудненими стічними водами (наприклад, водою для миття обладнання).

Наступним етапом є анаеробне зброджування стічних вод. Для забезпечення цього процесу використовуються метантенки, які розщеплюють забруднюючі речовини без доступу кисню повітря під впливом анаеробних мікроорганізмів активного мулу. Метанове бродіння оскільки процес прискорюється за рахунок підвищення температури. В результаті утворюється біогаз, який можна використовувати як альтернативне джерело енергії.

Після метантенку стічні води потрапляють у відстійник для відділення анаеробного активного мулу від води. Частина мулу повертається в аеротенк як циркулюючий активний мул для підтримання постійної концентрації, а надлишковий активний мул скидається у мулову яму.

Наступним етапом є очищення стічних вод в аеробних умовах. Це очищення відбувається в аеротенку, де відбувається остаточне розкладання забруднюючих речовин. Після аеротенку стічні води потрапляють у вторинний відстійник, де активний мул відокремлюється від води. Частина мулу повертається в аеротенк у вигляді циркулюючого активного мулу для підтримання постійної концентрації, а надлишковий активний мул скидається у мулову яму. Заключним етапом є знезараження стічних вод шляхом хлорування.

Після анаеробного та аеробного очищення стічні води можна скидати у відкриті водойми без шкоди для водних організмів [29].

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Враховуючи невелику кількість твердих відходів, що утворюються при виробництві амінокислот, це знімає проблему зменшення їх кількості. Для утилізації тари з-під миючих засобів та упаковки проміжних компонентів їх попередньо сортують і відправляють на переробку в центри вторинної переробки. Бактеріальні тверді речовини можна переробляти у вермикультурі. Після переробки ці відходи можна використовувати як добриво для сільського господарства.

Спочатку готується органічно-мінеральна компостна суміш (органічні відходи та структуроутворювачі змішуються і зволожуються до 80%). Потім суміш засівають дощовими черв'яками. Найчастіше використовується вид *Eisenia foetida*. Період компостування становить 1-3 місяці. За цей час дощові черв'яки досягають поверхневого шару ґрунту, який потім використовується для повторного розміщення відходів [30].

10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Газоповітряні відходи очищують в біофільтрах. Очищувальний газ проходить через шар адсорбенту, який зрошується для підтримання рівня вологості, достатнього для виживання мікроорганізмів. Забруднюючі речовини адсорбуються матеріалом шару адсорбенту і розкладаються мікроорганізмами. Схема процесу показана на рис. 10.2.3 [31].

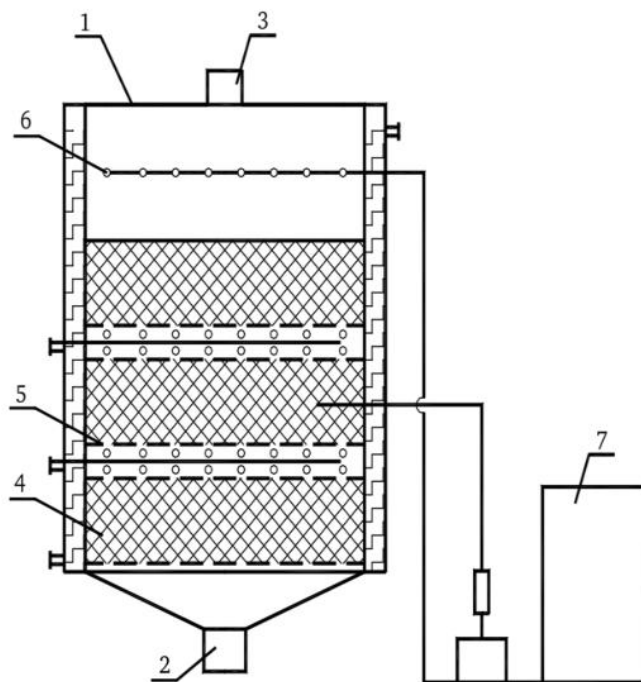


Рис. 10.2.3. Біофільтр з горизонтальними шарами, що фільтрують:

1 - корпус; 2 - патрубок введення очищувального газу; 3 - патрубок виведення очищеного газу; 4 - шар фільтруючого матеріалу; 5 - опорна решітка; 6 - зрошувач фільтруючого шару; 7 - ємність з культуральною рідиною

10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Газоповітряні відходи можуть бути очищені фізико-хімічним методом. Відпрацьоване повітря за допомогою циркуляційного насоса подається в трисекційну абсорбційну камеру. В якості рідких адсорбентів в цій камері використовуються водні розчини перекису водню або хлораміну. Це перший етап очищення повітря від спорових аерозолів. На другому етапі очищення вихлопних газів для повної стерилізації після абсорбера встановлюється камера УФ-опромінення. Після двоступеневого процесу вихлопні гази можуть бути використані для подальших біотехнологічних цілей або випущені в навколишнє середовище [28].

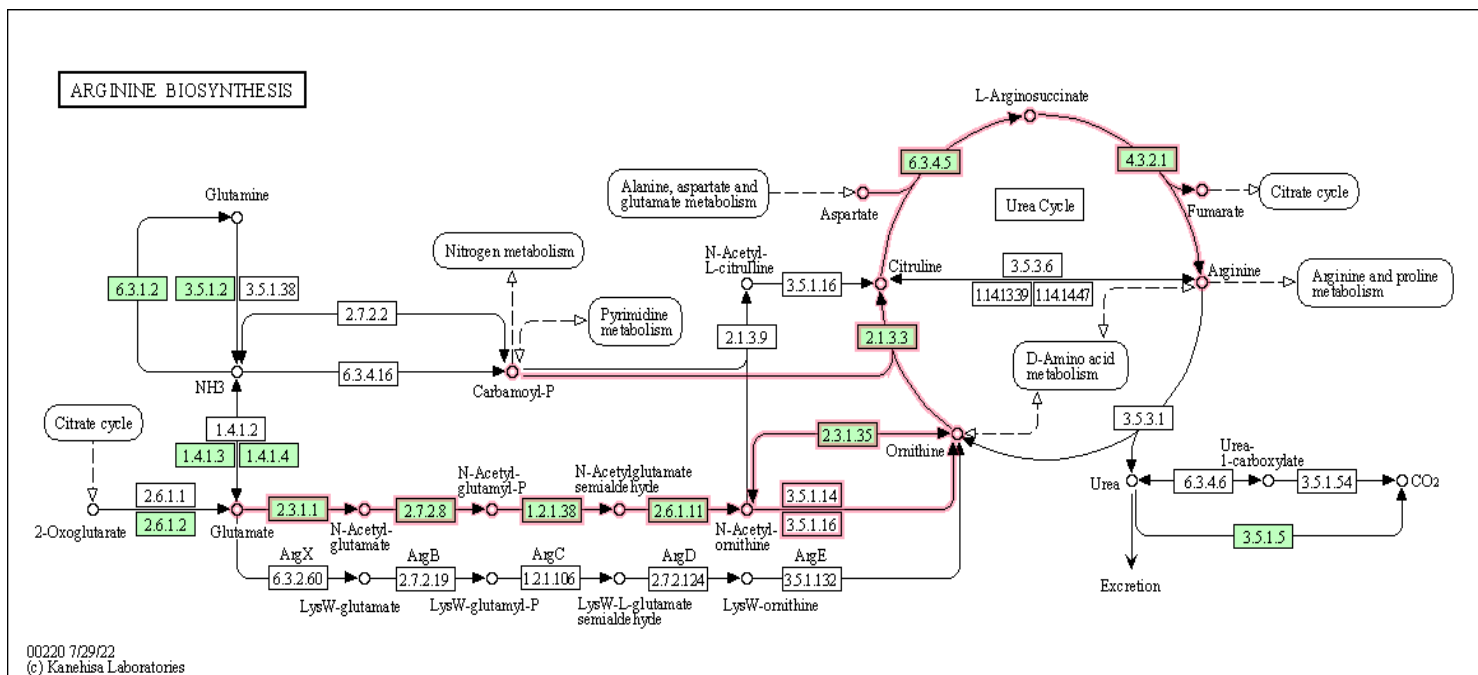
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Пат. № 102154160 Китай. Strain capable of producing L-arginine and method for producing L-arginine by same. / Li Shaofang, Jiamao Chen, Weibin Xu, Zhenghong Zheng Pu, Sun Zhihao. – Опубл.: 2010, Fujian gutian pharmaceutical.
2. Vance L. Albaugh, Adrian Barbul. Arginine // Reference Module in Life Sciences, 2017, 317-336 с.
3. Arginine: heart benefits and side effects. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.webmd.com/heart/arginine-heart-benefits-and-side-effects#1>
4. Arginine effects. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://examine.com/supplements/arginine/>
5. Wu G, Morris Sm Jr. . Arginine metabolism: nitric oxide and beyond // Biochem J. 1998, 336 с.
6. Биохимия. Практикум: Учебное пособие по курсу «Медицинская биохимия» /Л.А. Ганеева, Л.И. Зайнуллин, З.И. Абрамова, Н.Х. Тенишева. - Казань: ИСБ, 2015. - 176 с.
7. Аргінін-дарниця. [Електронний ресурс] - Режим доступу: [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[24476\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[24476])
8. Ударцева Т.П., Даленов Е.Д., Недостаточность аргинина и ее возможные механизмы // Вестник КазНМУ, №5 (1), 2013, 225-258 с.
9. Топ-10 аргинина. [Електронний ресурс] - Режим доступу: https://bcaa.ua/luchshee_sportivnoe_pitanie/top_arginin
10. Гепатит в Україні: епідеміологічна характеристика та оцінка тягаря, Сергеева Т.А., Іванчук І.О. – Київ, 2018, 111 с.
11. L-аргинин. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/319251/>
12. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.13 – інфекційні хвороби. – Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського АМН України, Київ, 2003.

13. Ферментатор Sartorius BIOSTAT® Cplus. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://sartorius.com.ua/ru/fermentory-i-bioreaktory/sterilizuemye-na-meste-fermentery-bioreaktory-cip/biostat-cplus/>
14. Біологія клітин. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання / уклад.: В.О. Красінько, І.М. Волошина. – К.: НУХТ, 2014. – 147 с.
15. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації «Фармацевтична хімія. Аналіз препаратів біотехнологічного виробництва» / За загальною редакцією професора В.А. Георгіянци. – Харків: 2013. – 215 с.
16. Аналізатор азота, белка LOIP LK-500 по Кьельдалю. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.dia-m.ru/lab/belkaazota-analizatory/loiploip-lp-500-analizator-azotabelka-loip-lp-500-avt/>
17. Пирог Т.П., Антонюк М.М., Ігнатенко С.В. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 "Біотехнологія" ден. форми навч. — Київ : НУХТ, 2010. — 127 с.
18. Сорочан О.О., Штеменко Н.І. Методи аналізу амінокислот: Навч.метод. посіб. – Д.: РВВ ДНУ, 2005. – 60 с.
19. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова // К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
20. Люлина Н. В. Стандарты подготовки помещений // Чистые помещения и технологические среды. – 2014. – №1 (53).
21. Міщиряк В.Г. Сучасні гігієнічні вимоги до миття та дезинфекції на харчових підприємствах//Підручник. – Донецьк. – 2012. – 33 с.
22. Chinen A., Kozlov Y.I., Yoshihiko H., Hiroshi I. and Hisashi Y. Innovative metabolic pathway design for efficient L-Glutamate production by suppressing CO2 emission // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2007. – Vol. 103. – P. 262-269.
23. Наказ від 14.12.2001 № 502 Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного

- контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів [Електронний ресурс].
– Режим доступу: https://zakononline.com.ua/documents/show/41907_487517
24. Вологомір. [Електронний ресурс] - Режим доступу:
https://ozonet.com.ua/ua/vologomir-sipuchih-materialiv-tk-100?gclid=Cj0KCQjw9_mDBhCGARIsAN3PaFMVuUM5UU1Sj60O6Mi1SMyscDB3nttPb0UvOE6Pr8D5B_IIQbW8Q6waAihiEALw_wcB
- Дослідження амінокислотного складу рослинної сировини. [Електронний ресурс] -
Режим доступу: <http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/70706/67976>
26. Амінокислота Аргінін. [Електронний ресурс] - Режим доступу:
<http://zno.academia.in.ua/mod/book/view.php?id=3818>
27. Л-аргінін (L-arginine). [Електронний ресурс] - Режим доступу:
<https://compendium.com.ua/dec/319251/>
28. Перушкина Е.В., Хабибуллина А.Р., Александровский С.А. Выбор способа очистки отработанного воздуха при культивировании спорообразующих бактерий // Вестник Казанского технологического университета. 2014. №19.
29. Біологічне очищення стічних вод виробництва амінокислот. [Електронний ресурс] - Режим доступу:
http://www.rusnauka.com/1_NIO_2013/Ecologia/4_123697.doc.htm
30. Отримання біодобрив шляхом вермикомпостування відходів. [Електронний ресурс] - Режим доступу:
https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/28509/1/Ladanovska_bakalavr.pdf
31. Ручай, Н. С. Экологическая биотехнология : учеб. пособие для студентов специальности «Биоэкология» / Н. С. Ручай, Р. М. Маркевич. – Минск : БГТУ, 2006. – 312 с.
32. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія // Підручник. – К.: НУХТ, 2004.– 471 с.
33. Metabolic engineering of microorganisms for the production of L-arginine and its derivatives. Jae Ho Shin Chalmers, Sang Yup Lee. 2014
34. Оптимизация условий ферментации и состава ферментационной среды для биосинтеза L-аргинина штаммом – продуцентом *Brevibacterium flavum* /А.О. Колоян, А.С. Овсебян. Биолог. журн. Армении, 2009.

35. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. / Edited by G. John, Holt Williams & Wilkins // Baltimor, 1994. – 787 p.
36. Brevibacterium. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://en.wikipedia.org/wiki/Brevibacterium>
37. Production of Arginine by Fermentation. Takashi Utagawa. The Journal of Nutrition, 2004. 245–285
38. Міщиряк В.Г. Сучасні гігієнічні вимоги до миття та дезинфекції на харчових підприємствах. Підручник. – Донецьк. – 2012. – 33 с
39. Production of l-arginine in *Brevibacterium flavum*: Physiological mechanism, genetic modulation, and prospects. Qi Sheng, Xiao-Yu Wu, Xinyi Xu, Xiaoming Tan, Zhimin Li, Bin Zhang. China 2010.
40. Способ получения l-аргинина, штамм *Escherichia coli* - продуцент l-аргинина./ Гусятинер М.М., Леонова Т.В., Птицын Л.Р., Ямпольская Т.А. 2003



Номер штаму: ~~~~~	Виробництво L-аргініну (g/L)
HX0918	30.6
HX1000	34.1
H1001	34,0
HX1003	31.9
HX1005	33.1
HX1009	37.6
H1011	32.6
HX1013	33.6
HX1014	32.3

За допомогою мутагенезу NTG отримайте мутантний штам HX1009 (His, Suc, D-Arg², SMC⁻), струсіть пляшку та отримайте кислоту 37,6 г/

Це

Втілення 3

Мутантний штам *Brevibacterium flavum* HX1009 виробляє аргінін шляхом ферментації в 5-літровому та 15-літровому ферментері

Мутантний штам IIX L009, який піддається скринінгу та культивується за варіантом 1 і варіантом 2, насіння, яке він культивує, инокулюють у ферментаційне середовище ємності 5 л, 15 л у кількості 10% і ферментують, середовище для ферментації: глюкоза 100 г/л, сечовина 1 г/л, кукурудзяний розчин 25 г/л, (NH₄)₂SO₄ 40 г/л, KH₂PO₄ 1. 1_г/л, K₂HPO₄ • 3H₂O 0,5 г/л, MgSO₄ • 7H₂O 0,5 г/л, L-His 1 мг/л, біотин 0,05 мг/л, тіаміну гідрохлорид 0,2 мг/л, початковий рН середовища становив 7,0-7,2. Резервуар для бродіння автоматично контролює температуру бродіння 30 ± 1 °С, регулює рН 6,5 ~ 7 за допомогою 25% аміачного розчину, швидкість перемішування 300 об/хв ~ 850 об/хв у процесі бродіння, швидкість вентиляції 1:0,5 1:3 (об/об), регулюється відповідно до стану розчиненого кисню. Процес бродіння зрозумілий Глюкозу та кукурудзяний розчин подавали через перистальтичний насос і ферментували протягом 60-96 годин відповідно, і шість партій бродіння накопичували L-аргінін- Див. Таблицю 3 для ситуації рівня.

Таблиця 3 Результати випробування ферментера 5 ~ 15 л

[0060]

□ 次 (L)	发间 (h)	流糖 (g/L)	糖 (g/L)	Залишок бродіння (g/L)	Цукрова кислота (g/L)	Обмінний курс (%)	Тан Пісян (%)	виробляти курс 度 [g/(L·h)]
一 5	67	202	0	49.1	24.31	100	0733	
二 5	71	207	0	48.8	23.60	100	0.687	
三 5	60	200	0	202	25.10	100	0.837	
四 5	96	310	45	70.6	22.73	85.5	0.735	
五 15	66	224	33	54.1	23.12	85.9	0.820	
六 15	63	234	0	55.1	24.38	300	0.875	

[0061] Приклад 4

[0062] Мутантний штам *Brevibacterium flavum* HX1009 ферментував і виробляв аргінін у 5 резервуарах ферментації.

насіння [0063] Натисніть метод для варіанту 3, культивуйте насіння мутантного штаму HX1009, насіння, яке буде культивуватися, инокулюють 10% кількістю

Ding 5L, 15L, 5 M * резервуар бродіння. Відповідно до методу прикладу 3, контрольна температура бродіння 30 ~ 31 °C, швидкість перемішування 300 об/хв 850 об/хв, рН 6,5 7, 1:0,5 1:3 (об./об.), N, ODKURRAM і кукурудзяний розчин, культура 72 години, дані процесу ферментації 5 M наведені в таблиці 4.

Таблиця 45M процес бродіння в резервуарі

[0065]

Час бродіння/год	pH	Розчинений кисень DO/% бактерій OD (1/100)	发酵残糖 РГ/г/1.	L. Arg/г/л
0	7.20	72,6	10,05	102,2
2	7,50	57,8	0,08	100,1
4	7,12	18,0	0,12	100,2
6	7,22	10,2	0,14	98,6
8	7,22	31,2	0,16	92,2
10	7,02	41,4	0,38	86,3
12	6,92	36,6	0,10	77,8
14	6,98	29,2	0,11	70,2
16	6,96	22,6	0,52	60,6
18	6,82	25,8	10,51	52,5
20	6,76	20,8	10,60	80,9
22	6,76	23,3	0,64	62,9
26	6,82	22,9	0,76	42,9
30	6,72	17,6	0,84	80,0
34	6,68	23,8	0,88	66,5
38	6,76	24,3	10,90	56,2
42	6,78	29,1	10,92	82,9
46	6,76	20,6	0,96	68,8
50	6,76	28,8	1,02	16,2
54	6,76	30,2	1,02	66,2
58	6,80	26,8	1,04	38,6
62	6,92	26,3	1,07	20,2
66	7,08	58,2	1,06	10,8

Як видно з таблиці 4, за умов цього експерименту коротка жовта паличка (*Brevibacterium flavum*) мутантний штам HX1009 (His, Suc, D-Arg, SMC), 5M * 66, SRABE концентрація глюкози 202 г/л, концентрація залишкового цукру при бродінні становила 10,8 г/л, виробництво L-аргініну становило 55,5 г/л, вихід вхідного цукру становив 24,95 %, коефіцієнт використання цукру становив 94,65 %, а інтенсивність виробництва становила 0,841 г/(л·год).