

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Грегірчак Н.М.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« ___ » червень 2021 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« ___ » червень 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Біосинтез фенілаланіну *Escherichia coli*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2

Зведенюк Олексій Олексійович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Ключка Лілія Вікторівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти Клименко О.М.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент Коростельова В.О.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2021 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 «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Зведенюка Олексія Олексійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез фенілаланіну *Escherichia coli*

керівник роботи Ключка Лілія Вікторівна, асистент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 04 червня 2021 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент : *Escherichia coli*, цільовий продукт: фенілаланін кристалічний

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва фенілаланіну – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва фенілаланіну – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки ультрафільтрації - 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>01.04.21 - 07.04.21</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>08.04.21 - 15.04.21</i>	
3.	<i>Техніко – економічне обґрунтування.</i>	<i>15.04.21 - 20.04.21</i>	
4.	<i>Біосинтез цільового продукту</i>	<i>20.04.21 - 25.04.21</i>	
5.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>26.04.21 - 30.04.21</i>	
6.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>01.05.21 - 06.05.21</i>	
7.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>07.05.21 - 15.05.21</i>	
8.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>16.05.21 - 18.05.21</i>	
9.	<i>Автоматизація ділянки виробництва</i>	<i>18.05.21 - 22.05.21</i>	
10.	<i>Охорона довкілля.</i>	<i>23.05.21 - 27.05.21</i>	
11.	<i>Оформлення пояснювальної записки</i>	<i>07.05.21 - 28.05.21</i>	
12.	<i>Виконання графічної частини проекту</i>	<i>05.05.21 - 28.05.21</i>	

Здобувач

_____ (підпис)

Зведенюк О.О.

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Ключка Л.В.

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Робота присвячена розробці проекту виробництва фенілаланіну у вигляді сухих кристалів культивуванням рекомбінантного штаму *E.coli* X11p3, який здатен синтезувати 61,3 г / л амінокислоти на середовищі, джерелом вуглецю в якому є глюкоза.

Кристалічний фенілаланін використовується як компонент амінокислотних інфузійних розчинів для парентерального харчування, що застосовуються у випадках тяжкого перебігу хвороб шлунково – кишкового тракту.

Технологія виробництва передбачає проведення допоміжних робіт (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація допоміжних розчинів, приготування та стерилізація запасних розчинів, приготування та стерилізація поживних середовищ) та основних процесів (підготовка посівного матеріалу, виробничий біосинтез, зберігання культуральної рідини, відділення біомаси, очистка та концентрування цільового продукту, виділення цільового продукту, кристалізація цільового продукту, сушіння, фасування, пакування та маркування), що наведені у технологічній та апаратурній схемах.

Дипломний проект викладено на 106 сторінках друкованого тексту містить 19 таблиць, 8 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (53 джерела) та графічної частини (3 креслення формату А1).

Ключові слова: фенілаланін, *E.coli* X11p3, біосинтез, технологія, виділення.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	8
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	10
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	22
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	30
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	33
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	55
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	64
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	83
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	94
РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	98
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	103

ВСТУП

Амінокислоти — це органічні сполуки, що містять у своєму складі одночасно карбоксильну та аміногрупу. Ці сполуки є мономерами білків, у складі яких, амінокислотні залишки з'єднані пептидними зв'язками.

Фенілаланін – одна з двадцяти стандартних амінокислот. Окрім того, дана сполука є протеїногенною амінокислотою і входить до складу багатьох білків, наприклад інсуліну, гемоглобіну та фібрину.

В людському організмі фенілаланін виконує роль своєрідного «будівельного матеріалу» для синтезу білка. Для людини високі концентрації фенілаланіну є токсичними, саме тому надлишок амінокислоти завдяки дії ферменту фенілаланін – 4 – монооксигенази перетворюється у тирозин [1].

Окрім того, нестача фенілаланіну може призвести до вкрай негативних наслідків, тому він широко застосовується у медичній та фармацевтичній галузях, зокрема як компонент розчинів для інфузій.

Амінокислотні інфузійні розчини використовуються при неможливості ентерального харчування, у тяжких випадках захворювань травних органів і порушенні функцій травної системи (обструкція травного тракту, синдром мальабсорбції, запальні захворювання кишечника, панкреатит, кишкові свищі, неспецифічний виразковий коліт) [2].

На українському фармацевтичному ринку виробництво подібних препаратів відсутнє і в медичній практиці застосовуються лише закордонні лікарські засоби, але враховуючи їх високу вартість, регулярний імпорт не є рентабельним, і державі необхідно самостійно задовольнити певний відсоток від загальної потреби населення.

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Зведенюк О.О.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Ключка Л.В.					4	1106
Реценз.						6		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

Метою даної роботи є проектування ділянки виробництва (апаратурна та технологічна схеми) субстанції фенілаланіну бактеріями *Escherichia coli* X11p 3 у вигляді сухих кристалів для їх подальшого очищення, пакування та використання у складі інфузійних розчинів.

Актуальність теми. Фенілаланін є важливим компонентом білків людини. Розробка оптимальної технології синтезу та очищення цільового продукту дозволить істотно покращити та спростити процес лікування пацієнтів з тяжкими перебігом хвороб шлунково — кишкового тракту.

Новизна. Штаму *E. coli* X11p 3 — найперспективніший продуцент фенілаланіну через здатність до надситезу (61,3 г/л цільового продукту). Окрім того, даний штам здатний до росту на відносно дешевих і простих за складом поживних середовищах [3].

Технологія виділення дозволяє отримати цільовий продукт з високим показником чистоти (99%). У процесі виділення використовуються сучасні апарати та установки, наприклад, вугільний фільтр та нанофільтраційна мембрана [4].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Фенілаланін – одна з двадцяти стандартних амінокислот. У людському організмі бере участь у синтезі білка.

У структурі даної амінокислоти міститься бензольне кільце (рис.1.1), яке не може самостійно синтезуватись живими організмами, тому фенілаланін відносять до незамінних амінокислот.

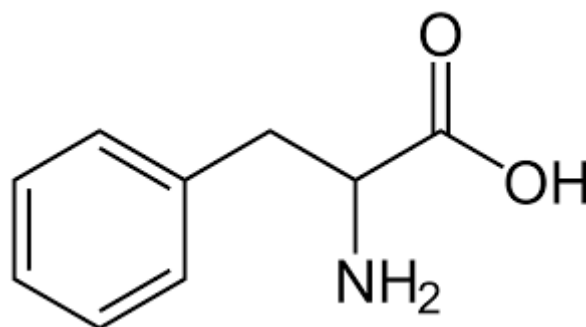


Рис. 1.1. - Хімічна формула фенілаланіну

Фенілаланін є важливим компонентом, що бере участь у синтезі білка, тому отримав широке застосування у фармацевтичній а медичній галузях, як компонент інфузійних препаратів [2].

Окрім застосування в складі ЛЗ, фенілаланін використовується у харчовій промисловості як самостійна харчова добавка, а також в якості компоненту при виробництві сахарозамінника аспартама, газованих напоїв та жуйок. У сільськогосподарському секторі застосовується як кормова добавка.

Фенілаланін має наступні фізико-хімічні властивості:

- Прозора кристалічна речовина;
- Розчинність у воді - 30 г/л;
- Розчинність у етанолі - 0,52 г/л;
- Температура плавлення – 283°C (плавлення відбувається з розкладанням);
- Молекулярна маса - 165 Да;
- Ізоелектрична точка (pI) = 5,48.

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Зведенюк О.О.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В.				6	1106
Реценз.					8		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т. П.					

Фенілаланін має слабку флуоресценцію, за умов нагрівання у вакуумі здатний до сублімації, D – фенілаланін має солодкий смак, L – фенілаланін – гіркий.

Якісною реакцією на фенілаланін є ксанопротейнова реакція. Під дією концентрованої азотної кислоти відбувається нітрування бензольного ядра з утворенням нітросполук жовтого кольору [5].

На сучасних виробничих підприємствах активно впроваджуються біотехнологічні методи синтезу амінокислот, зокрема фенілаланіну. Синтез з використанням біологічного агента має кілька істотних переваг над хімічними [6]:

- Висока продуктивність;
- Змога отримати оптично чисту амінокислоту без додаткової очистки.

Використання ж хімічних методів призводить до утворення продукту – рацемату, суміші D- і L-форм амінокислот. D-форма не має фізіологічної цінності для людини і тварин: вона не включається в обмін речовин і не засвоюється, тому такий продукт потребує подальшої обробки.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та середовища для його культивування

Здатність до синтезу фенілаланіну виявлено у представників таких родів мікроорганізмів, як *Bacillus*, *Escherichia*, *Brevibacterium* та *Corynebacterium*. Однак, у промислових масштабах доцільним є використання рекомбінантних штамів-продуцентів [6].

Для промислового отримання фенілаланіну, через здатність до надсинтезу, широко застосовують рекомбінантні штами роду *Escherichia*. Наприклад, штам *E.coli* WSH - Z06, вперше досліджений у 2010 році, синтезує 35,38 г/л фенілаланіну [7].

Бактерія *E.coli* W14 продукує 47 г/л фенілаланіну. Так як цей продуцент є ауксотрофом, його культивування відбувається на поживному середовищі з високим вмістом дороговартісної амінокислоти тирозину (1 г/л) [8].

Ще одним перспективним продуцентом роду *Escherichia* є штам *E. coli* BR-42 (pAP-B03). Вперше використаний у 2011 році. Він характеризується стійкістю до бактеріофагу BP-1 [9]. За використання даного штаму концентрація фенілаланіну у середовищі може сягати 57,6 г/л [10].

У 2019 році китайськими вченими було вперше досліджено штам *E.coli* X1p3 зі здатністю до синтезу 61,3 г/л фенілаланіну. Проте, його використання у промислових умовах має істотний недолік, аналогічний до *E. coli* W1 – необхідність вносити у поживне середовище тирозин [3].

Роком раніше, у 2018 році, вчені з Китаю дослідили і описали штам *E.coli* X1p21, зі здатністю до синтезу фенілаланіну в концентрації 72,9 г/л.

НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Зведенюк О.О.			РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В.					8	1106
Реценз.						10		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

Біосинтез цільового продукту у цього продуцента відбувається на простому за складом поживному середовищі, джерелом вуглецю в якому є глюкоза. В якості фактору росту використовується тіамін [11].

Менш продуктивними є бактерії роду *Bacillus*. Їх культивування відбувається на відносно небагатих за складом поживних середовищах, які містять сахарозу (як джерело вуглецю), солі амонію чи сечовину (джерело азоту) та мінеральні солі [9, 12].

Через малу концентрацію цільового продукту, бактерії роду *Bacillus* в якості продуцентів фенілаланіну у промислових умовах використовуються рідко, перевага надається рекомбінантним штамам *E. coli*.

Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей одержання фенілаланіну за допомогою різних рекомбінатних штамів наведено у *табл. 2.1*.

Згідно даних *таблиці 2.1*, культивування наведених продуцентів відбувається в 2 етапи, на першому етапі отримують інокулят, культивуванням продуцентів на середовищі для накопичення біомаси, на другому етапі відбувається синтез цільового продукту.

Істотною відмінністю у складі поживних середовищ для отримання фенілаланіну є фактори росту. *E.coli* X11p21 використовує тіамін, а штами *E. coli* X11p3 та *E.coli* BR-42 (pAP-B03) потребують амінокислоти тирозину. В іншому, середовище для виробничого біосинтезу у продуцентів майже не відрізняється.

Тривалість культивування штамів *E.coli* X11p3 та *E. coli* BR-42 (pAP-B03) складає 48 годин, при цьому концентрація кінцевого продукту становить 61,3 та 57,6 г/л відповідно. В той же час, не дивлячись на довший період ферментації для штаму *E. coli* X11p21 (52 год), за допомогою останнього вдається отримати 72,9 г/л амінокислоти, але середовище містить у своєму складі тіамін.

Для вибору оптимального продуцента необхідно врахувати деякі фактори та особливості технологічного процесу для найпродуктивніших штамів.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів фенілаланіну

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, г/л	Особливості технологічного процесу	Умови культивування	Література
<i>E. coli</i> Xllp21	<p>Середовище №1: Глюкоза – 20; KH_2PO_4 – 4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; дріжджовий автолізат - 8; цитрат натрію - 2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; тіамін – 0,04</p> <p>Середовище №2: Глюкоза – 20, Дріжджовий автолізат – 8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 14, KH_2PO_4 – 4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – 2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,008, Тіамін – 0,04</p>	72,9	<p>Для накопичення біомаси використовується середовище №1.</p> <p>Середовище №2 – для синтезу цільового продукту.</p> <p>На другому етапі необхідне підживлення середовища глюкозою</p>	<p>Середовище №1: 37 °C pH 7,0</p> <p>Середовище №2: 52 год 37 °C pH 7,0</p>	Yongfei Liu, Yiran Xu, Dongqin Ding, Jianping Wen, Beiwei Zhu, Dawei Zhang. Genetic engineering of <i>Escherichia coli</i> to improve L-phenylalanine production <i>BMC Biotechnology</i> . 2018, 18 (5).
<i>E. coli</i> Xllp3	<p>Середовище №1: Глюкоза – 20; KH_2PO_4 – 4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; дріжджовий автолізат - 8; цитрат натрію - 2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; тіамін – 0,04</p> <p>Середовище №2: Глюкоза – 20, Дріжджовий автолізат – 4, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 10, KH_2PO_4 – 5, MgSO_4 – 5, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,015, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015, Тирозин – 0,25</p>	61,3	<p>Для накопичення біомаси використовується середовище №1.</p> <p>Середовище №2 – для синтезу цільового продукту.</p> <p>На другому етапі необхідне підживлення середовища глюкозою</p>	<p>Середовище №1: 37 °C pH 7,0</p> <p>Середовище №2: 48 год 38 °C pH 7,0</p>	Jie Wu, Yongfei Liu, Sheng Zhao, Jibin Sun, Zhaoxia Jin, Dawei Zhang. Application of Dynamic Regulation to Increase L-Phenylalanine Production in <i>Escherichia coli</i> . <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> 2019, 29 (6): 923–932.

<p><i>E. coli</i> BR-42 (pAP-B03)</p>	<p>Середовище №1: NaCl – 10, Дріжджовий автолізат –5, Триптон - 10 Середовище №2: Глюкоза – 20, Дріжджовий автолізат – 3, (NH₄)₂SO₄ – 5, K₂HPO₄ – 3, MgSO₄*7H₂O – 3, NaCl – 1, Na₃C₆H₅O₇ – 1,5, CaCl₂*2H₂O – 0,015, FeSO₄*7H₂O – 0,1125, MnSO₄*5H₂O – 0,01, Тіамін – 0,075, Тирозин – 0,4</p>	<p>57,6</p>	<p>Для накопичення біомаси використовується середовище №1 Середовище №2 – для синтезу цільового продукту. На другому етапі необхідне підживлення середовища глюкозою</p>	<p>Середовище №1: 37 °C pH 7,0 Середовище №2: 48 год 38 °C pH 7,0</p>	<p>Zhou H, Liao X, Liu L, Wang T, Chen J, Du G. Enhanced L- phenylalanine production by recombinant <i>Escherichia</i> <i>coli</i> BR-42 (pAP-B03) resistant to bacteriophage BP-1 via a two-stage feeding approach. <i>J. Microbiol.</i> <i>Biotechnol</i> 2011, 38(9): 1219-1227.</p>
---	--	-------------	--	---	---

Проаналізувавши дані, наведені у *таблиці 2.1*, можна дійти висновку, про недоцільність використання штаму *E.coli* BR-42 (pAP-B03) в якості продуцента фенілаланіну. Даний мікроорганізм має найнижчий показник продуктивності з усіх представлених біологічних агентів. Окрім того, для реалізації біосинтезу цільового продукту штамом *E.coli* BR-42 (pAP-B03) необхідно створити багатоконпонентне поживне середовище, складові якого характеризуються високою вартістю.

Для проведення більш ґрунтовного аналізу необхідно провести порівняння сумарної вартості поживних середовищ. Результати представлено у *таблиці 2.2*.

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *E. coli* Xllp21 та *E. coli* Xllp3

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)**
<i>E.coli</i> Xllp21	Середовище №2			
	Глюкоза – 20	50	1	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 14	20	0,28	1
	KH ₂ PO ₄ – 4	80	0,06	1
	MgSO ₄ *7H ₂ O – 2	8	0,01	1
	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ – 2	30	0,06	1
	FeSO ₄ *7H ₂ O – 0,008	20	0,01	1
	Тіамін – 0,04	1900	0,076	3
Дріжджовий автолізат – 8	1250	10	2	
Вартість 1 л середовища – 11,49 грн				
<i>E. coli</i> Xllp3	Середовище №2			
	Глюкоза – 20	50	1	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 10	20	0,2	1
	KH ₂ PO ₄ – 5	80	0,4	1
	MgSO ₄ *7H ₂ O - 5	8	0,04	1
	FeSO ₄ *7H ₂ O – 0,015	20	0,0003	1
	MnSO ₄ *5H ₂ O – 0,015	28	0,00042	1
	Тирозин – 0,25	1800	0,45	1
Дріжджовий автолізат – 4	1250	5	2	
Вартість 1 л середовища – 7 грн				

Примітка* - середовища для накопичення біомаси для вищенаведених штамів ідентичні, тому їх сумарна вартість у розрахунок не включається.

** - Ціни наведено станом на травень 2021 року. 1. <https://prom.ua/>; 2. alibaba.com/; 3 <https://flagma.ua/>.

Згідно даних, наведених у *табл. 2.2* можна підсумувати, вартість 1 л середовища для виробничого біосинтезу фенілаланіну продуцентом *E. coli* Xllp21 склала **11,49 грн**; вартість 1 л середовища для виробничого біосинтезу фенілаланіну продуцентом *E. coli* Xllp3 – **7 грн**.

Посилаючись на це, можна зробити висновок про істотну різницю у вартості поживних середовищ.

Для більш точної оцінки необхідно розрахувати умовну вартість продукту біосинтезу та швидкість утворення амінокислоти, з урахуванням тривалості культивування.

Узагальнену інформацію щодо вартості поживних середовищ, а також розрахунок умовної вартості цільового продукту наведено у *табл. 2.3*.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 мг цільового продукту (фенілаланіну) при культивуванні *E. coli* Xllp21 та *E. coli* Xllp3

Біологічний агент	Вартість 1л середовища, грн	Концентрація фенілаланіну, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної амінокислоти за годину, г/год
<i>E. coli</i> Xllp21	11,49	72,9	0,15	52	1,4
<i>E. coli</i> Xllp3	7	61,3	0,11	48	1,2

Підсумовуючи дані, наведені у *таблиці 2.3.*, можна виділити низку істотних переваг штаму *E. Coli* Xllp3 як продуцента фенілаланіну, а саме:

- Вартість 1 л поживного середовища для штаму *E. Coli* Xllp3 на 4,49 грн менше ніж для штаму *E. Coli* Xllp21;

- Вартість цільового продукту, синтезованого штамом *E. Coli Xllp3* на 0,04 грн менше ніж у випадку використання штаму *E. Coli Xllp21*;
- Тривалість виробничого біосинтезу фенілаланіну штамом *E. Coli Xllp3* на 4 години менша ніж у *E. Coli Xllp21*;

Отже, з усіх перерахованих продуцентів, найкращим є штам *E. Coli Xllp3*.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Тривалість культивування 48 год., вихід цільового продукту – 61,3 г/л.

Потреби для синтезу фенілаланіну.

Розрахуємо, скільки вуглецю міститься в 61,3 г фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну становить 165 г/моль.

Отже, у 165 г фенілаланіну міститься 108 г вуглецю, а в 61,3 г фенілаланіну:

$$(61,3 \times 108) / 165 = 40,1 \text{ г вуглецю.}$$

Далі розрахуємо, у скількох грамах глюкози міститься 40,1 г вуглецю.

$$40,1 * 180/72 = 100,25 \text{ г/л.}$$

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на глюкозі близько 40 % субстрату окиснюється до CO₂ для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме:

$$(100,25 * 0,4) + 100,25 = 140,35 \text{ г/л.}$$

Потреби для синтезу біомаси.

У біомасі міститься 50 % вуглецю, отже вміст вуглецю у 8 г біомаси становить:

$$8 \times 0,5 = 4 \text{ г.}$$

Ця кількість вуглецю міститься у:

$$(4 \times 180) / 72 = 10 \text{ г вуглеводів.}$$

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 8 г/л біомаси у середовище необхідно внести:

$$(10 \times 0,4) + 10 = 14 \text{ г/л глюкози.}$$

Отже, загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу

біомаси (8 г/л) та фенілаланіну (61,3 г/л), становить:

$$140,35 + 14 = 154,35 \text{ г/л.}$$

Така кількість глюкози не може бути внесена у середовище одразу, і частина вноситься у процесі культивування дробно. Розрахунок кількості порцій підживлення наведено нижче.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси.

Припустимо, що у біомасі міститься 10 % азоту. Таким чином, у 8 г біомаси вміст азоту становить 0,8 г. Для одержання фенілаланіну в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело мінерального азоту сульфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Розрахуємо кількість сульфату амонію, необхідну для одержання 8 г/л біомаси. Молекулярна маса сульфату амонію становить 132. Отже, у 132 г сульфату амонію міститься 28 г азоту, тоді 0,8 г азоту буде міститись у:

$$(132 \times 0,8) / 28 = 3,77 \text{ г солі.}$$

Для одержання 8 г/л біомаси вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у середовищі для культивування повинен становити 3,77 г/л.

Потреби для синтезу фенілаланіну.

Розрахуємо вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у середовищі, необхідний для одержання 61,3 г/л фенілаланіну. Молекулярна маса фенілаланіну становить 165. У 165 г фенілаланіну міститься 14 г азоту (N), тоді у 61,3 г фенілаланіну вміст азоту становить $(61,3 \times 14) / 165 = 5,2$ г.

Далі розрахуємо, в якій кількості $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ міститься ця кількість азоту. У 132 г сульфату амонію міститься 28 г азоту (N), тоді 5,2 г азоту буде міститись у:

$$(132 \times 5,2) / 28 = 24,5 \text{ г солі.}$$

Для одержання 61,3 г/л фенілаланіну вміст сульфату амонію в середовищі повинен становити $(24,5 + 3,77) = 28,27$ г/л.

У складі поживного середовища лише 10 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, отже потреба

мікроорганізмів у азоті складає: $28,27 - 10 = 17,27$ г/л. При цьому потрібно врахувати, що як додаткове джерело азоту, мікроорганізми будуть використовувати дріжджовий автолізат. Крім того, на стадіях накопичення біомаси використовується середовище з високим вмістом азоту, який продуцент не зможе використати в повному обсязі.

Отже, в сумі, амонійний азот що міститься у $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, дріжджовий автолізат та залишки після вирощування інокуляту здатні компенсувати потребу продуцента в азоті.

Розрахунок вмісту фосфору у середовищі. У біомасі міститься близько 3 % фосфору. Отже, для синтезу 8 г/л біомаси вміст фосфору у середовищі повинен становити:

$$8 \times 0,03 = 0,24 \text{ г/л.}$$

Джерелами фосфору у промисловому виробництві фенілаланіну є двозаміщений калій фосфорнокислий – K_2HPO_4 .

Розрахуємо в якій кількості K_2HPO_4 міститься 0,24 г фосфору.

$$136 * 0,24 / 31 = 1,05 \text{ г/л.}$$

Отже для синтезу 8 г/л біомаси в середовищі має міститись 1,05 г фосфору.

Таблиця 2.4.

Склад поживного середовища для біосинтезу фенілаланіну продуцентом *E. coli* X11p3

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л			
	Сумарний	Початковий	У підживлювальному розчині	В одній порції підживлення
Глюкоза	160	60	100	60 / 10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	10	-	-
K_2HPO_4	5	5	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5	5	-	-

Na ₃ C ₆ H ₅ O	2	2	-	-
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,015	0,015	-	-
MnSO ₄ *5H ₂ O	0,015	0,015	-	-
Тирозин	0,25	0,25	-	-
Дріжджовий автолізат	4	4	-	-

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

Морфолого - культуральні ознаки

Escherihia coli - це грамнегативна бактерія, не здатна до спороутворення. Форма клітини - паличкоподібна, із заокругленими кінцями. Розмір клітини: довжина - 1—3 мкм; ширина - 0,4— 0,8 мкм; об'єм клітин становить близько 0,6—0,7 мкм³ [13].

В більшості випадків мають джгутики, які розміщуються перитрихом. На кінці джгутиків містять білок FimH [14]. Здатна до активного руху. Має капсулу. До спороутворення не здатна, навіть у несприятливих умовах. У колоніях розміщуються хаотично.

На м'ясо – пептонному агарі *E.coli* утворює мутні, випуклої форми колонії з рівним краєм. Культури, що містять капсулу, ростуть у вигляді слизових колоній. На м'ясо – пептонному бульйоні колонії мутніють рівномірно по всій площі [14].

Для ідентифікації *E.coli* використовують диференціально-діагностичні середовища, наприклад, середовище Ендо. На ній кишечна паличка росте у вигляді малиново - червоних колоній з металічним блиском. Часто використовують агар з еозинметиленовим синім (ЕМС), на ньому дана культура росте у вигляді темно – фіолетових колоній [15].

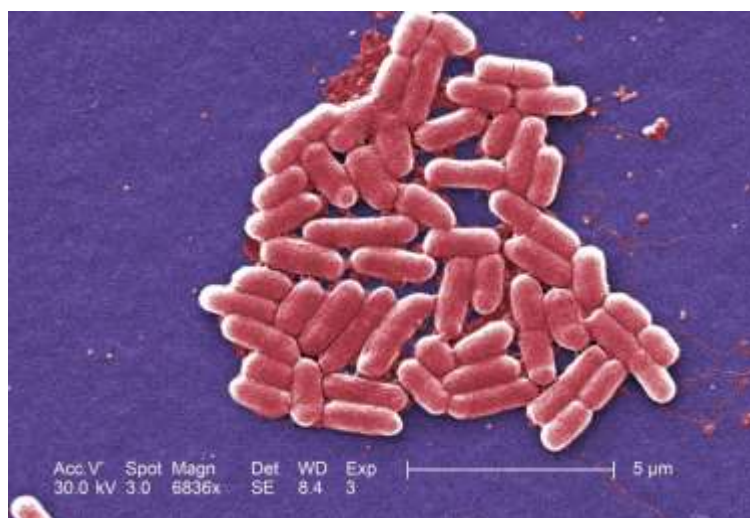


Рис. 2.1. – Колонія *E.coli* під електронним мікроскопом.

Фізіолого – біохімічні ознаки.

E.coli – факультативний анаероб. Гарно ростуть на простих поживних середовищах при 37°C і рН 7,2-7,8, деякі штами мають здатність до поділу при 49°C [16].

Штами кишкової палички, виділені з кишечника людини і тварин, розвиваються при 43-45°C, а кишечні палички холоднокровних в цих умовах не розмножуються. Ця властивість кишкової палички, використовується для визначення санітарного стану об'єкта.

Кишкова паличка продукує багаточислені сахаролітичні ферменти, швидко ферментує глюкозу та інші вуглеводи, частіше з кислото- та газоутворенням. Майже всі штами ферментують арабінозу та мальтозу з утворенням кислоти; більше 90% штамів - лактозу, сорбіт. Інколи - сахарозу, рафінозу, рамнозу, ксилозу; як правило, не ферментують адоніт і інозит. *E.coli* не використовує цитрат амонію, малонат натрію [14].

Таксономічний статус біологічного агента [17].

- Домен – *Bacteria*
- Відділ – *Proteobacteria*
- Клас – *Gamma proteobacteria*
- Ряд – *Enterobacteriales*
- Родина – *Enterobacteriaceae*

- Рід - *Escherichia*

E. Coli X11p3 - рекомбінантний штам, що здатен до надсинтезу фенілаланіну.

Методи метаболічної інженерії, спрямовані на підвищення синтетичної здатності по відношенню до фенілаланіну ґрунтуються на збільшенні вмісту попередників фенілаланіну, наприклад фосфоенолпірувату та еритрозо - 4 - фосфату, що блокують подачу вуглецю до інших метаболічних шляхів, тим самим підвищуючи вихід фенілаланіну [3].

Подальші маніпуляції полягають у деактивації контрольних точок транскрипції та видаленні блокаторів шикіматного шляху, синтез яких кодується промотором *aroK* [3].

Спосіб конструювання штаму *E. Coli* X11p3 полягає у заміні природного промотора *aroK* на штучний промотор P9 [3].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

У медичній практиці для лікування і профілактики багатьох патологій широко застосовуються лікарські препарати, найбільш ефективними з яких є амінокислотні засоби. Інфузійні розчини, що містять композиції високоочищених амінокислот, застосовуються при лікуванні важких хворих в якості детоксикантів, а також для відновлення рівня поживних речовин.

Фенілаланін є протеїногенною амінокислотою, у організмі людини виконує роль «будівельного матеріалу» для синтезу білка. Його нестача може призвести до критичних наслідків, тому він широко застосовується у медичній та фармацевтичній галузях, зокрема як компонент деяких інфузійних розчинів.

Амінокислотні інфузійні розчини використовуються при неможливості ентерального харчування, у тяжких випадках захворювань травних органів і порушенні функцій травної системи (обструкція травного тракту, синдром мальабсорбції, запальні захворювання кишечника, панкреатит, кишкові свищі, неспецифічний виразковий коліт) [1].

Також застосовуються в якості додаткового джерела поживних речовин при сильних травмах, тяжких опіках, сепсисі, а також при підготовці до операції та після оперативного втручання [1].

Згідно статистичних даних, в Україні, у 2017 році кількість хворих на хронічні запальні захворювання кишечника (ХЗЗК) становила 15 433 осіб, з них 9023 хворіли на неспецифічний виразковий коліт (НВК), а 6410 – на хворобу Крона [18].

При лікуванні подібних захворювань, інфузійна терапія проводиться за наявності синдрому мальабсорбції, в основному у тяжких випадках [19].

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ			
Розроб.		Зведенюк О.О.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Лім.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Ключка Л.В.					20	2306
Реценз.						22		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

Кількість пацієнтів з ХЗЖК з тяжким перебігом складає 50% від загальної кількості.

Отже, щорічно інфузійної терапії потребують 4500 пацієнтів з НВК та 1000 з хворобою Крона.

При гострому панкреатиті (в тяжких випадках) може виникати явище локальної тимчасової або постійної дисфункції органів.

Кількість хворих на панкреатит в Україні складає 80 ос. на 100 000 населення. Загалом близько 33 500 чоловік [20].

Відсоток пацієнтів з тяжким перебігом панкреатиту, що потребують інфузійної терапії складає 25% від загальної кількості [21].

Отже, щорічно близько 8 400 пацієнтів, хворих на панкреатит, потребують регулярної інфузійної терапії.

Подібні препарати також використовуються як додаткове джерело поживних речовин при тяжких опіках шкіри та сепсисі [1].

Тяжкі опіки впливають на весь організм і порушують не тільки цілісність шкірних покривів, а і роботу усіх систем органів. В таких випадках необхідними заходами є підтримка життєво важливих функцій, корекція водно-електролітичного балансу, парентеральне харчування, детоксикаційна терапія [22].

Показник опіків в Україні складає 21,3 на 10 000 населення. З них 25% - з тяжкими опіками при яких пацієнти не можуть самостійно харчуватися [22].

Згідно даних державної служби статистики, населення України складає 41 750 000 осіб [23].

Отже, щорічно, кількість пацієнтів з тяжкими опіками становить:

$$41\,750\,000 \times 10\,000 \times 21,3 \times 0,25 \approx 22\,250\,000 \text{ осіб}$$

При лікуванні сепсису, лікарі радять віддавати перевагу ентеральному харчуванню, але при тяжких станах може виникнути явище поліорганної недостатності (гостра дисфункція двох або більше органів при сепсисі) та шлунково-кишкової кровотечі, що обумовлює необхідність проведення інфузійної терапії [24].

За статистикою, в Україні кількість хворих на сепсис складає, приблизно 8900 осіб.

Особливості використання подібних препаратів доцільно розглянути на прикладі конкретного лікарського засобу, а саме «Аміносол ® НЕО 10%» (Хемофарм АД, Сербія).

Даний препарат характеризується високим вмістом незамінних амінокислот, у тому числі фенілаланіну (5,1 г амінокислоти на 1000 мл розчину).

Добова доза препарату складає 700-1400 мл, залежно від маси тіла пацієнта [1].

Для подальших розрахунків приймаємо середнє значення – 1000 мг.

Узагальнені дані представлено нижче (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

Вихідні дані для розрахунку річної потреби дорослого населення у фенілаланіні (у складі препарату «Аміносол ® НЕО 10%»).

Назва захворювання	К-сть хворих в Україні (у тяжкому стані)	Тривалість курсу лікування, днів	К-сть фенілаланіну, що споживається одним хворим за курс лікування, г	Загальна кількість фенілаланіну, що споживається усіма хворими за один рік, кг
Неспецифічний виразковий коліт	4500	30	153	688
Хвороба Крона	3200	30	153	490
Панкреатит	8400	30	153	1285
Опіки шкіри	22500	30	153	3404
Сепсис	8900	30	153	1361
РАЗОМ				7 230

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Виробництво фенілаланіну та інфузійних розчинів, що містять його у своєму складі в Україні відсутнє [25].

На ринку наявні закордонні інфузійні препарати, їх перелік представлено

нижче у вигляді таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

**Перелік інфузійних розчинів на українському фармацевтичному
ринку**

Назва [26]	Виробник [26]	Вміст фенілаланіну у 1000 мл розчину, г [26]	Ціна, грн
КАБІВЕН ЦЕНТРАЛЬНИЙ	Фрезеніус Кабі АБ, Швеція	2,4	2750 [27]
АМІНОСТЕРИЛ Н- ГЕПА	Фрезеніус Кабі Австрія ГмбХ, Австрія	0,88	3041 [28]
ІНФЕЗОЛ® 40	БЕРЛІН-ХЕМІ АГ, Німеччина	3,15	1880 [29]
НУМЕТА G16E	Бакстер С.А., Бельгія	2,45	12711 [30]

Як видно з даних, наведених у таблиці 3.2., усі перераховані препарати містять у своєму складі значно менше фенілаланіну, ніж «Аміносол ® НЕО 10%». Крім того, ціна даного розчину нижча ніж у конкуруючих засобів (624 грн/1 л), джерело:

<https://tabletki.ua/%D0%90%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D1%81%D0%BE%D0%BB-%D0%BD%D0%B5%D0%BE-10/23508/pharmacy/kyiv/>

Отже, потребу пацієнтів у амінокислотних інфузійних розчинах доцільно задовольняти препаратом «Аміносол ® НЕО 10%».

Можна дійти висновку, що на українському фармацевтичному ринку наявна велика кількість закордонних інфузійних препаратів, але зважаючи на їх високу вартість, регулярний імпорт не є рентабельним, отже державі необхідно самостійно задовольнити 40 % від загальної потреби населення у розрахованій кількості амінокислоти фенілаланіну.

Отже, необхідна кількість фенілаланіну становить:

$$7\,230 \times 0,4 = 2\,892 \text{ кг}$$

Знаючи синтезувальну здатність продуцента (61,3 г/л), можемо

розрахувати кількість культуральної рідини, яку необхідно одержати, щоб задовольнити потреби населення.

Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання

2 892 кг фенілаланіну становить:

$$2\,892 / 0,0613 = 47\,182 \text{ кг} \approx 47,1 \text{ м}^3$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (38 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$47,1 / 0,62 = 76,1 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Щоб задовольнити річну потребу населення у амінокислоті фенілаланіні, потрібно одержати 76,1 м³ культуральної рідини.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість трудоднів (Трд) 30.

Решту робочих трудоднів виробництво працюватиме на синтез фенілаланіну для забезпечення інших галузей промисловості (харчова, сільськогосподарська).

Тоді кількість продукту на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = 76,1 / 30 = 2,26 \text{ м}^3$$

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

$$V_{кр} = 1,1 \times 2,26 \times 5724 = 5,9 \text{ м}^3$$

Цикл роботи ферментера включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (9 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірку на герметичність (2 год), стерилізацію (2 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

5,9 м³ культуральної рідини ($V_{цк}$) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_r = 5,9 / 0,6 = 9,83 \text{ м}^3$$

де 0,6 – коефіцієнт заповнення ферментера.

Приймаємо найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\phi} = 10 \text{ м}^3$.

Перевірка коефіцієнту заповнення:

$$K_{zan} = 5,9 / 10 = 0,59, \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для виробничого біосинтезу

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

Отже, кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{nc1} = 5,91 + 0,1 = 5,36 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу для виробничого біосинтезу становить:

$$V_{nm1} = 5,9 - 5,36 = 0,54 \text{ м}^3$$

3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в посівному апараті об'ємом 1 м^3

Для одержання $0,54 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 %.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб2} = 0,541 - 0,1 = 0,6 \text{ м}^3$$

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{nc2} = 0,61 + 0,1 = 0,54 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{nm2} = 0,6 - 0,54 = 0,06 \text{ м}^3 \text{ або } 60 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{роб2} = 0,6 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування продуцента у посівному апараті, геометричний об'єм якого становить:

$$V_{nan} = 0,6 / 0,6 = 1 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат об'ємом $V_{сф} = 1 \text{ м}^3$

Перевірка прийнятого раніше коефіцієнту заповнення:

$$K_{з1} = 0,6 / 1 = 0,6$$

3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури

в інокуляторі об'ємом 100 л

Для одержання 60 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 %.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб3} = 60 / (1 - 0,1) = 66,6 \text{ л}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{нс3} = 66,61 + 0,1 = 66,71 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{нм3} = 66,6 - 66,71 = -0,11 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{роб3} = 66,6$ л можна одержати під час культивування продуцента у інокуляторі, геометричний об'єм якого становить:

$$V_{ін} = 66,6 / 0,6 = 111 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор об'ємом $V_{сф} = 0,1 \text{ м}^3$ (100 л).

Перевірка прийнятого раніше коефіцієнту заповнення:

$$K_{з1} = 66,6 / 100 = 0,6$$

3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л

Для одержання 6,1 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 %.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб4} = 6,11 - 0,1 = 6,01 \text{ л}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде

становити:

$$V_{nc4} = 6,71 + 0,1 = 6 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{nm4} = 6,7 - 6 = 0,7 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{роб4} = 6,7$ л можна одержати під час культивування продуцента у малому інокуляторі, геометричний об'єм якого становить:

$$V_{in} = 6,7 / 0,6 = 11,1 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор об'ємом $V_{сф} = 0,01 \text{ м}^3$ (10 л).

Перевірка прийнятого раніше коефіцієнту заповнення:

$$K_{з1} = 6,71 / 10 = 0,6$$

3.4.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалках

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм4} = 0,7$ л (700 мл) можна одержати культивуванням у колбах на качалках. Для цього використовують колби об'ємом $V_{колби} = 750$ мл та $K_{зк} = 0,2$ (коефіцієнт заповнення колби).

Отже, кількість колб для отримання необхідного об'єму посівного матеріалу становитиме:

$$N_{колб} = 700 / (750 \times 0,2) = 4,6 \text{ (5)}.$$

Таким чином, для отримання посівного матеріалу об'ємом 0,7 л (700 мл) потрібно 5 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу фенілаланіну у ферментері об'ємом 10 м^3 буде проходити у 4 етапи.

- Вирощування культури у колбах на качалках;
- Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л;
- Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 100 л;
- Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 1 м^3 ;

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю у поживному середовищі для біосинтезу є глюкоза [3].

У Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes інформація щодо штаму *E. Coli* Х1р3 відсутня, тому катаболічний шлях розглянуто на прикладі *E. Coli*.

Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, катаболізм глюкози у *E. Coli* відбувається за шляхом Ембдена–Мейєргофа–Парнаса (гліколіз) [31].

Глюкоза, за допомогою ферменту гексокінази (КФ 2.7.1) перетворюється на глюкозо - 6 - фосфат. Другою реакцією є перетворення глюкозо - 6 - фосфату на фруктозо - 6 - фосфат за участю ферменту глюкозофосфатізомери (КФ 5.3.1.9). Далі, фруктозо - 6 - фосфат під дією фосфофруктокінази (КФ 2.7.1.11) перетворюється на фруктозо - 1,6 - дифосфат. Четверта реакція полягає у перетворенні фруктозо - 1,6 - дифосфату на гліцеральдегід - 3 - фосфат, дану реакцію каталізує фермент фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13). Далі, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12) каталізує синтез 1,3 - Дифосфогліцерату. Утворена сполука, під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) перетворюється на 3 - Фосфогліцерат. Наступна реакція - утворення 2 - Фосфогліцерату, відбувається під дією фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12). Утворений 2 - Фосфогліцерат, за участі фермента енолази (КФ 4.2.1.11) перетворюється на Фосфоенолпіруват. Заключними реакціями метаболічного шляху є утворення пірувату, що каталізується піруваткіназою (КФ 2.7.1.40), з наступним його перетворенням у Ацетил - КоА за участі піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1.).

Схему гліколізу наведено на *рисунку 4.1.*

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Зведенюк О.О.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В.				28	2306
Реценз.					30		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.					



Рис. 4.1. - Гліколітичний шлях перетворення глюкози

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Метаболічними попередниками фенілаланіну є фосфоенолпіруват та еритрозо - 4 - фосфат.

Глюкозо - 6 - фосфат, що утворюється у гліколізі, включається у пентозофосфатний шлях, де після низки хімічних реакцій перетворюється на еритрозо - 4 - фосфат. Далі, під дією 3-дезоксисарабіногептулозо-7-фосфатсинтази (КФ 2.5.1.54), еритрозо - 4 - фосфат реагує з фосфоенолпіруватом з утворенням 3 - Дезокси-D-арабіно-гептулозонат-7-фосфату. Утворена сполука, в результаті циклізації, переходить у 5-Дегідрохіну кислоту, що в свою чергу, перетворюється на шикіат. Шикіат,

під дією хоризматсинтази (КФ 4.6.1.4) перетворюється на хоризмат. Наступна реакція - перетворення хоризмату на префенат за участі хоризматмутази (КФ 5.4.99.5). Останній етап - перетворення префенату на фенілаланін за участі префенатдегідратази (КФ 1.3.1.13).

Схему перетворень наведено на *рисунку 4.2*.



Рис. 4.2 - Схема утворення фенілаланіну

Узагальнена схема утворення фенілаланіну продуцентом *E. Coli*, починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату наведена у додатку 1.

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.

Біологічний агент *E. coli* X11p3 є факультативним анаеробом, може рости як в присутності кисню, так і без нього. Проте в безкисневих умовах має здатність до мурашинокислого бродіння. Зважаючи на це, культивування продуцента необхідно проводити в аеробних умовах.

Температурний оптимум для *E. coli* X11p3 - 37 °С.

Даний продуцент є нейтрофілом, отже в процесі культивування необхідно підтримувати рН в межах 7,0.

У промислових умовах, для отримання продуктів життєдіяльності мікроорганізмів використовують періодичний та безперервний способи культивування.

Періодичне культивування *E. coli* X11p3 є більш практичним по ряду причин. По-перше, фенілаланін – первинний метаболіт, отже за умов постійного відведення культуральної речовини досягти високої концентрації цільового продукту у середовищі буде неможливо. По-друге, безперервне культивування важче піддається автоматизації, аніж періодичне.

Культивування *E. coli* X11p3 пропонується проводити глибинним способом, котрий має декілька істотних переваг у порівнянні з поверхневим. По-перше, він легше піддається автоматизації, аніж поверхневий. По-друге, такий метод забезпечує розподіл мікроорганізмів в усій товщі поживного середовища, а не лише на його поверхні, а так як фенілаланін є екзометаболітом і в процесі синтезу виділяється одразу в поживне середовище, проведення культивування глибинним способом істотно спрощує процедуру виділення цільового продукту по закінченню ферментації.

НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Зведенюк О.О.			РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В.					31	2306
Реценз.						33		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

Отже, культивування продуцента фенілаланіну *E. coli* ХІІрЗ доцільно проводити при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, рН 7,0 глибинним методом у періодичній культурі.

При виборі ферментера для культивування *E. coli* ХІІрЗ необхідно враховувати наступні технологічні особливості біосинтезу фенілаланіну.

1. Культивування проводиться в аеробних умовах. Аерація поживного середовища є необхідною. Необхідно забезпечити ферментер механізмом подачі стерильного аераційного повітря. Для цього можна використати барботер;

2. При аеробному глибинному культивуванні концентрація клітин та субстрату повинна підтримуватись сталою по всьому об'єму ферментера. Для забезпечення аерації поживного середовища, та його гомогенізації доцільно встановити лопатеву мішалку;

3. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою та датчиком температури;

4. Під час культивування продуцента можливе підкислення поживного середовища. Так як *E. coli* ХІІрЗ є нейтрофілом, зниження рівня рН є недопустимим. Ферментер для виробничого біосинтезу має бути обладнаний датчиком рН та механізмом автоматичної подачі титрувального агента у поживне середовище. Окрім того, наявність у ферментері датчика рН дає можливість стерилізувати розчини солей безпосередньо у апараті, без встановлення додаткових датчиків рН на збірники.

5. Під час синтезу фенілаланіну продуцентом *E. coli* ХІІрЗ необхідно вносити підживлювальний розчин. Ферментер має бути обладнаний механізмом подачі поживних речовин.

5.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Однією з обов'язкових умов для синтезу фенілаланіну продуцентом *E. coli* ХІІрЗ є аерація поживного середовища. Тому підготовка стерильного аераційного повітря є однією з важливих стадій при культивуванні біологічного агента [3].

Під час роботи з посівною культурою в боксах та лабораторіях

використовують УФ-лампи для стерилізації повітря (опромінення ультрафіолетовими променями чинить стерилізуючий ефект) [32].

Забір атмосферного повітря здійснюється турбокомпресором через забірну шахту на висоті двох метрів над рівнем даху будівлі. Оскільки висота виробничої будівлі становить 12 м (10 м – висота стін, 0,5 м – фундамент, 1,5 м – дах), атмосферне повітря відбирається на висоті 14 м.

Наступним етапом є очищення повітря за допомогою фільтрів грубої очистки (для звільнення від пилу та інших контамінантів).

Головною вимогою до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до і після фільтра.

Для подальшого подолання місцевих опорів, попередньо пропущене через фільтри грубої очистки повітря стискається у компресорі, внаслідок чого збільшується його вологовміст.

Особливу увагу варто приділити тому факту, що осідання вологи на фільтрах неприпустиме, оскільки це призводить до злипання волокон і утворення каналів, що значно погіршує осадження часток. Крім того, на зволжених волокнах фільтрів можливе розмноження осілих мікроорганізмів, що супроводжується додатковим забрудненням повітря [33].

Для запобігання осіданню вологи на фільтрувальних матеріалах, проводиться охолодження стисненого повітря у водяному теплообміннику до температури, за якої волога повітря конденсується.

З метою видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, а також зменшення пульсацій руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів, на підприємстві встановлюється ресивер.

Надалі, для забезпечення надійної роботи фільтрів другого і третього рівнів, повітря нагрівають паром до температури 45-50°C (при таких температурах не відбувається конденсація пари води на волокнах фільтра).

Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На головних фільтрах видаляється приблизно 98% мікроорганізмів. З головного фільтра повітря колектором подається в індивідуальні фільтри третього рівня, встановлені на кожному ферментаторі.

Індивідуальні фільтри заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами. Затримується до 99,999% мікроорганізмів [33].

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.

Розрахунок площі виробничих приміщень.

Процес підготовки посівного матеріалу до виробничого біосинтезу відбувається у 4 етапи (вирощування п.м. у колбах на качалці та культивування в апаратах об'ємом 10 л, 100 л та 1 м³).

Виробничий біосинтез відбувається у ферментері об'ємом 10 м³.

З урахуванням необхідності встановлення збірників для розчинення компонентів поживного середовища, а також УБС для стерилізації середовища для виробничого біосинтезу, приймемо середню відстань між апаратами – 2,5 м.

Виходячи з цього, площа підлоги приміщення для підготовки посівного матеріалу складає:

$$12,5 \times 5 = 62,5 \text{ м}^2$$

Висота даного приміщення – 4 м, площа стін:

$$((12,5 \times 4) \times 2) + ((5 \times 4) \times 2) = 100 + 40 = 140 \text{ м}^2$$

Ферментер для виробничого біосинтезу встановлюється в окремій будівлі (висота стін – 8 м). З урахуванням розмірів УБС, площа підлоги становить:

$$8 \times 8 = 64 \text{ м}^2$$

Площа стін:

$$64 \times 4 = 256 \text{ м}^2$$

Таблиця 5.1.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуювальних засобів для виробництва фенілаланіну

№	Найменування підрозділів	Кількість підрозділів	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції, м ²		Дезінфікуючий засіб			Кратність обробки			Потреби в деззасобах, л(кг)			
			При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	Назва	Концентрація робочого розчину	Норми витрати робочого розчину на 1 кв.м, мл	На добу	На місяць	На рік	На одну обробку		На місяць	На рік
											При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні		
1	Обладнання	2	-	46	«ЕКЛІН-Н»	1%	100	-	3	36	-	4,6	13,8	165,6
2	Поверхня стін	2	-	396	«Divosan Extra VT55»	1%	100	-	3	36	-	39,6	118,8	1425,6
	Підлога	2	126,5	126,5			100	1	30	200	12,6	12,6	378	2520
3	Персонал	-	-	-	«Септональ»	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.

Склад поживних середовищ для підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу відрізняється.

Для накопичення біомаси продуцента *E. coli* X1p3 використовується поживне середовище наступного складу (г/л): глюкоза – 20; K_2HPO_4 – 4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; дріжджовий автолізат - 8; цитрат натрію - 2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; тіамін – 0,04 [3].

Таке середовище є багатоконпонентним і містить у своєму складі речовини з різною чутливістю до дії високих температур, отже, в залежності від способу стерилізації потребує розділення на композиції. Приклади наведено у наступних підрозділах.

Виробничий біосинтез фенілаланіну проводиться на поживному середовищі наступного складу (г/л): глюкоза – 60; K_2HPO_4 – 5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -10; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; дріжджовий автолізат – 4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,015; бетаїн – 0,3; тирозин – 0,25 [3].

Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Для отримання посівного матеріалу в колбах на качалках потрібно 0,7 л (700 мл) поживного середовища. Зважаючи на невеликий об'єм, стерилізацію компонентів доцільно проводити автоклавуванням.

Середовище поділяється на наступні композиції:

Композиція А: глюкоза; дріжджовий автолізат; (режим стерилізації: 112°C, 30 хв, 0,05 МПа);

Композиція Б: K_2HPO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (цитрат натрію) (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа);

Композиція В: MgSO_4 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа);

Композиція А містить у своєму складі термолабільні речовини, як наслідок, потребує м'якого режиму стерилізації.

Композиції Б та В стерилізуються окремо для запобігання утворенню

нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та розчин тіаміну готуємо у вигляді запасних розчинів (з розрахунку 1 г речовини на 100 мл розчину), який вноситиметься в розрахунку 0,1 мл на 100 мл середовища, та використовуємо для одержання інокуляту у колбах та 10 літровому інокуляторі.

Таблиця 5.2.

Об'єм середовища, л	Кількість допоміжних речовин	
	тіамін	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,7	0,028	0,00056
6	0,24	0,048
60	2,4	0,48
540	21,6	4,32
5360	214,4	42,88

Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 10 л

Об'єм поживного середовища для даного апарата становить 6 л. Зважаючи на невеликий об'єм, стерилізацію компонентів доцільно проводити автоклавуванням.

Склад композицій та умови їх стерилізації аналогічні до попереднього підпункту.

Композиція А: глюкоза; дріжджовий автолізат; (режим стерилізації: 112°C, 30 хв, 0,05 МПа);

Композиція Б: KH_2PO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; цитрат натрію (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа);

Композиція В: MgSO_4 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа);

Композиція А містить у своєму складі термолабільні речовини, як наслідок, потребує м'якого режиму стерилізації.

Композиції Б та В стерилізуються окремо для запобігання утворенню

нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 100 л

Об'єм поживного середовища, що вноситься у апарат об'ємом 100 л, складає 60,5 л. Стерилізацію доцільно проводити безпосередньо в інокуляторі.

Кількість ферум сульфату і тіаміну є такою, що дозволяє нам їх зважити на технічних вагах

Середовище поділяється на наступні композиції:

Композиція А: глюкоза; дріжджовий автолізат; тіамін (режим стерилізації: 112°C, 30 хв, 0,05 МПа);

Композиція Б: KH_2PO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; цитрат натрію; MgSO_4 ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа);

Приготування та стерилізація композиції А буде відбуватись у передбаченому для цього збірнику об'ємом 25 л.

Для розчинення компонентів композиції Б необхідно передбачити збірник об'ємом 63 л, стерилізація відбувається безпосередньо у апараті об'ємом 100 л.

У композиції Б наявні основні та фосфорні солі, тому необхідно забезпечити кисле (4,0-4,5) рН середовища, при якому солі не випадають в осад, а по закінченню стерилізації стабілізувати значення рН до 7.

Підкислення поживного середовища здійснюють за допомогою 6% розчину HCl у пропорції 2 мл на 1 л середовища.

Отже, для 60,5 л потрібно:

$$60,5 \times 2 = 121 \text{ мл розчину}$$

Розчин соляної кислоти не потребує попередньої стерилізації. Готується в лабораторних умовах у колбі об'ємом 250 мл.

Після закінчення стерилізації та охолодження середовища, стабілізація значення рН до 7,0 відбувається додаванням 6 %-го розчину стерильного гідроксиду натрію у кількості 121 мл. Розчин готується у колбі об'ємом 250 мл. Стерилізують у автоклаві (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 1м³

Об'єм поживного середовища, що вноситься у апарат складає 0,54 м³. Стерилізацію доцільно проводити безпосередньо у посівному апараті .

Середовище поділяється на наступні композиції:

Композиція А: глюкоза; дріжджовий автолізат; тіамін (режим стерилізації: 112°C, 30 хв, 0,05 МПа);

Композиція Б: КН₂РO₄; FeSO₄·7H₂O; (NH₄)₂SO₄; цитрат натрію; MgSO₄ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа);

Приготування та стерилізація композиції А буде відбуватись у передбаченому для цього збірнику об'ємом 250 л.

Для розчинення компонентів композиції Б необхідно передбачити збірник об'ємом 630 л, стерилізація відбувається безпосередньо у апараті.

При стерилізації композиції Б необхідно забезпечити кисле (4,0-4,5) рН середовища, при якому солі не випадають в осад, а по закінченню стерилізації стабілізувати значення рН до 7.

Підкислення поживного середовища здійснюють за допомогою 6% розчину НСl у пропорції 2 мл на 1 л середовища.

Отже, для 0,54 м³ потрібно:

$$540 \times 2 = 1080 \text{ мл розчину}$$

Розчин соляної кислоти не потребує попередньої стерилізації. Готується в лабораторних умовах у колбі об'ємом 2 л.

Після закінчення стерилізації та охолодження середовища, стабілізація значення рН до 7,0 відбувається додаванням 6 %-го розчину стерильного гідроксиду натрію у кількості 1080 мл. Розчин готується у колбі об'ємом 2 л. Стерилізують у автоклаві (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Приготування та стерилізація середовища для виробничого біосинтезу

Об'єм поживного середовища у ферментері для виробничого біосинтезу становить 5,36 м³.

Виробничий біосинтез фенілаланіну проводиться на поживному середовищі наступного складу (г/л): глюкоза – 60; KH_2PO_4 – 5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -10; MgSO_4 – 0,5; дріжджовий автолізат – 4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,015; бетаїн – 0,3; тирозин – 0,25 [15].

Композиція А: глюкоза; дріжджовий автолізат; бетаїн; тирозин; KH_2PO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; MgSO_4 ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації:);

Оскільки об'єм поживного середовища становить більше 5 м^3 , з метою спрощення технології доцільно провести стерилізацію в установці безперервної стерилізації УБС-5.

Усі компоненти розчиняються у збірнику об'ємом 4 м^3 , а потім подаються в УБС-5.

Обґрунтування вибору розчину для регуляції рН в процесі виробничого біосинтезу

Споживання бактеріями амонійного джерела Нітрогену – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ супроводжується підкисленням культуральної рідини.

У якості титрувального агента пропонується використовувати 10%-й розчин гідроксиду амонію [15].

Кількість речовини для підлучення поживного середовища розраховується у пропорції 2 мл / 1л поживного середовища.

Отже, для $5,36 \text{ м}^3$ поживного середовища потрібно:

$$5360 \times 2 = 10\,720 \text{ мл} = 10,7 \text{ л розчину}$$

Розчин готується і стерилізується у збірнику об'ємом 25 л. Режим стерилізації: 131°C , 40 хв, 0,15 МПа.

Обґрунтування підживлювального розчину

Процес отримання фенілаланіну продуцентом *E. coli* Xllp3 проводиться з підживленням. Кількість глюкози, необхідна для накопичення біомаси та синтезу цільового продукту – 154 г/л. Така кількість джерела вуглецю не може бути внесена одразу. Необхідно проводити дробне внесення глюкози.

Об'єм ферментера $V_f = 10 \text{ м}^3$

Коефіцієнт заповнення $K_z = 0,6$

Кінцева концентрація джерела вуглецю $C_k = 154$ г/л (кг/м³)

Початкова концентрація джерела вуглецю $C_p = 60$ г/л (кг/м³)

Концентрація розчину підживлення $C_j = 400$ г/л (кг/м³)

Робочий об'єм ферментера:

$$10 \times 0,6 = 6 \text{ м}^3$$

$$400 - 154 = 246 - 123 \text{ частини};$$

$$154 - 60 = 94 - 47 \text{ частин};$$

Співвідношення початкового об'єму культуральної рідини до розчину підживлення 123:47.

1 частина культуральної рідини становить:

$$\frac{6000}{(123 + 47)} = 35,2 \text{ л};$$

Об'єм розчину підживлення становить:

$$35,2 \times 47 = 1\,654,4 \text{ л} = 1,65 \text{ м}^3;$$

Початковий об'єм культуральної рідини:

$$35,2 \times 123 = 4\,329,6 \text{ л} = 4,33 \text{ м}^3;$$

Об'єм розчину на одноразове підживлення:

$$\frac{1,65}{4} = 0,412 \text{ м}^3 = 412 \text{ л};$$

Маса джерела вуглецю на одноразове підживлення:

$$0,412 \times 400 = 164,8 \text{ кг}$$

Тривалість культивування становить 48 годин. Підживлювальний розчин вноситиметься через кожні 12 годин.

Отже, кількість етапів підживлення:

$$\frac{48}{12} = 4$$

Приготування та стерилізація підживлювального розчину відбувається у передбаченому для цього збірнику об'ємом 2,5 м³.

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища,

включає такі **додаткові стадії**:

1. Підготовка стерильного аераційного повітря.
2. Підготовка запасних розчинів сульфату феруму та тіаміну
3. Підготовка розчину соляної кислоти для підкислення середовища при його стерилізації в апаратах об'ємом 100 л, 1 м³.
4. Підготовка та стерилізація розчину гідроксиду для підлучення середовища після його стерилізації в апаратах об'ємом 100 л, 1 м³.
5. Підготовка розчину гідроксиду амонію для регуляції рН у процесі виробничого біосинтезу.
6. Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози.

Також необхідно передбачити наступні **збірники та УБС**:

1. Збірник для приготування та стерилізації композиції А (об'ємом 25 л) при вирощуванні посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 100 л;
2. Збірник для розчинення компонентів композиції Б (об'ємом 63 л) при вирощуванні посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 100 л;
3. Збірник для приготування та стерилізації композиції А (об'ємом 250 л) при вирощуванні посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 1 м³;
4. Збірник для розчинення компонентів композиції Б (об'ємом 630 л) при вирощуванні посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 1 м³;
5. УБС-5 для стерилізації компонентів середовища для виробничого біосинтезу;
6. Збірник об'ємом 4 м³ для розчинення компонентів середовища для виробничого біосинтезу;
7. Збірник об'ємом 2,5 м³ для приготування та стерилізації підживлювального розчину глюкози.
8. Збірник об'ємом 25 л для зберігання гідроксиду амонію.

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Цільовий продукт як субстанція випускається у кристалічній формі, та в подальшому, у процесі виробництва ЛЗ, буде розчинятись у фізіологічному

розчині та додатково проходити стадію холодної стерилізації на бактеріальних фільтрах.

Цільовий продукт є екзометаболітом і продукується клітинами *E. coli* Х1р3 безпосередньо у поживне середовище [3].

Отже, після закінчення процесу біосинтезу у культуральній рідині міститимуться: цільовий продукт, клітини продуцента та залишкові речовини (компоненти поживного середовища та продукти метаболічної активності біологічного агента).

Виділення та очищення цільового продукту включає такі етапи:

- Відділення біомаси;
- Ультрафільтрація супернатанту;
- Нанофільтрація супернатанту;
- Сорбція на вугільному фільтрі;
- Елюція з вугільного фільтра;
- Сорбція на катіоніті;
- Елюція з катіоніта;
- Кристалізація під вакуумом;
- Висушування кристалів;
- Фасування, пакування та маркування;

5.2.1. Обґрунтування способу відділення біомаси

Для вибору методу відділення біомаси необхідно врахувати великий об'єм культуральної рідини після виробничого біосинтезу (5,9 м³). Обраний метод повинен мати високий показник продуктивності.

Враховуючи вищенаведене, розділення доцільно проводити методом центрифугування тому що, у порівнянні з іншими методами він є найбільш ефективним.

В якості альтернативи, може бути запропонований метод сепарації. Проте, промислове обладнання (сепаратори) занадто дороговартісне і має складну конструкцію. Беручи до уваги подальші стадії очистки цільового продукту,

встановлювати сепарувальний апарат недоцільно.

5.2.2. Обґрунтування методу концентрування цільового продукту

Основним літературним джерелом, що лягло в основу обґрунтування етапів виділення та очищення цільового продукту став патент [4]. Це обумовлено тим, що у більшості нових (2015-2020 роки) наукових статей по отриманню фенілаланіну, його концентрацію визначають методом ВЕРХ, відповідно методики виділення амінокислоти не описані (лише підготовка проби до аналізу методом центрифугування та обробки певними реагентами). Більш новіших патентних джерел знайти не вдалося. Тому запропоновану у патенті [4] технологію ми намагалися обґрунтувати більш повніше і розширити підібравши сучасне технологічне обладнання.

Отримана після центрифугування надосадова рідина не містить клітин продуцента, але у її складі містяться залишкові сполуки – компоненти поживного середовища та високомолекулярні речовини, що продукуються біологічним агентом під час виробничого біосинтезу.

Перед початком процесу виділення цільового продукту, враховуючи необхідність забезпечення високого ступеню чистоти, потрібно відділити залишкові сполуки та концентрувати розчинену в супернатанті амінокислоту фенілаланін.

З метою концентрування та очистки розчинів амінокислот у промисловості найчастіше використовується метод ультрафільтрації [34, 35].

Для підбору діаметра пор ультрафільтраційної установки, необхідно врахувати молекулярну масу фенілаланіну, що становить 165 Да, та молекулярні маси високомолекулярних речовин, що містяться у супернатанті. Такими речовинами є ферменти лізиндекарбоксилаза, аргініндекарбоксилаза, глутаматдекарбоксилаза, гідролаза мурашиної кислоти та глюкозооксидаза [36]. Молекулярні маси цих сполук є значно вищими за молекулярну масу фенілаланіну, тому для їх відділення необхідно передбачити окрему ультрафільтраційну мембрану з коефіцієнтом розділення 5 кДа. Діаметр пор -

1,5 нм [37].

Після проходження через неї, фенілаланін буде міститись у пермеаті, а ферменти - у концентраті.

Другий етап - концентрування фенілаланіну. Для концентрування низькомолекулярних речовин використовуються нанофільтраційні мембрани, коефіцієнт розділення яких лежить у межах від 150 до 1000 Да. З цією метою пропонується встановити мембрану, що концентрує речовини молекулярною масою від 150 Да. Діаметр пор - 0,1 нм [38].

Після пропускання пермеату з цільовим продуктом через нанофільтраційну мембрану, фенілаланін буде знаходитись у концентраті.

Отже ультрафільтраційна установка буде оснащена відразу двома мембранами: діаметром пор 1,5 нм, для відокремлення високомолекулярних сполук. Яку замінять на мембрану 0,1 нм – для отримання концентрату фенілаланіну.

5.2.3. Обґрунтування методу виділення цільового продукту

Виділення амінокислоти фенілаланіну з утвореного концентрату буде відбуватись методом іонообмінної сорбції [4].

Першим етапом є сорбція фенілаланіну на активованому вугіллі. Даний сорбент є доступним, дешевим і високоселективним по відношенню до ароматичних амінокислот, зокрема фенілаланіну.

Механізм адсорбції полягає в утворенні водневих зв'язків між молекулами фенілаланіну та поверхнею активованого вугілля [39].

Адсорбційна здатність активованого вугілля - 0,25 г фенілаланіну на 1 г сорбенту [4].

З метою збільшення адсорбційної ємності активованого вугілля, його часточки необхідно подрібнити. Такий підхід сприяє підвищенню адсорбційної здатності вугілля, внаслідок збільшення його площі.

Недоліком активованого вугілля є його здатність утворювати зв'язки з іншими ароматичними амінокислотами, що входять до складу розчину,

наприклад, триптофаном, що міститься у середовищі для виробничого біосинтезу.

Альтернативою подрібненому вугіллю є використання сучасних вугільних фільтрів. Вони зручні у використанні, дешеві і не потребують встановлення додаткового обладнання для підготовки сорбенту. Тому при виборі обладнання, перевагу варто надати апаратам з вугільними фільтрами [40].

Перед початком процесу сорбції, поверхню вугільного фільтра, з метою активації, необхідно обробити концентрованою сульфатною кислотою до рівня рН 3,6 [4].

Обґрунтування розчину для елюції цільового продукту з активованого вугілля

Після проходження через вугільний фільтр, затримані на його поверхні молекули фенілаланіну необхідно елюювати. З цією метою можуть використовуватись наступні речовини:

- Дистильована вода;
- Розчин гідроксиду амонію;
- Тетрагідрофуран;
- Оцтова кислота;
- Етилацетат;
- Метанол;
- Етанол;
- Ацетон

Використання дистильованої води, або гідроксиду амонію призведе до сильного розбавлення елюату. Окрім того, гідроксид амонію, для найбільш ефективного протікання процесу, повинен мати високий рівень рН (близько 12). У випадку використання такого елюенту необхідно передбачити додаткові технологічні операції, з метою подальшої обробки амінокислотного розчину [4].

Найкращим елюентом з вищеперерахованих є етилацетат. Ця речовина найефективніше руйнує утворені зв'язки між амінокислотою та сорбентом, а

також забезпечує високу хроматографічну чистоту [4].

Етилацетат широко використовується у промисловості через свою ефективність та низьку вартість. Він хімічно стабільний, має приємний запах.

Варто зазначити екологічний аспект застосування етилацетату в якості елюенту. Дана речовина має нижчий показник токсичності і чинить менш шкідливий вплив на навколишнє середовище ніж його аналоги, такі як етанол, метанол, ацетонітрил та тетрагідрофуран [41].

З метою інтенсифікації процесу, температура елюенту повинна становити 60°C [4].

Обґрунтування процесу повторного виділення фенілаланіну

Для забезпечення високого ступеню чистоти цільового продукту, процес пропонується провести процес сорбції фенілаланіну на іонообмінній смолі. Повторний цикл сорбції - десорбції цільового продукту забезпечить чистоту вихідних кристалів [4].

Головними критеріями підбору іоніта є його хімічна стійкість, висока обмінна ємність, механічна цілісність та здатність зберігати форму при контакті з рідиною. Окрім того, іонообмінна смола повинна бути нерозчинною в елюенті, який використовується для змиву фенілаланіну з вугільного фільтра.

Смола Amberlite 200 відповідає усім вищенаведеним критеріям і нерозчинна в етилацетаті [4].

Фізико-хімічні особливості даного іоніту наведено нижче [42].

- Хімічна будова - кополімер стерол-дивінілбензену;
- Фізична форма - кулясті сірі гранули;
- Середній розмір гранул - 0,6 – 0,85 мм;
- Обмінна ємність - не менше 1,70 екв/л;
- Коефіцієнт набухання - не більше 6% ;

Amberlite 200 - сильнокислий катіоніт, отже, з метою підвищення ефективності процесу адсорбції, по закінченню процесу елюювання з активованого вугілля, необхідно понизити рН розчину фенілаланіну нижче його

ізоелектричної точки (до рН 1,8) за допомогою концентрованої сульфатної кислоти [4].

Також, перед процесом сорбції, смоли Amberlite 200, потрібно обробити розчином гідроксиду амонію та промити дистильованою водою до рН 9 для переведення в NH_4^+ форму. [4].

Обґрунтування розчину для елюції цільового продукту з іонообмінної смоли

Використовуваний елюент повинен руйнувати зв'язки між фенілаланіном та іонообмінною смолою. Враховуючи хімічні особливості іоніта Amberlite 200, з метою руйнації утвореної в процесі сорбції взаємодії, потрібно підвищити рівень рН. Отже, елюент повинен проявляти основні властивості. Найкращим вибором буде гідроксид амонію. Ця речовина широко використовується у промисловості через свою ефективність та доступність .

З метою інтенсифікації процесу, температура елюенту повинна становити 60°C [4].

5.2.4. Обґрунтування методу кристалізації цільового продукту

Виділений фенілаланін випускається у вигляді кристалів. З метою надання цільовому продукту необхідної форми та додаткового концентрування, необхідно передбачити установку для кристалізації.

При виборі технології, найбільшу перевагу варто надати кристалізації під вакуумом. За рахунок створення вакууму та випарювання розчинника, розчин амінокислоти охолоджуватиметься з утворенням кристалів [43].

Установки подібного типу є високопродуктивним обладнанням. Також, через наявність вакууму, можна регулювати розмір кристалів зміною температури і швидкості їх утворення.

Для запобігання нашаруванню кристалів на стінки апарата варто встановити мішалку.

5.2.5. Обґрунтування методу висушування

Отримані кристали характеризуються високим вологовмістом (70%), отже їх необхідно висушити.

У промисловості, для сушіння подібних речовин використовуються барабанні сушарки [45].

Сушіння у апаратах такого типу здійснюється підігрітим повітрям. Температура на вході – 90-95°C, на виході – 60-65°C, температура цільового продукту в процесі сушіння становить 30-40°C. Швидкість руху повітря становить 2-3 м/с, такий режим мінімізує винесення продукту з повітрям.

Температурний режим сушарок такого типу підходить для висушування кристалів фенілаланіну. Перевагами є відносна простота конструкції та робота при атмосферному тиску [45].

5.2.6. Пакування та фасування

Для подальшого транспортування кристали фенілаланіну упаковується у вологонепроникні металізовані пакети. Вміст цільового продукту в одному пакеті становить 50 г.

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

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - 5,9 м³;
2. Концентрація цільового продукту у КР - 61,3 г/л;
3. Концентрація біомаси - 8 г/л;
4. Відсоток втрат при виділенні становить 38 % ;
5. Початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає:
6. $5,9 \text{ м}^3 \times 61,3 \text{ кг/м}^3 = 361,6 \text{ кг}$; кінцева кількість (з урахуванням 38% втрат) має становити 225 кг

Розподіл втрат по стадіям доцільно навести у вигляді таблиці.

Таблиця 5.3.

Підбір технологічного обладнання з урахуванням матеріальних потоків по стадіям

№	Назва стадії	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Витрати	Вийшло	
-	-	-				-
ТП 7. Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 7.1 Зберігання культуральної рідини	КР	5 900 л	-	5 900 л	Збірник об'ємом 6,3 м ³
ТП 8. Відділення біомаси						
2	ТП 8.1. Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	47,2 кг, з урахуванням 90% вологості - 425 кг	-	425 кг	Проточна центрифуга. Продуктивність - 2 м ³ /год
		Фугат	5 475 л	219 л (4%)	5 256 л- (на УФ-установку)	
ТП 9. Очистка та концентрування цільового продукту						
3	ТП 9.1. Ультрафільтрація супернатанту	Фугат	5 256 л	-	-	Ультрафільтраційна мембрана. Діаметр пор - 1,5 нм. УФ-установка, продуктивність - 2,5 м ³ /год.
		Концентрат	1752 л	-	-	
		Пермат з ультрафільтрації	3504 л	175 л (5%)	3328 л-	
4	ТП 9.2. Нанофільтрація супернатанту	Пермат з ультрафільтрації	3328 л	-	-	Нанофільтраційна мембрана. Діаметр пор - 0,1 нм. УФ-установка, продуктивність - 2,5 м ³ /год.
		Пермат	-	-	2998 л	
		Концентрат	330 л	(5%)	314 л	
ТП 10. Виділення цільового продукту						

ТП 10.1. Сорбція на вугільному фільтрі						
5	ТП 10.1.1 Підготовка вугільного фільтра	-	-	-	-	-
6	ТП 10.1.2. Сорбція на вугільному фільтрі	Концентрат	314 л	-	-	Установка з вугільним фільтром. Продуктивність - 500 л/год.
		Сорбований концентрат	-	12 л (4%)	302 л	
7	ТП 10.1.3. Елюція з вугільного фільтра	Сорбований концентрат	302 л	-	-	
		Елюат	-	36 л (12%)	226 л	
ТП 10.2. Повторна сорбція						
8	ТП 10.2.1 Підготовка елюату до сорбції	Елюат	266 л	-	-	Збірник обладнаний мішалкою об'ємом 400 л
		Підготований елюат	-	-	266 л	
9	ТП 10.2.2 Підготовка іонообмінної смоли	-	-	-	-	-
10	ТП 10.2.3 Сорбція на катіоніті	Підготований елюат	266 л	-	-	Іонообмінна колонка
		Сорбований елюат	-	8 л (3%)	258 л	
11	ТП 10.2.4 Елюція з катіоніта	Сорбований елюат	258 л	-	-	
		Елюат	-	25,8 л (10%)	232 кг	
ТП 11. Кристалізація цільового продукту						
12	ТП 11.1. Кристалізація під	Елюат	232 кг	-	-	Вакуум-кристалізаційний апарат. Продуктивність - 20
		Вологі кристали	-	5%	220 кг	

	вакуумом	(вологість 70%)				л/годину.
ТП 12. Сушіння						
13	ТП 12.1. Висушування кристалів	Вологі кристали (вологість 70%)	220 кг	-	-	Барабанна сушарка. Продуктивність - 300 кг/годину.
		Висушені кристали (вологість - 5%)	-	6,6 кг (3%)	213 кг	
ТП. 13. Фасування, пакування та маркування						
14	ТП. 13.1 Фасування, пакування та маркування	Висушені кристали (вологість - 5%)	213 кг	-	-	Фасувально-пакувальна машина. Продуктивність - 1 500 уп./год
		Упаковки по 50 г	-	-	4260 упаковок	

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Нижче наведено специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *табл. 6.1*).

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Пристрій для забору повітря IMP XX.000 Витрати повітря – 10 000 м ³ /год; Потужність – 5,5 кВт. Виробник: «HPM Engineering srl», Італія. ¹
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр ФВП-99-25-G3. Фільтрувальний матеріал – поліестер. Продуктивність: 7600 м ³ /год. Робоча температура: від -40 до +110°С. Виробник: «ЕлВент», Росія. ²
К-3	Компресор	1	Компресор Airpol 11. Продуктивність: 1,16 м ³ /хв. Максимальний робочий тиск – 1,3 МПа. Потужність – 11 кВт. Виробник: «Компратех», Росія. ³
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Vents ОКВ 500×300-3. Максимальний робочий тиск – 1,5 МПа. Виробник: «Вентс», Україна. ⁴
Р-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 110/16. Об'єм – 110 л. Максимальний робочий тиск – 1,6 МПа. Виробник: «Кіровмолснаб», Росія. ⁵
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач повітря Vents НКВ 500×300-2. Максимальний робочий тиск – 1,5 МПа. Робоча температура – 100°С. Виробник: «Вентс», Україна. ⁶
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр тонкої очистки класу F9. Продуктивність: 3400 м ³ /год. Робоча температура: від -40 до +110°С. Виробник: «ЕлВент», Росія. ⁷

НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Зведенюк О.О.		
Перевір.		Ключка Л.В.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
		Літ.	Арк.	Аркушів
			53	2906
55 Кафедра БТМ				

Ф-8 Ф-14 Ф-22 Ф-32	Індивідуальний фільтр очистки повітря	4	Фільтр ФБА-1. Клас очистки Н14. Ступінь очищення – 99,995%. Робоча температура: від +5 до +110°C. Виробник: «ЕлВент», Росія ⁸ Ф-8 – продуктивність 150 м ³ /год, розміри (мм): ширина - 305, висота - 305, товщина 150) Ф-15 — продуктивність 600 м ³ /год; Ф-23 – продуктивність – 1200 м ³ /год; Ф-34 – продуктивність – 2000 м ³ /год.
I-9	Інокулятор*	1	Інокулятор об'ємом 10 л. Додаткове оснащення: барботер, мішалка, сорочка, датчики температури, піни та рН. Матеріал корпусу: сталь AISI 304. Максимальний робочий тиск – 0,2 МПа. Габаритні розміри, мм: висота - 668; ширина - 277; Виробник: «BIOSTAT® Cplus», Росія ⁹
P-10	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 25 л. Оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм. Частота обертів – від 25 до 30000 об/хв. Габаритні розміри, мм: висота - 1485; ширина - 560; Матеріал корпусу: нержавіюча сталь Виробник: «ХимМаш», Росія. ¹⁰
Д-11 Д-16 Д-19 Д-24 Д-28	Об'ємно-ваговий дозатор для компонентів поживного середовища		Ваговий дозатор сипучих матеріалів ВД-1. Продуктивність – 2400 доз/год. Об'єм накопичувального бункера – 240 л. Діапазон дозування – 2000 г. Габарити, мм: довжина – 1700; ширина – 1200; висота – 2200. Виробник: «ПакТех», Україна ¹¹
P-12	Реактор-змішувач для розчинення солей (композиції Б)	1	Реактор об'ємом 63 л. Оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (частота обертів - 150 об/хв.). Габаритні розміри (ширина -655 мм, висота-1275 мм, довжина -930 мм); Потужність двигуна 5,56 кВт Виробник: «Промвіт», Україна. ¹²
H-13	Насос відцентровий для перекачування композиції Б від збірника Р-12 до інокулятора I-15	1	Насос ВЕ-М 10. Продуктивність: 3,5 л/хв. Потужність – 0,3 кВт. Габаритні розміри, мм: довжина – 210; ширина 120; висота – 190. Виробник: «Rover rompre», Італія ¹³
I-15	Інокулятор	1	Інокулятор РФ-100 об'ємом 100 л, Додаткове оснащення: сорочка, барботер, мішалка. Максимальний робочий тиск: 0,3 Мпа. Максимальна робоча температура – 150 °С.

			<p>Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316.</p> <p>Габаритні розміри, мм: висота - 1600; ширина - 700; довжина – 1300.</p> <p>Виробник: «Промвіт», Україна.¹⁴</p>
P-17	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 250 л.</p> <p>Оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм.</p> <p>Матеріал корпусу: нержавіюча сталь</p> <p>Габаритні розміри, мм: висота - 1643; ширина – 1040; довжина – 930.</p> <p>Робочий тиск – 0,6 Мпа.</p> <p>Виробник: «Красный Октябрь», Росія.¹⁵</p>
H-18	Насос відцентровий для перекачування композиції А від збірника Р-17 до інокулятора І-23	1	<p>Насос BE-M 14.</p> <p>Продуктивність: 15 л/хв. Потужність – 0,45 кВт.</p> <p>Габаритні розміри, мм: довжина – 230; ширина 120; висота – 190.</p> <p>Виробник: «Rover pompe», Італія¹⁶</p>
P-20	Реактор-змішувач для розчинення солей (композиції Б)	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 630 л.</p> <p>Оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм. Габаритні розміри, мм: висота - 1840; ширина - 1380; довжина – 1270.</p> <p>Матеріал корпусу: нержавіюча сталь</p> <p>Виробник: «СвроХімМаш», Україна.¹⁷</p>
H-21	Насос відцентровий для перекачування композиції Б від збірника Р-20 до інокулятора І-23	1	<p>Насос Speroni PM-20.</p> <p>Продуктивність – 1,5 м³/год. Потужність – 0,5 кВт.</p> <p>Габаритні розміри, мм: довжина – 332; ширина 221; висота – 167.</p> <p>Виробник: «Speroni», Україна¹⁸</p>
I-23	Інокулятор**	1	<p>Інокулятор Ф-1000, об'ємом 1 м³.</p> <p>Додаткове оснащення: сорочка, барботер, мішалка.</p> <p>Максимальна робоча температура – 142 °С</p> <p>Матеріал корпусу: сталь AISI 304.</p> <p>Габаритні розміри, мм:; ширина - 1112; висота – 2080; довжина - 1360.</p> <p>Виробник: «Агромаш», Росія.¹⁹</p>
P-25	Реактор-змішувач для розчинення компонентів поживного середовища для стерилізації в УБС	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 4 м³.</p> <p>Матеріал корпусу: нержавіюча сталь</p> <p>Габаритні розміри, мм: висота - 3070; ширина – 1766; довжина – 2130.</p> <p>Виробник: «Красный Октябрь», Росія.²⁰</p>
H-26	Насос відцентровий для перекачування композиції А від збірника Р-25 до УБС-5 У-27	1	<p>Насос EBARA DWO 150.</p> <p>Продуктивність – 33 м³/год. Потужність – 1,1 кВт.</p> <p>Габаритні розміри, мм: довжина – 432; ширина 205; висота – 280.</p> <p>Виробник: «EBARA», Японія²¹</p>
У-27	УБС-5	1	Установка безперервної стерилізації.

			<p>Потужність: 5 м³/год. Температура стерилізації: 135°C. Тиск пари: 0,5 МПа. Тиск стиснутого повітря: 0,4 МПа. Габаритні розміри: довжина – 2500; ширина- 1500; висота - 2000. Виробник : «Saideli», Китай.²²</p>
P-29	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації підживлювального розчину глюкози	1	<p>Реактор-змішувач об'ємом 2,5 м³. Оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь Габаритні розміри, мм: висота - 2625; ширина – 1562; довжина – 1930. Виробник: «Красный Октябрь», Росія.²³</p>
H-30	Насос відцентровий для перекачування підживлювального розчину глюкози від збірника P-29 до ферментера ФР-33	1	<p>Насос Sregoni RX 4-4. Продуктивність – 9,6 м³/год. Потужність – 0,75 кВт. Габаритні розміри, мм: довжина – 485; ширина 175; висота – 200. Виробник: «Sregoni», Україна²⁴</p>
P-31	Реактор для зберігання розчину гідроксиду амонію	1	<p>Збірник об'ємом 25 л. Габаритні розміри, мм: висота - 500; ширина - 450; довжина – 620. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь Виробник: «ЄвроХімМаш», Україна²⁵</p>
ФР-33	Ферментер***	1	<p>Ферментер об'ємом 10 м³. Додаткове оснащення: сорочка, барботер, лопатева мішалка, датчики температури, тиску, розчиненого кисню та рывня рН. Максимальний тиск в апараті – 0,3 МПа. Максимальна робоча температура – 135°C. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L. Габаритні розміри, мм: висота – 5595, ширина – 2400. Виробник: «Ей Пі Біосистеми», Росія (ферментер виготовляється на замовлення).²⁶</p>
H-34	Насос перистальтичний для перекачування КР від ферментера ФР-33 у збірник для зберігання культуральної рідини	1	<p>Насос Ragazzini SF190. Продуктивність – 34 м³/хв. Максимальний тиск – до 1,5 МПа. Діаметр шлангу – 90 мм. В'язкість – до 70 000 сСт. Габаритні розміри, мм: довжина – 1650; висота – 1365; ширина – 820. Виробник: «Ragazzini», Італія.²⁷</p>
3-35	Збірник для зберігання КР	1	<p>Збірник об'ємом 6,3 м³. Обладнаний сорочкою та лопатевою мішалкою. Габаритні розміри (мм): довжина - 2330; ширина - 1966; висота - 3600. Матеріал корпусу - нержавіюча сталь. Робочий тиск: в корпусі - 0,3 МПа, в сорочці - 0,4 МПа.</p>

			Виробник: “Красный октябрь”, Росія. ²⁸
Н-36 Н-38	Насос перистальтичний	2	Насос перистальтичний “Ragazzini SF 190”. Продуктивність при безперервній роботі - 18,6 м ³ /год. Габаритні розміри (мм): висота - 1365; довжина - 1650; ширина - 820. Робочий тиск - до 1,5 МПа. Виробник: “Ragazzini”, Італія. ²⁹
Ц-37	Центрифуга проточна	1	Проточна трубчата центрифуга BR145. Продуктивність - 2 м ³ /год. Габаритні розміри (мм): висота - 1610 мм; ширина - 760 мм; довжина - 640 мм. Максимальна швидкість - 14 000 об/хв. Виробник: “Біо-Рус”, Росія ³⁰
УФ-39	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка “УОВ-ТП-2,5-014”. Продуктивність по фільтрату - 2,5 м ³ /год. Тиск фільтрату - 0,3 МПа. Потужність - 2,5 кВт. Габаритні розміри (мм): висота - 1650; довжина - 1250; ширина - 620. Виробник: “Електроніка”, Росія ³¹
Н-40 Н-42 Н-44 Н-46 Н-50	Насос відцентровий	4	Насос відцентровий “Leo 3.0 (775334)”. Продуктивність - 20 л/хв. Напруга - 220 В. Частота - 50 Гц. Габаритні розміри (мм): довжина - 476; ширина - 190; висота - 212. Виробник: “Leo”, КНР ³²
ФУ-41	Фільтрувальна установка з вугільним фільтром	1	Фільтрувальна установка “Mobicon 200”. Максимальна швидкість потоку - 1 м ³ /год. Максимальний тиск - 0,01 МПа. Габаритні розміри (мм): висота - 1, ширина - 0,57. Виробник: “Desotec”, Бельгія ³³
З-43	Збірник для підготовки елюату	1	Збірник об'ємом 400 л. Обладнаний лопатевою мішалкою. Матеріал корпусу - нержавіюча сталь. Габаритні розміри (мм): висота - 1555; ширина - 1070; довжина - 1210. Виробник: “Красный октябрь”, Росія. ³⁴
КХ-45	Колонка для іонообмінного обміну	1	Колонки “DAS - 800”. Габаритні розміри (мм): висота - 1300; діаметр - 800. Робочий тиск - до 10 МПа. Матеріал - сталь. Виробник: “Hanbon”, КНР ³⁵
К-47	Вакуумний кристалізатор	1	Вакуумний кристалізатор “DezltLT VR”. Продуктивність - 20 л/год. Об'єм - 500 л. Габаритні розміри (мм): висота - 2800; довжина - 2300. Виробник: “Condorchem Envitech”, Іспанія.

			36
C-48	Барабанна сушарка	1	Сушарка барабанного типу С-0,3. Продуктивність 0,3 м ³ / год. Габаритні розміри (мм): довжина - 3000; ширина - 800. Виробник: "Асоціація підприємств БМП", Росія ³⁷
ФМ-49	Фасувально-пакувальна машина	1	Фасувально-пакувальна вертикальна машина FZL-100. Діапазон зважування до 100г. Продуктивність: до 25 упаковок/хв. Габаритні розміри (мм): ширина-510; висота- 1400 Виробник: "Фойер", Україна ³⁸
З-51	Збірник для біомаси	1	Збірник об'ємом 630 л. Обладнаний лопатевою мішалкою. Матеріал корпусу - нержавіюча сталь. Габаритні розміри (мм): висота - 1690; ширина - 1168; довжина - 1300. Виробник: "Красный октябрь", Росія. ³⁹

**Габаритні розміри інокулятора об'ємом 10 л визначались згідно розмірів ідентичного за об'ємом збірника.*

***Габаритні розміри інокулятора об'ємом 100 л визначались згідно розмірів ідентичного за об'ємом збірника.*

**** Габаритні розміри ферментера об'ємом 10 м³ визначались згідно каталогу «Вертикальные стальные сварные аппараты с перемешивающими устройствами»-Ленинхиммаш.*

Примітка: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел:

1. <https://www.hpmengineering.it/en-en/product/mobile-unit-for-air-input-ventilation> («HPM Engineering srl», пристрій для забору повітря);
2. <https://www.el-vent.ru/> («ЕлВент», фільтр грубої очистки повітря);
3. <https://compressing.ru/kompressory/airpol-11-13> («Компратех», ресивер);
4. <https://vent-market.com.ua/shop/product/vents-okv-500h300-3> («Vents», теплообмінник-охолоджувач);
5. <https://kms-kirov.ru/catalog/kompressornoe-oborudovanie/soputstvujushhie-tovary/resivery-vozduhosborniki/> («Кіровмолснаб», компресор);

6. <https://vent-market.com.ua/shop/product/vents-nkv-500h300-2> («Vents», теплообмінник-нагрівач);
7. <https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/tonkoj-ochistki/klass-f9-eu9/filtr-vozdushnyj-karmannyj-fvk-fyak-tonkoj-ochistki-f5-f9-material-meltbloun/#tabs-dokumentaciya> («ЕлВент», головний фільтр);
8. <https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-absolyutnoj-ochistki/filtr-vozdushnyj-absolyutnoj-ochistki-s-alyuminievym-separatorom-fva-i-fyas-klass-ochistki-h11-u15/> («ЕлВент», індивідуальний фільтр);
9. http://www.sartogsm.ru/biostat_c_plus.html («BIOSTAT® Cplus», інокулятор об'ємом 10 л);
10. <https://mash-him.ru/index/fotogalereya/albom-n1> («ХимМаш», реактор-змішувач 25 л);
11. <https://pack-tech.com.ua/p936405033-vesovoj-dozator-sypuchih.html> («ПакТех», ваговий дозатор для сипучих речовин);
12. <https://promvit.com.ua/reaktor-mobilnyj-rsm-50-dlya-prigotovleniya-rastvorov> («Промвіт», реактор-змішувач 63 л);
13. <https://www.ampika.ru/oborudovanie.html?id=8225> («Rover pompe», насос);
14. <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rabochim-obemom-100-l/> («Промвіт», інокулятор об'ємом 100 л);
15. <https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/581.html> («Красный Октябрь» збірник об'ємом 250 л);
16. <https://www.ampika.ru/oborudovanie.html?id=8255> («Rover pompe», насос);
17. http://euromash.kiev.ua/ua/sborniki_emal_ua.php («ЄвроХімМаш» збірник 630 л);
18. <https://watton.ua/ru/speroni-nasos-pm-20.html> («Speroni», насос);

19. <https://www.agro-mash.ru/fermenter.html> («Агромаш», інокулятор об'ємом 1 м³);
20. <https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/583.html> («Красный Октябрь» Рекатор-змішувач 4 м³);
21. <https://watton.ua/ru/ebara-nasos-dwo-e-150.html> («ЕВАРА» насос);
22. <http://sdlcentrifuge.ru/9-continuous-sterilization-system/192767/> («Saideli», УБС-5);
23. <https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/583.html> («Красный Октябрь» Рекатор-змішувач 2,5 м³);
24. https://aquavin.com.ua/catalog/nasosi_bagatostupenevi/nasos_bagatostupenyi_speroni_rx_4_4_0_75_kv_3f/ («Speroni», насос);
25. http://euromash.kiev.ua/ua/sborniki_emal_ua.php («ЄвроХімМаш», збірник об'ємом 25 л);
26. <http://biofermenter.ru/pilotnyye-i-promyshlennyye-fermentery-i-bioreaktory-ot-10-do-15000-1> («Ей Пі Біосистеми», ферментер об'ємом 10 м³).
27. https://promnasos.com/catalog/peristaltic_pumps/ragazzini/10085/ (насос перистальтичний)
28. <https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/583.html> (збірник “Красный октябрь”, Росія);
29. https://promnasos.com/catalog/peristaltic_pumps/ragazzini/10085/ (насос перистальтичний, “Ragazzini” Італія);
30. <https://bio-rus.ru/oborudovanie/protochnyye-czentrifugi/protochnyye-trubchatyye-czentrifugi/> (центрифуга проточна, “Біо-Рус” Росія);
31. http://chemanalytica.com/book/novyy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/10_protsessy_i_apparaty_khimicheskikh_tekhnologiy_chast_II/7113 (УФ-установка “Електроника”, Росія);
32. https://sigma.ua/buy/nasos-ts-bezhnyy-0-55kv_30m-hmax-37m-qmax-20l-min-leo-3-0-775334/ (насос відцентровий, “Leo”, КНР);

33. <https://www.desotec.com/en/solutions/filter-solutions> (фільтрувальна установка з вугільним фільтром, “Desotec”, Бельгія);
34. <https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/582.html> (збірник об'ємом 400 л, “Красный октябрь”, Росія);
35. http://www.medbusiness.ru/Images/FTU_Content/FTU_2-17/FTU_2_2017_56-57.pdf (хроматографічні колони “Hanbon”, КНР);
36. <https://condorchem.com/ru/%d0%ba%d1%80%d0%b8%d1%81%d1%82%d0%b0%d0%bb%d0%bb%d0%b8%d0%b7%d0%b0%d1%82%d0%be%d1%80%d1%8b-%d0%b4%d0%bb%d1%8f-%d0%be%d1%87%d0%b8%d1%81%d1%82%d0%ba%d0%b8-%d1%81%d1%82%d0%be%d1%87%d0%bd%d1%8b%d1%85/desalt-lt-vr/> (вакуумний кристалізатор “Condorchem Envitech”, Іспанія);
37. <https://www.bmpa.ru/barabannaya-sushilka-dlya-shchery-i-sypuchih-materialov> (барабанна сушарка, ”Асоціація підприємств БМП”, Росія);
38. <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fz1-100> (фасувально-пакувальна машина “Фойер”, Україна).
39. <https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-jemalirovannye/sborniki-s-rubashkoj-v04-063-m3.html> (збірник для біомаси, “Красный октябрь”, Росія).

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема одержання фенілаланіну включає наступні стадії:

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

ДР 1.2. Подача повітря на фільтр грубої очистки

ДР 1.3. Компресування повітря

ДР 1.4. Охолодження повітря

ДР 1.5. Подача повітря у ресивер

ДР 1.6. Нагрівання повітря

ДР 1.7. Очищення повітря в головному фільтрі

ДР 1.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

ДР 2. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів

ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення поживного середовища в процесі стерилізації.

ДР.2.1.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для інокулятора об'ємом 100 л.

ДР.2.1.2. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для інокулятора об'ємом 1 м³.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для титрування поживного середовища після стерилізації.

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для інокулятора об'ємом 100 л.

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для інокулятора об'ємом 1 м³.

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Зведенюк О.О.			Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Ключка Л.В.				62	2906
Реценз.					64		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.					

ДР 2.3. Підготовка розчину гідроксиду амонію

ДР 2.3.1 Розчину гідроксиду амонію для підтримання рН в процесі виробничого біосинтезу

ДР 2.4 Підготовка та стерилізація підживлювального розчину глюкози

ДР 2.4.1 Приготування та стерилізація розчину глюкози

ДР 3. Приготування та стерилізація запасних розчинів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину сульфату феруму

ДР 3.2. Приготування та стерилізація розчину тіаміну

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 10 л.

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 100 л.

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 1 м³.

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.

ДР 4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

ТП 5.2. Розсів до ізольованих колоній

ТП 5.3. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л

ТП 5.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 100 л

ТП 5.7. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 1 м³

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10м³

ТП 7. Зберігання культуральної рідини;

ТП 7.1 Зберігання культуральної рідини;

ТП 8. Відділення біомаси;

ТП 8.1. Центрифугування культуральної рідини;

ТП 9. Очистка та концентрування цільового продукту;

ТП 9.1. Ультрафільтрація супернатанту;

ТП 9.2. Нанофільтрація супернатанту;

ТП 10. Виділення цільового продукту;

ТП.10.1. Сорбція на вугільному фільтрі;

ТП 10.1.1. Підготовка вугільного фільтра;

ТП 10.1.2. Сорбція на вугільному фільтрі;

ТП 10.1.3. Елюція з вугільного фільтра;

ТП 10.2. Повторна сорбція;

ТП 10.2.1. Підготовка елюату до сорбції;

ТП 10.2.2 Підготовка іонообмінної смоли;

ТП 10.2.3. Сорбція на катіоніті;

ТП 10.2.4 Елюція з катіоніта;

ТП 11. Кристалізація цільового продукту;

ТП 11.1. Кристалізація під вакуумом;

ТП 12. Сушіння;

ТП 12.1. Висушування кристалів;

ТП. 13. Фасування, пакування та маркування;

ТП. 13. 1. Фасування, пакування та маркування;

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник (ПЗ-1) на висоті 14 м, де концентрація мікроорганізмів та пилових часток є мінімальною.

ДР 1.2. Подача повітря на фільтр грубої очистки

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі грубої очистки (Ф-2), що забезпечує зниження кількості контамінантів на 80%. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, затримуються механічні частки діаметром 5–10 мкм.

ДР 1.3. Компресування повітря

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-3), при цьому створюється тиск величиною до 1,3 Мпа, температура повітря підвищується від 120 до 250°C. Підвищення температурного рівня має стрилізуючий ефект і сприяє знищенню значної кількості контамінуючої мікрофлори.

ДР 1.4. Охолодження повітря

Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 19 °С у теплообмінному апараті (Т-4). Далі видалену вологу подають у ресивер (Р-5), в якому відбувається додаткове видалення зайвої вологи.

ДР 1.5. Подача повітря у ресивер

Далі охолоджене повітря подають у ресивер (Р-5), в якому відбувається додаткове видалення зайвої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, а також зменшення пульсацій руху повітря.

ДР 1.6. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення конденсату пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, попередньо охолоджене повітря подається у теплообмінник (Т-6), де нагрівається до температури 30 °С.

ДР 1.7 Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-7), для доочищення. Ступінь очистки становить 95 %.

ДР 1.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-8, Ф-14, Ф-22, Ф-32), клас очистки H14. Ступінь очищення становить $E = 99,995 \%$.

ДР 2. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів

ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення поживного середовища в процесі стерилізації.

ДР.2.1.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для інокулятора об'ємом 100 л.

Для приготування 121 мл 6%-го розчину HCl, у стерильну колбу об'ємом 250 мл мірним циліндром наливають 97 мл дистильованої води. Далі, за допомогою мірного циліндра додають 24 мл 30%-го розчину соляної кислоти та перемішують. Рідини обов'язково змішують в такому порядку, з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

ДР.2.1.2. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для інокулятора об'ємом 1 м³.

Для приготування 1080 мл 6%-го розчину HCl, у стерильну колбу об'ємом 2 л мірним циліндром наливають 864 мл дистильованої води. Далі, за допомогою мірного циліндра додають 216 мл 30%-го розчину соляної кислоти та перемішують.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для титрування поживного середовища після стерилізації.

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для інокулятора об'ємом 100 л.

На технічних вагах зважують 7,3 г кристалічного NaOH. Наважку переносять в колбу об'ємом 250 мл, мірним циліндром добавляють 113 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для інокулятора об'ємом 1 м³.

На технічних вагах зважують 64,8 г кристалічного NaOH. Наважку переносять в колбу об'ємом 2 л, мірним циліндром добавляють 1015 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 2.3. Підготовка розчину гідроксиду амонію

ДР 2.3.1 Розчину гідроксиду амонію для підтримання рН в процесі виробничого біосинтезу

Для забезпечення сталого рівня рН (7,0) в процесі виробничого біосинтезу необхідно 10,7 л 10%-го розчину гідроксиду амонію. Для його зберігання передбачено збірник об'ємом 25 л (Р-31).

Збірник підвішується на висоту 6 м, для подачі титрувального агента самоплином.

ДР 2.4 Підготовка та стерилізація підживлювального розчину глюкози

ДР 2.4.1 Приготування та стерилізація розчину глюкози

Для створення підживлювального розчину, у передбачений для цього збірник об'ємом 2,5 м³ (Р-29) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-28) подається:

$$1,65 \times 0,4 = 0,66 \text{ м}^3 = 660 \text{ кг глюкози}$$

Та за допомогою лічильника 990 л питної води.

Розчин стерилізується у збірнику при температурі 112°C протягом 20 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація запасних розчинів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину сульфату феруму

На технічних терезах зважують 1г FeSO₄*7H₂O. Наважку переносять у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води (щоб отримати розчин з концентрацією солі 0,01 г/мл), перемішують, закривають колбу марлевим корком і стерилізують в автоклаві за температури 131 °С (50 хв).

ДР 3.2. Приготування та стерилізація розчину тіаміну

На технічних терезах зважують 1 г тіаміну. Наважку переносять у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води (щоб отримати розчин з концентрацією 0,01 г/мл), перемішують, закривають колбу марлевим корком і стерилізують в автоклаві за температури 112 °С (15 хв).

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

Для вирощування інокуляту необхідно 700 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 700 мл середовища наведено в *табл. 7.1*

Таблиця 7.1.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 700 мл поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 700 мл поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	20	14	А	250
Дріжджовий автолізат	8	5,6		
КН ₂ РО ₄	4	2,8	Б	390
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	1,4		
Цитрат натрію	2	1,4		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,14	В	60
Вода	-	673	-	-

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 14 г глюкози та 5,6 г дріжджового автолізу. Суміш поміщають у колбу об'ємом 1000 мл та за допомогою мірного циліндра додають 230 мл дистильованої води.

Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві при температурі 121 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують 2,8 г KH_2PO_4 , 1,4 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 1,4 г цитрату натрію та , переносять у колбу об'ємом 500 мл та за допомогою мірного циліндра додають 309 мл дистильованої води.

Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В.

На технічних вагах зважують 0,14 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, наважку переносять у колбу об'ємом 250 мл та за допомогою мірного циліндра додають 60 мл дистильованої води.

Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 10 л.

Об'єм поживного середовища для даного апарата становить 6 л. Вміст компонентів для приготування 6 л середовища наведено в *табл. 7.2*

Таблиця 7.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
---------------------------------------	--------------------------	---	-------------------	----------------------------

Глюкоза	20	120	А	1,5
Дріжджовий автолізат	8	48		
KH_2PO_4	4	24	Б	3,7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	12		
Цитрат натрію	2	12		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	1,2	В	0,2
Вода	-	5 206	-	-
Конденсат	-	600	-	-

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 120 г глюкози, 48 г дріжджового автолізату. Суміш поміщають у колбу об'ємом 3 л та додають 1330 мл дистильованої води.

Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві при температурі 121 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують 24 г KH_2PO_4 , 12 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 12 г цитрату натрію, переносять у колбу об'ємом 6 л та за допомогою мірного циліндра додають 3530 мл дистильованої води.

Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

. На технічних вагах зважують 1,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл та за допомогою мірного циліндра додають 188 мл дистильованої води.

Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 100 л.

Об'єм поживного середовища, що вноситься у апарат об'ємом 100 л, складає 60 л.

Узагальнені дані щодо складу композицій наведено нижче у вигляді таблиці.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 60 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 60 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	1200	А	15
Дріжджовий автолізат	8	480		
Тіамін	0,04	2,4		
KH ₂ PO ₄	4	240	Б	39
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	120		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,008	0,48		
Цитрат натрію	2	120		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	12		
Вода	-	51,7 л	-	-
Конденсат	-	6	-	-

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 1200 г глюкози, 480 г дріжджового автолізату та 2,4 г тіаміну. Суміш переносять у збірник об'ємом 25 л (Р-10) та за допомогою лічильника додають 13,3 л питної води.

Далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при 121 °С упродовж 20 хв.

Збірник встановлюють на платформу висотою 2 м, для подальшої подачі композиції А самоплином.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують 240 г KH₂PO₄, 120 г (NH₄)₂SO₄, 0,48 г FeSO₄·7H₂O, 120 г цитрату натрію та 12 г MgSO₄·7H₂O. та за допомогою об'ємно – вагового дозатора (Д-11) переносять у збірник об'ємом 63 л (Р-12), за

допомогою лічильника додають 37,2 л води.

Далі, додають 121 мл розчину соляної кислоти (від ДР.2.1.1.).

Для кращого розчинення компонентів вмикають мішалку.

Після розчинення компонентів, композицію Б (від ДР.2.1.1.) за допомогою насоса (Н-13) перекачують у інокулятор об'ємом 100 л (І-15). Потім в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С протягом 40 хв.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 1 м³.

Об'єм поживного середовища, що вноситься у апарат складає 0,54 м³.

Узагальнені дані щодо складу композицій наведено нижче у вигляді таблиці.

Таблиця 7.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,54 м³ поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0,54 м ³ поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	10,8	А	150
Дріжджовий автолізат	8	4,32		
Тіамін	0,04	0,216		
КН ₂ РО ₄	4	2,16	Б	336
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	1,08		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,008	0,00432		
Цитрат натрію	2	1,08		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,108		
Вода	-	445	-	-
Конденсат	-	54	-	-

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А.

За допомогою об'ємно – вагового дозатора (Д-16), у збірник об'ємом 250 л (Р-17) подається 10,8 кг глюкози та 4,32 кг дріжджового автолізу. На технічних вагах зважують 21,6 г тіаміну і додають до суміші.

Далі, лічильником у збірник подається 134,6 л питної води.

Для кращого розчинення компонентів вмикають мішалку.

Далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при 121 °С упродовж 20 хв.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

За допомогою об'ємно – вагового дозатора (Д-19), у збірник об'ємом 630 л (Р-20) подається 1,08 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,16 кг KH_2PO_4 .

На технічних вагах зважують 1,08 кг цитрату натрію, 108 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 4,32 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Суміш поміщають у збірник.

Далі, за допомогою лічильника, у збірник подається 320 л питної води.

Додають 1080 мл розчину соляної кислоти (від ДР.2.1.2.).

Для кращого розчинення компонентів вмикають мішалку.

Після розчинення компонентів, композицію Б за допомогою насоса (Н-21) перекачують у інокулятор об'ємом 1 м³ (І-27). Потім в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С протягом 40 хв.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Об'єм поживного середовища у ферментері для виробничого біосинтезу, з урахуванням об'єму підживлювального розчину глюкози становить 3,71 м³, але склад компонентів необхідно розраховувати виходячи з кінцевого об'єму поживного середовища.

З метою спрощення технології доцільно провести стерилізацію в установці безперервної стерилізації УБС-5.

Розрахунок вмісту компонентів для виробничого біосинтезу

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 3,71 м ³ поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, м ³
Глюкоза	60	321,6	А	3,71
Дріжджовий автолізат	4	21,44		
Бетаїн	0,3	1,608		
Тирозин	0,25	1,34		
КН ₂ РО ₄	5	26,8		
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	53,6		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,015	0,08		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015	0,08		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	2,68		
Вода	-	3085	-	-
Конденсат	-	536	-	-

ДР 4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А.

За допомогою об'ємно – вагового дозатора (Д-24), у збірник об'ємом 4 м³ (Р-25) подають 321,6 кг глюкози, 21,44 кг дріжджового автолізату, 1,608 кг бетаїну, 26,8 кг КН₂РО₄, 53,6 кг (NH₄)₂SO₄, 2,68 кг MgSO₄·7H₂O.

На технічних вагах зважують, 80 г FeSO₄·7H₂O та 80 г MnSO₄·H₂O, суміш поміщають у збірник.

Далі, за допомогою лічильника, у збірник подається 4575 л питної води.

Для кращого розчинення компонентів вмикають мішалку.

Після розчинення компонентів, композицію А за допомогою насоса (Н-26) перекачують у УБС-5 (У-27).

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу*ТП 5.1. Підтримання колекційної культури*

Культуру мікроорганізму *E.coli* Х1р3 зберігають у пробірках зі скошеним

МПА (м'ясо-пептонний агар) при температурі 4°C. Всі роботи з культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 5.2. Розсів до ізолюваних колоній

Для отримання робочої культури, необхідно колекційну культуру, що зберігається в пробірках з скошеним м'ясо-пептонний агар, розсіяти на чашки Петрі з поживним середовищем такого ж складу до ізолюваних колоній, вирощуючи бактерії при температурі 37°C упродовж 24 год.

ТП 5.3. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Ізолювані колонії з чашок Петрі пересівають петлею в пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром. Одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки. Використовуються колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Тривалість вирощування – 24 години при 37°C.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у 5 стерильних колб об'ємом по 750 мл вносять розчин композиції А (від ДР 4.1.1), розчин композиції Б (від ДР 4.1.2), розчин композиції В (від ДР 4.1.3) та стерильною піпеткою 0,7 мл сульфату феруму (від ДР 3.1) та 1,5 мл тіаміну. Перемішують і розливають по 100 мл у 7 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірки з робочою культурою *E.coli* ХІІр 3 вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колби. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою.

Штами вирощують у колбах на качалці (220 об/хв) упродовж 24 год.

Після перевірки посівного матеріалу на відсутність сторонньої мікробіоти, в лабораторному боксі посівний матеріал зливають в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л

У інокулятор об'ємом 10 л (І-9) за допомогою засівної колби вносять 1,5

л стерильного розчину композиції А (від ДР 4.2.1) та 0,2 л стерильного розчину композиції В (від ДР 4.2.3) та 7 мл розчину сульфату феруму та 14 мл тіаміну, за допомогою іншої засівної колби вносять 3,7 л стерильного розчину композиції Б (від ДР 4.2.2).

Вносять посівний матеріал (через засівну колбу від ТП 5.4).

Через індивідуальний фільтр (Ф-8) подається стерильне аераційне повітря (від ДР 1.8.).

Температура культивування 37 °С, перемішування відбувається за допомогою лопатевої мішалки, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 24 год.

Кожні 6 годин з інокулятора відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та контролю рівня біомаси, що має сягати 4 г/л.

Для спрощення процесу подачі культуральної рідини у апарат об'ємом 100 л, інокулятор об'ємом 10 л встановлюють на платформі висотою 2 м.

ТП 5.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 100 л

Для вирощування інокуляту інокулятор об'ємом 100 л (І-15), з 15 л стерильного розчину композиції Б (від ДР 4.3.2), самоплином подають 15 л стерильного розчину композиції А (від ДР 4.3.1). Також вносять 121 мл розчину NaOH для підлушення середовища (від ДР 4.2.1).

Через індивідуальний фільтр (Ф-14) подається стерильне аераційне повітря (від ДР 1.8.).

Самоплином подають посівний матеріал (від ТП 5.5). Температура культивування 37 °С, перемішування відбувається лопатевою мішалкою, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 24 год.

Кожні 6 годин з інокулятора відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю. Також проводять контроль рівня біомаси, що має сягати 4 г/л.

ТП 5.7. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 1 м³

Для вирощування інокуляту у посівний апарат об'ємом 1000 л з 336 л

стерильного розчину композиції Б (від ДР 4.4.2.), за допомогою насоса (Н-18) подають 150 л стерильного розчину композиції А (від ДР 4.4.1). Також вносять 1080 мл розчину NaOH для підлучення середовища (від ДР 2.2.2).

Через індивідуальний фільтр (Ф-22) подається стерильне аераційне повітря (від ДР 1.8.).

Вносять посівний матеріал (через трубу перетискування від ТП 5.6). Температура культивування 37 °С, перемішування відбувається лопатевою мішалкою, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 24 год.

Кожні 6 годин з інокулятора відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та контролю рівня біомаси (4 г/л).

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10м³

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований ферментер об'ємом 10 м³ (ФР-33) , за допомогою відцентровго насоса подається 3,71 м³ стерильного розчину композиції А (від ДР 4.5.1).

При рН 7,0 у ферментер подається посівний матеріал (через трубу перетискування від ТП 5.7).

Кожні 12 годин після початку культивування за допомогою насоса (Н-30) подається перша порція підживлювального розчину (від ДР 2.4.1) об'ємом 412 л.

Для підтримання рН 7,0, в процесі культивування автоматично самоплином подається розчин гідроксиду амонію (від ДР 2.3).

Через індивідуальний фільтр (Ф-38) подається стерильне аераційне повітря (від ДР 1.8.).

Температура культивування 37 °С, перемішування відбувається лопатевою мішалкою, витрати повітря 2 л/л·хв. Тривалість культивування становить 48 год.

Кожні 6 годин відбирають пробу для мікробіологічного контролю. Після завершення процесу ферментації відбирають проби для визначення біомаси (8 г/л) та концентрації фенілаланіну (61,3 г/л).

Початкова концентрація глюкози має становити 60 г/л, кінцева – 154 г/л.

ТП 7. Зберігання культуральної рідини.

ТП 7.1. Зберігання культуральної рідини.

КР за допомогою перистальтичного насоса (Н-34) перекачується з ферментера для виробничого біосинтезу у збірник об'ємом 6,3 м³ (З-35) для зберігання. Температура у процесі зберігання підтримується на рівні 5°C. З метою рівномірного розподілення клітин продуцента у товщі поживного середовища вмикається мішалка (20 об/хв).

ТП 8. Відділення біомаси.

ТП 8.1. Центрифугування культуральної рідини.

КР зі збірника (З-35) за допомогою перистальтичного насоса (Н-36) подається у проточну центрифугу (Ц-37). Частота обертів становить 14 000 об/хв. Процес центрифугування відбувається 3 години.

Відділена біомаса, за допомогою насоса (Н-50) перекачується у збірник (З-51).

ТП 9. Очистка та концентрування цільового продукту.

ТП 9.1. Ультрафільтрація супернатанту.

Після закінчення процесу центрифугування, одержаний супернатант з центрифуги (Ц-37), за допомогою перистальтичного насоса (Н-38), перекачується в ультрафільтраційну установку (УФ-39).

Процес ультрафільтрації відбувається під тиском 0,6 МПа. Діаметр пор ультрафільтраційної мембрани становить 1,5 нм.

ТП 9.2. Нанофільтрація супернатанту.

Після закінчення процесу ультрафільтрації, утворений пермат пропускається через встановлену нанофільтраційну мембрану. Діаметр пор становить 0,1 нм, робочий тиск - 0,6 МПа.

ТП 10. Виділення цільового продукту.

ТП 10.1. Сорбція на вугільному фільтрі.

ТП 10.1.1. Підготовка вугільного фільтра.

Перед початком сорбції, на вугільний фільтр, безпосередньо у фільтрувальній установці (ФУ-41), подають 14 л 96%-ї сульфатної кислоти до рН 3,6. Рівень рН вимірюється автоматично.

ТП 10.1.2. Сорбція на вугільному фільтрі.

Після закінчення процесу нанофільтрації, утворений концентрат, за допомогою відцентрового насоса (Н-40), перекачується у фільтрувальну установку (ФУ-41) з попередньо обробленим сульфатною кислотою вугільним фільтром. Швидкість потоку - 2 л/хв.

ТП 10.1.3. Елюція з вугільного фільтра.

По закінченню процесу сорбції фенілаланіну на фільтрі з активованого вугілля, відбувається елюція затриманих молекул. У фільтрувальну установку (ФУ-41) подається 266 л 9%-го розчину етилацетату за температури 60°C.

ТП 10.2. Повторна сорбція.

ТП 10.2.1 Підготовка елюату до сорбції.

Отриманий на етапі ТП. 10.3 елюат, з фільтрувальної установки (ФУ-41), за допомогою відцентрового насоса (Н-42) подається у збірник для підготовки елюату (З-43).

Після надходження рідини, у збірник вручну подається 96%-ва сульфатна кислота до рН 1,8. Рівень рН вимірюється автоматично.

ТП 10.2.2 Підготовка іонообмінної смоли.

У іонообмінну колонку (КХ-45) вручну подається 12 кг смоли Amberlite 200. Далі, на катіоніт, вручну подається 27 л 30%-го розчину гідроксиду амонію до рН 9,0. Рівень рН вимірюється автоматично.

ТП 10.2.3 Сорбція на катіоніті.

У іонообмінну колонку (КХ-45), з попередньо обробленою іонообмінною смолою, за допомогою відцентрового насоса (Н-44) подається 266 л підготовленого елюату від збірника (З-43).

Швидкість потоку - 1 л/хв.

ТП 10.2.4. Елюція з катіоніта.

По закінченню процесу сорбції фенілаланіну на іонообмінній смолі, у колонку (КХ-45), подається 258 л 30%-го розчину гідроксиду амонію при температурі 60°C.

ТП 11. Кристалізація цільового продукту.

ТП 11.1. Кристалізація під вакуумом.

Отриманий елюат, за допомогою відцентрового насоса (Н-46) перекачується у вакуумний кристалізатор (К-47). Тривалість процесу кристалізації - 12 годин. Для запобігання утворенню кристалів на стінках апарата вмикають мішалку, частота обертання - 15 об/хв.

ТП 12. Сушіння.

ТП 12.1. Висушування кристалів

Отримані кристали з кристалізатора (К-47) подаються у барабанну сушарку (С-48). Температура повітря на вході – 90°C, на виході – 60°C, температура цільового продукту в процесі сушіння становить 35°C. Тривалість процесу висушування - 1 година. Вологість кристалів до процесу сушіння - 70%, після сушіння - 5%.

ТП. 13. Фасування, пакування та маркування.

ТП. 13. 1. Фасування, пакування та маркування.

Висушені кристали із барабанної сушарки (С-48) подаються на фасувально-пакувальну машину (ФМ-49). Кристалічний фенілаланін фасується у вологонепроникні металізовані пакети по 50 г. Загальна кількість - 4260 упаковок. Тривалість процесу пакування - 3 години.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ			
Розроб.		Зведенюк О.О.			РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Ключка Л.В.					81	2906
Реценз.						83		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Підготовка аераційного повітря				
Кт 1.2. Подача повітря на фільтр грубої очистки	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	75 - 80 %,
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 1,3 МПа t = 120-250 °C
Кт 1.4 Охолодження повітря	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний,	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	t = 30 °C, W = 60 %
Кт. 1.5. Подача повітря у ресивер	Повітря після ресивера, температура	Термометр технічний	Після виходу повітря з ресивера	t = 30 °C,
Кт 1.6 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр	Після нагрівання повітря	t = 40 °C
Кт 1.7. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня	Після очистки повітря у фільтрі головного очищення	E = 95 %, тиск згідно паспорту

Кт 1.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,995 %
ДР 2. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів				
Кх 2.1. Приготування 6-% розчину HCl	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
Кт, Кх, Км 2.2. Приготування та стерилізація 6-% розчину NaOH	Концентрація розчину, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, хімічний метод, мікробіологічний метод	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, концентрація визначається після приготування розчину, мікробіологічний контроль після стерилізації	C = 6%, P=0,15 МПа, t=130 °C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Км. 2.3. Підготовка розчину гідроксиду амонію	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після підготовки розчину	C = 10%
Кт, Кх, Км 2.4. Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози	Концентрація розчину, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, хімічний метод, мікробіологічний метод	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, концентрація визначається після приготування розчину, мікробіологічний контроль після стерилізації	C = 40%, P=0,05 МПа, t=121 °C, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3. Приготування та стерилізація запасних розчинів				
Кт, Км 3.1. Приготування розчину сульфату феруму	Час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний метод	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °C, τ = 50 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2. Приготування розчину тіаміну	Час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний метод	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=112 °C, τ = 15 хв, відсутність мікробіоти
ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ				
ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 700 мл в колбах на качалках				

Кт, Км 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=121 °С, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в апараті об'ємом 10 л				
Кт, Км 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=121 °С, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в апараті об'ємом 100 л				
Кт, Км 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=121 °С, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Б		контроль		відсутність мікробіоти
ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в апараті об'ємом 1 м³				
Кт, Км 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,05 МПа, t=121 °С, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу				
Кт, Км 4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P=0,15 МПа, t=135 °С, τ = 5-7 хв, відсутність мікробіоти
ТП 5. Підготовка посівного матеріалу				
Кт, Км 5.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	t = 37 °С, τ = 24 год, n = 220 об/хв, X=4 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, датчик рН, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	τ = 24 год, t = 37°С, рН =7,0, X=4 г/л, n =220 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування,	Термометр технічний, датчик рН, годинник, фотоелектроколориметр,	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	τ = 24 год, t = 37°С, рН =7,0,

об'ємом 100 л	pH, температура, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	мікробіологічний контроль		X=4 г/л, n=220 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м ³	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, pH, температура, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, датчик pH, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	τ = 24 год, t = 37°C, pH =7,0, X=4 г/л, n =220 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 6. Виробничий біосинтез				
Кт, Км, Кх 6.1 Виробничий біосинтез	Швидкість перемішування, температура, pH, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, концентрація фенілаланіну	Термометр технічний, годинник, датчик pH, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та визначення рівня біомаси проводять кожні 4-6 годин, концентрація фенілаланіну визначається після закінчення процесу культивування	t = 37 °C, τ = 48 год, pH =7,0, n =220 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти, X=8 г/л, X фенілаланіну =61,3 г/л

8.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль чистоти культури проводиться методами прямого висіву інокуляту на чашки Петрі з агаризованими поживними середовищами та методом мікроскопії посівного матеріалу [45].

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром для виявлення бактерій, та сусло–агаром для виявлення грибів та дріжджів. Посів здійснюється методом виснажувального штриха. Чашки поміщають у термостат за температури 37 °С. Через 2-3 доби інкубування необхідно провести мікроскопію зразків.

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопа з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі. Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла. Після роботи ватною, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива [46].

Для фарбування за Грамом на попередньо приготований мазок наносять достатню кількість розчину карболового генціанвіолету, витримують 1–2 хв, барвник зливають і, не змиваючи водою, обробляють мазок розчином Люголя до почорніння (приблизно 1–2 хв). Зливають розчин Люголя і обробляють препарат упродовж 1 хв 96° етанолом (або зануренням у стаканчик зі спиртом, або нанесенням спирту на мазок). Відразу після обробки спиртом препарат промивають водою і забарвлюють його упродовж 1–2 хв водним фуксином. Зливають барвник, препарат промивають водою, висушують фільтрувальним папером. Мікроскопують препарат з імерсійною системою [32].

За умов відсутності у зразку сторонньої мікробіоти, під час мікроскопіювання можна побачити *E.coli* Х11р21. Форма клітини

паличкоподібна з заокругленим краєм, розміри: довжина - 1—3 мкм; ширина - 0,4—0,8 мкм. Клітини продуцента грамнегативні, отже після забарвлення фуксином колір бактерій зміниться на червонуватий (Рис 5.1. а) [14].

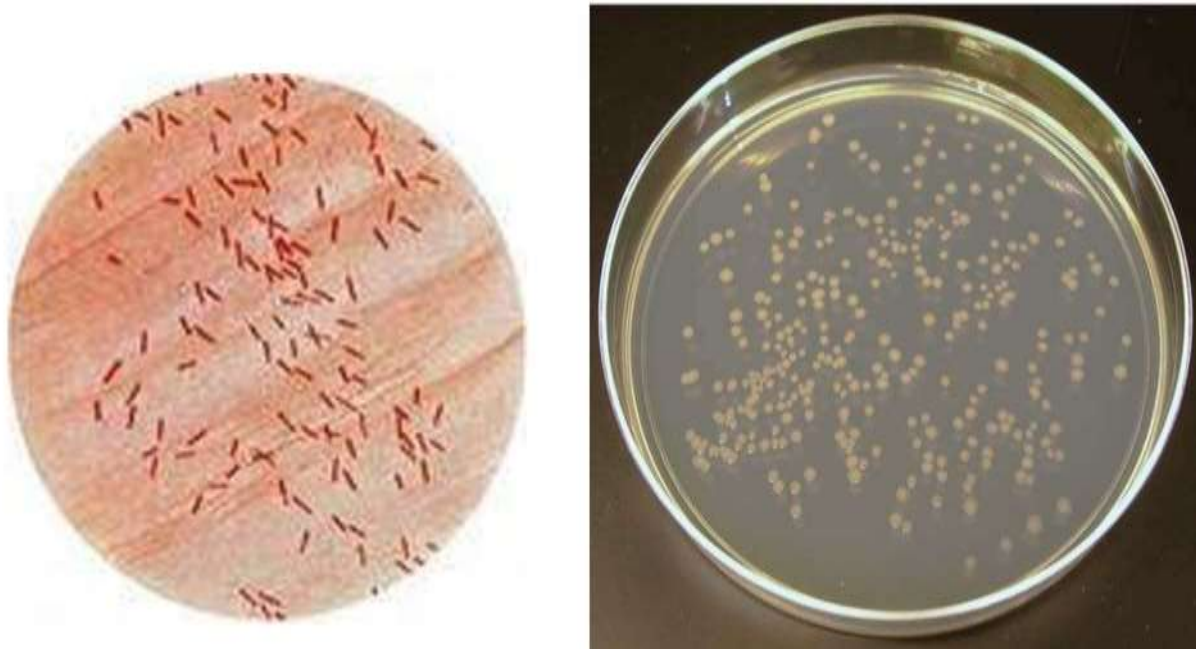


Рис 8.1. – Культура *E.coli*. (а – клітини *E.coli*. під мікроскопом (x90); б – колонії *E.coli* на агаризованому середовищі)

8.3. Показники росту і синтезу

8.3.1. Концентрація біомаси

Визначення концентрації біомаси проводиться фотоелектроколориметричним методом.

Пробу культуральної рідини відбирають з ферментера. Далі за допомогою апарату ФЕК визначають оптичну густина зразка.

За результатами контролю складається калібрувальний графік.

8.3.2. Концентрація фенілаланіну

Кінцева концентрація фенілаланіну у культуральній рідині визначається методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії [3].

Суть методу полягає у різному розподілі речовин у динамічних умовах між рухомою і нерухою фазами, де в якості нерухої фази використовується гідрофобний продукт.

Підготовка проби для аналізу

Для підготовки зразка поживного середовища, необхідно провести центрифугування попередньо відібраної проби культуральної рідини, з метою осадження клітин продуцента (режим центрифугування – 3000 об/ 15 хв) та відібрати надосадову речовину.

Проведення аналізу

Концентрацію фенілаланіну пропонується визначати за допомогою колонок Zorbax Eclipse-AAA на системі Agilent 1100 ВЕРХ зі спектрофотометричним УФ-детектором.

Фенілаланін відокремлюється за допомогою мобільної фази А (40 мМ Na_2HPO_4 , рН 7,8) та фази В (ацетонітрил : CH_3OH : H_2O = 45:45:10) градієнтним елююванням .

Умови проведення аналізу

Температура колонки - 30 ° С, швидкість потоку - 2 мл/хв. Один зразок аналізується протягом 30 хв.



Рис 8.2 – Високоєфективний рідинний хроматограф Aligent 1100

8.3.3. Концентрація джерел Карбону та Нітрогену

Визначення концентрації глюкози

Концентрація глюкози визначається глюкозооксидазним методом з наступним проведенням оптичного аналізу [47].

Метод ґрунтується здатності глюкози у присутності ферменту глюкозооксидази окислюватись до глюконової кислоти з утворенням перекису

водню, котрий у присутності ферменту пероксидази вступає в реакцію з фенолом і 4-амінофеназоном. Результатом реакції є утворення продукту червоно-фіолетового кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту глюкози у розчині [48].

Підготовка проби для аналізу

Для підготовки зразка поживного середовища, необхідно провести центрифугування попередньо відібраної проби культуральної рідини, з метою осадження клітин продуцента (режим центрифугування – 3000 об/ 15 хв) та відібрати надосадову речовину.

Підготовка глюкозооксидазного буферного розчину

Для створення глюкозооксидазного буферного розчину: розчинити 15 од/мл глюкозооксидази в 1 л буферного розчину фосфату калію 0,5 М при рН 7,2 (змішати 800 мл 0,5 М KH_2PO_4 з 200 мл 0,5 М K_2HPO_4).

Підготовка пероксидазного розчину

Для створення пероксидазного розчину: змішати 45 мМ фенолу з 7,5 мМ 4-амінофеназону, 42 од/мл ферменту пероксидази та 92 мМ NaN_3 .

Підготовка робочого розчину

Для створення робочого розчину, який буде використовуватись при визначенні концентрації глюкози необхідно змішати глюкозооксидазний буферний розчин з пероксидазним розчином у співвідношенні 1:5.

Змішати 100 мкл робочого розчину, 140 мкл дистильованої води та 3 мкл надосадової речовини.

Концентрація глюкози визначається фотоколориметричним методом. За допомогою апарата ФЕК порівнюють оптичну густину утвореного зразка з контрольними зразками, концентрація глюкози в яких уже відома. Результати наносять на калібрувальний графік для подальшого перерахунку [49].

Визначення концентрації сульфату амонію [50]

Концентрація амонію визначається колориметричним методом з додаванням реактиву Несслера.

Метод ґрунтується на здатності йонів амонію взаємодіяти з реактивом Несслера, в результаті чого утворюється сполука жовтого кольору.

Підготовка проби для аналізу

Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, переносять та центрифугують при 3000 об/хв протягом 15 хв, далі відбирається надосадова речовина.

Техніка визначення

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

8.4. Показники якості готового продукту

Визначення вологості кристалів

Вологість кристалів (%) визначається за допомогою апарата Чижової. Суть методу визначення полягає у висушуванні наважки досліджуваної речовини між двома нагрітими металевими плитами. Загальний час визначення не перевищує становить 40 хвилин.

Визначення чистоти кристалів

Визначення чистоти кристалів відбувається розчиненням наважки кристалів у фізіологічному розчині з наступним вимірюванням за допомогою методу ВЕРХ. Умови проведення досліді аналогічні до описаних у пункті 8.3.2.

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

Для автоматизації було обрано ділянку ультрафільтрації.

Під час процесу фільтрації, супернатант, утворений на стадії центрифугування, за допомогою перистальтичного насоса подаватиметься у збірник для нативного розчину, звідти, через насос і попереній фільтр до головного ультрафільтраційного модуля, звідти утворений пермат повторно подаватиметься у збірник для проведення наступної технологічної операції.

Тиск під час процесу фільтрації становитиме 0,6 МПа.

Підбір пор ультрафільтраційної установки залежить від молекулярної маси речовин, що концентруються. Оскільки головною задачею ультрафільтрації на даному етапі виробництва є необхідність відокремити високомолекулярні сполуки від цільового продукту, молекулярна маса якого складає 165 Да, пропонується обрати мембрану з відсіканням по молекулярній від 5 кДа. Діаметр пор такої мембрани становить 1,5 нм.

Продуктивність насоса становить підбирається залежно від кількості розчину, що підлягає фільтрації, в даному випадку, показник продуктивності повинен становити 400 л/хв.

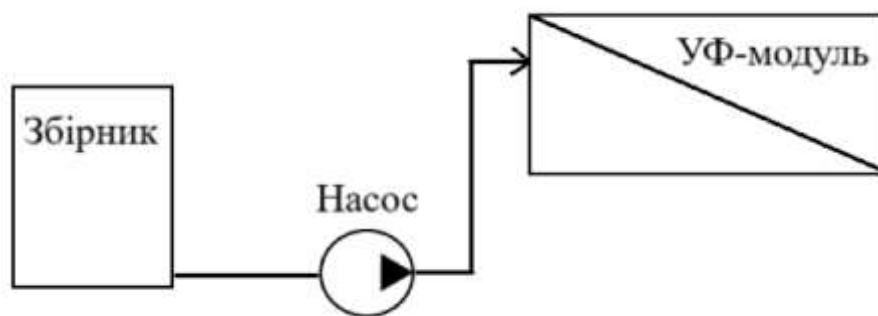


Рис. 9.1. Апаратно-технологічна схема ділянки ультрафільтрації

Отже, автоматизація ультрафільтраційної установки повинна забезпечувати:

НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Зведенюк О.О.			РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В.					92	1606
Консультант		Клименко О.М.				94		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

1. Контроль за рівнем рідини у збірнику для нативного розчину з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня;

2. Управління насосом перекачки рідини («включено», «відключено») із збірника в ультрафільтраційний модуль;

3. Контроль тиску в ультрафільтраційному модулі.

Таблиця 9.1

№	Апарат	Параметр	Значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю та управління	Засіб управління та контролю, реалізації
1	Збірник нативного розчину	Рівень	80±3 %	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
2	Насос	Стан насосу подачі: зі збірника в УФ-модуль	Увімкнено /вимкнено	Управління	Ручне/дистанційне	Пуск/зупинка з АРМ оператора
3	Ультрафільтраційний модуль	Тиск	0,6 МПа±0,1 МПа	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора

У відповідності із завданням, сформованим у таблиці 2.1, опишемо схему автоматизації.

У *першому контурі* автоматичного контролю, у збірнику для нативного розчину необхідно контролювати рівень рідини який має становити 80% .

Спершу супернатант, а у подальшому пермат, що надходять до збірника будуть контролюватись за допомогою датчика рівня LE 1а.

У *другому контурі* необхідно контролювати ввімкнення та увімкнення насоса. За змінами спостерігає оператор - технолог на АРМі. Зміни зберігаються в архів.

Для управління передбачені конпки “Пуск/Стоп”.

Загалом схемою передбачено:

- Управління з АРМа включенням/відключенням насосів;

- Ручне управління з щита перетворювача включенням/відключенням насосів;
- Аварійне відключення насосів кнопкою, роташовано. “по місцю”, біля насоса.

Для забезпечення безаварійної роботи насосів необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» з щита управління SB2, та безпосередньо біля насосів («по місцю») SB1.

Для вибору місця з якого саме буде здійснюватись управління використовується тумблер SA1 (перемикач). Подача напруги на двигуни насосів здійснюється за допомогою магнітних пускатів KM1.

У *третьому контурі* автоматичного контролю контролюється тиск в ультрафільтраційному модулі. Тиск контролюється за допомогою датчика тиску PT 2a.

Таблиця 9.2

№	№ позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
1	2	3	4	5
1	1a	Ємнісний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура +1250С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вхід, точність 2мм	NMC	Kobold.
2	KM1	Магнітний пускач, робочий струм 400А, потужність двигуна 200кВт, управляючий сигнал 220В	3RT1075-6AP36	SIEMENS
3	SA1	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210-2DA11	SIEMENS
4	SB1	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ	8LP2T B7113	Lovato
5	2a	Диференційний перетворювач тиску, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, під'єднання 1/2NPT, клас точності 0,075	PAD	Kobold

Схема автоматизації наведена у додатку 2.

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

Процес одержання фенілаланіну продуцентом *Escherichia coli* Х11р3, є багатостадійним і передбачає проведення наступних робіт:

- Підготовка стерильного аераційного повітря;
- Приготування та стерилізація допоміжних розчинів;
- Приготування та стерилізація запасних розчинів;
- Приготування та стерилізація поживних середовищ;
- Підготовка посівного матеріалу;
- Виробничий біосинтез.
- Центрифугування;
- Фільтрація;
- Сорбція;
- Десорбція;
- Повторна сорбція;
- Повторна десорбція;
- Кристалізація;
- Сушіння кристалів;

Приготування та стерилізація допоміжних розчинів.

Підготовка 6%-вих розчинів соляної кислоти та гідроксиду натрію.

Цей етап передбачає підготовку та стерилізацію розчинів титрувальних агентів для підкислення та наступного підлучення поживних середовищ при їх стерилізації у апаратах об'ємами 100 л та 1 м³. За умов дотримання правил приготування, стерилізації та зберігання, рідкі відходи, на даному етапі виробництва, не утворюватимуться.

					НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Зведенюк О.О.			РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Ключка Л.В.					96	1606
Реценз.						98		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

Підготовка розчину гідроксиду амонію. Розчин гідроксиду амонію необхідний для підтримання рівня рН=7,0 у процесі виробничого біосинтезу фенілаланіну. Не потребує стерилізації. На даному етапі виробництва, рідкі відходи можуть утворюватись лише за умов недотримання персоналом правил зберігання розчину.

Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози. Для синтезу цільового продукту продуценту необхідна велика кількість глюкози (154 г/л), враховуючи початкову концентрацію джерела вуглецю (60 г/л) та об'єм поживного середовища (5,36 м³), об'єм підживлювального розчину становитиме 1,65 м³. Для його створення потрібно 990 кг глюкози. Отже, тверді відходи, на даному етапі виробництва, можуть бути представлені пакувальними матеріалами.

Приготування та стерилізація запасних розчинів. Запасний розчин сульфату феруму та тіаміну вноситься у поживне середовище при вирощуванні інокуляту у колбах на качалках та у посівному апараті об'ємом 10 л. За умов дотримання правил приготування, стерилізації та зберігання, рідкі відходи, на даному етапі виробництва, не утворюватимуться.

Приготування та стерилізація поживних середовищ. За умов відповідності сировини всім встановленим нормам, рідкі відходи на даному етапі виробництва не утворюватимуться. Тверді відходи можуть бути представлені пакувальними матеріалами.

Підготовка посівного матеріалу. Культивування продуцента *E. coli* X11p3 відбувається з постійною аерацією (2 л/л/хв.). Як наслідок, виникає великий об'єм відпрацьованого повітря.

Виробничий біосинтез. Біосинтез цільового продукту продуцентом *E. coli* X11p3 відбувається з постійною аерацією (2 л/л/хв.). Як наслідок, виникає великий об'єм відпрацьованого повітря.

Центрифугування. В результаті центрифугування відділяється біомаса продуцента. Отже, на даному етапі виробництва утворюються тверді відходи.

Фільтрація. Цей процес відбувається в УФ-установці. По закінченню процесу утворюється пермат. Отже, на даному етапі утворюються рідкі відходи.

Сорбція. На цьому етапі, попередньо отриманий супернатант пропускається через апарат, метою осадження фенілаланіну на фільтрі з активованого вугілля. Отже, на даному етапі виробництва утворюються тверді відходи.

Десорбція. Десорбція фенілаланіну відбувається розчином етилацетату. На даному етапі виробництва відходи не утворюються.

Повторна сорбція. Даний процес проходить з використанням гранул сильнокислого катіоніта, отже є місцем утворення твердих відходів.

Повторна десорбція. Повторна десорбція фенілаланіну відбувається розчином гідроксиду амонію. На даному етапі виробництва відходи не утворюються.

Кристалізація. Даний процес проходить у вакуум-випарному апараті з випаюванням розчинника, отже є місцем утворення газоподібних відходів.

Сушіння кристалів. Процес висушування супроводжується виділенням вологи , а також газу, що містить механічні частки сухих кристалів фенілаланіну .

Отже, даний етап виробництва можна виділити як місце утворення газоподібних відходів.

Узагальнені дані наведено нижче у вигляді *Табл. 10.1.*

Таблиця 10.1.

Етап виробництва	Тип відходів	Склад відходів	Клас небезпеки
Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози	Тверді	PP-поліпропілен HDPE-поліетилен високої щільності	4
Приготування та стерилізація поживних середовищ	Тверді	PP-поліпропілен HDPE-поліетилен високої щільності	4
Підготовка	Газоподібні	CO ₂ , пил	4

посівного матеріалу			
Виробничий біосинтез	Газоподібні	CO ₂ , пил	4
Центрифугування	Тверді	Біомаса продуцента <i>E. coli</i> X11p3	4
Фільтрація	Рідкі	Пермат	4
Сорбція	Тверді	Активоване вугілля	4
Десорбція	-	-	-
Повторна сорбція	Тверді	Катіоніт	4
Повторна десорбція	-	-	-
Кристалізація	Газоподібні	Пари аміаку	4
Сушіння кристалів	Газоподібні	Пил	4

10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження газоповітряних викидів. В якості методу переробки газоподібних відходів підприємства можна виділити біореактори з шаром, що омивається.

Продуктивність таких реакторів може сягати декількох тисяч кубометрів на годину.

Робочим тілом такої біосистеми є іммобілізовані мікроорганізми. Шар омивається водою, що містить необхідні для розвитку клітин мінеральні речовини. При проходженні через нього повітря, забрудники дифундують у водну плівку і окислюються мікроорганізмами.

Стаціонарний режим роботи біореактора з омиваним шаром після його запуску настає через 5-10 днів. При використанні заздалегідь адаптованих до забрудників мікроорганізмів, цей термін може бути скорочений до декількох годин.

Періодично, зазвичай раз в декілька місяців, шар іммобілізованих клітин очищають від надлишку біомаси і наповнюють свіжими гранулами [51].

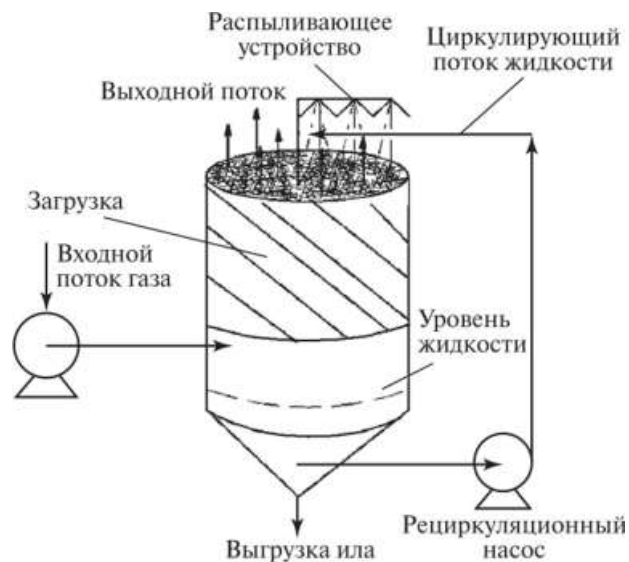


Рис. 10.1. - Біореактор з шаром, що омивається

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів. Для утилізації твердих відходів, представлених поліпропіленом та поліетиленом високої щільності можна використати для виробництва того самого продукту.

Процес переробки твердих відходів включає наступні стадії: подрібнення, відділення домішок, гранулювання. Утворені гранули можна використати при виробництві тари, відер, пакетів, плівки, труб [52].

10.2.3. Система знешкодження та утилізації рідких відходів. Для знешкодження стічних вод, на підприємстві доцільно впровадити багатостадійну систему очистки активним мулом, що складається системи невеликих ставків, в котрих йде змішування стічних вод з мулом, що утворився при попередньому окисленні стічних вод. В активному мулі багато мікроорганізмів, які завершують знешкодження ставків [53].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Державний реєстр лікарських засобів України. Лікарський засіб «Аміносол НЕО 10%». [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlz1?opendocument&stypе=ACC1CE40EFD91CC22586BF0034FEC9>
2. О. І. Залюбовська, Г. П. Фоміна, В. В. Зленко, М. Є. Березнякова, О. М. Литвинова, Л. В. Деримедвідь, М. В. Савіна, Л. В. Карабут, Ю. Н. Авідзба, О. М. Яворська. Лабораторні дослідження в педіатрії: навч. посіб. для студ. мед. та фармацев. вищ. навч. закладів. 2010. 273 с.
3. Jie Wu, Yongfei Liu, Sheng Zhao, Jibin Sun, Zhaoxia Jin, Dawei Zhang. Application of Dynamic Regulation to Increase L-Phenylalanine Production in *Escherichia coli*. *J Microbiol. Biotechnol.* 2019, 29 (6): 923–932. doi: [10.4014/jmb.1901.01058](https://doi.org/10.4014/jmb.1901.01058).
4. Pat. 4,584,399 USA. Portal C, James F. Walter. Purification of l-phenylalanine. 1986.
5. Александрова К.В. «Будова та властивості простих і складних білків» Навчально-методичний посібник для студентів фармацевтичного факультету спеціальностей 7.12020101 - «фармація» та 7.12020104 - «технології парфумернокосметичних засобів». 2016, К.: ЗДМУ. 129 с.
6. Пенчук Ю.М., Васильківська М.К. Сучасний стан та перспективи біотехнологічних методів виробництва амінокислот. *Ukr. food J.* 2012, 2: 51 – 54.
7. Murray Moo Young. *Comprehensive Biotechnology 3rd Edition* . 2019. 4870 p.
8. Liu SP, et al. A systems level engineered *E. coli* capable of efficiently producing Lphenylalanine. *Process Biochem.* 2014. doi:10.1016/j.procbio.2014.01.001.
9. Мор'єва О.В. Перспективні бактеріальні продуценти фенілаланіну. *Ветеринарні та біологічні науки.* 2015: 155-156.
10. Zhou H, Liao X, Liu L, Wang T, Chen J, Du G. Enhanced L-phenylalanine

production by recombinant *Escherichia coli* BR-42 (pAP-B03) resistant to bacteriophage BP-1 via a two-stage feeding approach. *J Microbiol. Biotechnol.* 2011, 38 (9): 1219-1227. doi: 10.1007/s10295-010-0900-9.

11. Yongfei Liu, Yiran Xu, Dongqin Ding, Jianping Wen, Beiwei Zhu, Dawei Zhang. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production. *BMC Biotechnology.* 2018, 18 (5). doi:10.1186/s12896-018-0418-1.

12. Великжанина Г.А., Ямпольская Т.А., Жданова Н.И., Бачина Т.А., Васильева Н.А., Соколов А.К. Патент SU № 1693056 А1. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* – продуцент L-фенилаланина . Опубл. 23.11.91, Бюл. № 43.

13. Kubitschek H.E. Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media // *Journal of Bacteriology : journal.* — 1990. — 1 January (vol. 172, no. 1). — P. 94—101. — PMID 2403552.

14. Ф. К. Черкес. Микробиология - М.: Медицина, 1986. - 512 с., ил.

15. Колисодержащие пробиотики ОФС.1.7.1.0005.15

16. Fotadar U., Zaveloff P., Terracio L. Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures // *Journal of Basic Microbiology.* — 2005. — Vol. 45, no. 5. — P. 403—404. —

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

18. Степанов Ю.М., Скирда І.Ю., Петішко О.П. Хронічні запальні захворювання кишечника: особливості епідеміології в Україні // *Епідеміологія хвороб органів травлення.* 2017, 2(51): 97-105. DOI: 10.22141/2308-2097.51.2.2017.101703

19. Біляєва О.О., Шуба Н.М. Хвороба کرونا. Адаптована клінічна настанова, заснована на доказах. 2015. – 253 с.

20. Підгірний Я.М. , Підгірний Б.Я. Пріоритетні напрямки лікування хворих на гострий панкреатит // *Медицина неотложных состояний.* 2018, 3(90): 44-49. DOI: 10.22141/2224-0586.3.90.2018.129485

21. Міщенко Д.Л., Шлапак І.П., Титаренко Н.В. Інфузійна терапія як обов'язковий компонент в комплексній терапії хворих на гострий панкреатит // Український хіміотерапевтичний журнал. 2008, 2(22): 65-66.
22. Комітет з питань здоров'я нації, медичної допомоги та медичного страхування. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://komzdrav.rada.gov.ua/news/main_news/72913.html
23. Державна служба статистики України. Населення України. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.ukrstat.gov.ua/>
24. С.О. Дубров, О.Ю. Сорокіна, К.А. Дуброва, Г.Б. Славута. Актуальність проблеми сепсису в світі та Україні // Гострі та невідкладні стани в практиці лікаря. 2017, 4(67): 32-35.
25. Калушка О. Б., Соколовська А. В., Грошовий Т. А. Дослідження інфузійних розчинів на українському фармацевтичному ринку // Фарм. часопис. 2015, (4): 46-51. DOI 10.11603/2312-0967.2015.4.5556
26. Державний реєстр лікарських засобів України. Пошук за діючою речовиною «Фенілаланін» [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.drlez.com.ua/>
27. «MedBrowse». Кабівен Центральний. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://medbrowse.com.ua/kabiven-cena/ukraina>
28. «MedBrowse». Аміностерил Н-ГЕПА. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://medbrowse.com.ua/aminosteril-n-gepa-cena/ukraina>
29. «Компендіум». ІНФЕЗОЛ. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/260516/>
30. «MedBrowse». Нумета G16E. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://medbrowse.com.ua/numeta-g16e-cena/ukraina>
31. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Escherichia coli K-12 MG 1655 pathway. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?eco01100
32. Пирог Т.П., Антонюк М.М. Загальна мікробіологія і вірусологія:

лабораторний практикум для студ. освітнього ступеня «Бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навч. 2016. К.: НУХТ. 110 с.

33. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.

34. Arunkumar A, Etzel MR. Negatively charged tangential flow ultrafiltration membranes for protein concentration. *J Membr Sci.* 2015(475): 340–348. Doi: 10.1016/j.memsci.2014.10.049.

35. Лазарев ВА, Тихонов СЛ, Тихонова НВ. Концентрирование аминокислот творожной сыворотки на керамических мембранах. *Пищевые биотехнологии.* 2017, 5(3): 39–44. DOI: 10.14529/food170305.

36. John A. Duerre, Edgar Ribi. Enzymes released from *Escherichia coli* with the aid of a servall cell fractionator. *Appl Microbiol.* 1963; 11(6): 467–471. PMID: [14075044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14075044/)

37. Sartorius. Laboratory Ultrafiltration: Frequently Asked Questions. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.sartorius.com/download/449148/5/laboratory-ultrafiltration-faq-2020-1-13-20-pdf-data.pdf>

38. Vieira GS, Moreira FKV, Matsumoto RLS, Michelon M, Filho FM, Hubinger M D. Influence of nanofiltration membrane features on enrichment of jussara ethanolic extract (*Euterpe edulis*) in anthocyanins. *J Food Engeneering.* 2018(226): 31-41.

39. Belhamdi B, Merzougui Z, Trari M, Addoun A. A kinetic, equilibrium and thermodynamic study of l-phenylalanine adsorption using activated carbon based on agricultural waste (date stones). *JART* 2016. 14(5). <https://doi.org/10.22201/icat.16656423.2016.14.5.26>

40. Desotec. Filter Solutions. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.desotec.com/en/solutions/filter-solutions>

41. Shen Y, Chen B, van Beek TA. Alternative solvents can make preparative liquid chromatography greener. *Green Chem.* 2015(17):4073–4081.

42. LennTech. Rohm and Haas ion exchange resins. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.lennotech.com.tr/products/rohm-haas.htm>

43. Кристаллизационные аппараты. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.pro-vacuum.ru/vyparnye-i-kristallizatcionnye-apparaty/kristallizatcionnye-apparaty/vse-stranitcy.html>

44. Данилов III., Самойленко CI. Апарати мікробіологічної промисловості: Навч. посібник – Харків: НТУ «ХПІ», 2008. – 272 с.

45. Градова Н. Б., Бабусенко Е. С., Панфилов В. И. Биологическая безопасность биотехнологических производств : учебное пособие. 2010. М.: ДеЛи принт. 136 с.

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

47. Wang H, Wang F, Wang W, Yao X, Wei D, Cheng H, et al. Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLoS One* 2014, 9(11). doi: 10.1371/journal.pone.0112777.

48. Традиційні та біосенсорні методи визначення моно- і дисахаридів. В.М. Пешкова, О.Я. Саяпіна, О.О. Солдаткін, С.В. Дзядевич. *Біотехнологія*. 2010, 3(3): 9-22.

49. Measuring glucose concentration in *E.coli* growth media. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.researchgate.net/post/How_can_I_measure_glucose_concentration_consumption_in_ecoli_growth_media

50. «Инструкция по лабораторному контролю очисных сооружений на животноводческих комплексах» [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293845/4293845767.htm>

51. Юрченко В. А. Двухсекционный биореактор с омываемым слоем для биологической детоксикации метана и сопутствующих ему веществ (H₂S, SO₂

и NH₃) в газообразных выбросах из канализационных сетей г. Харькова и его эксплуатация / В. А. Юрченко, А. Ю. Бахарева // Вестник Нац. техн. ун-та "ХПИ" : сб. науч. тр. Темат. вып. : Новые решения в современных технологиях. – Харьков : НТУ "ХПИ". – 2012. – № 1. – С. 108-113.

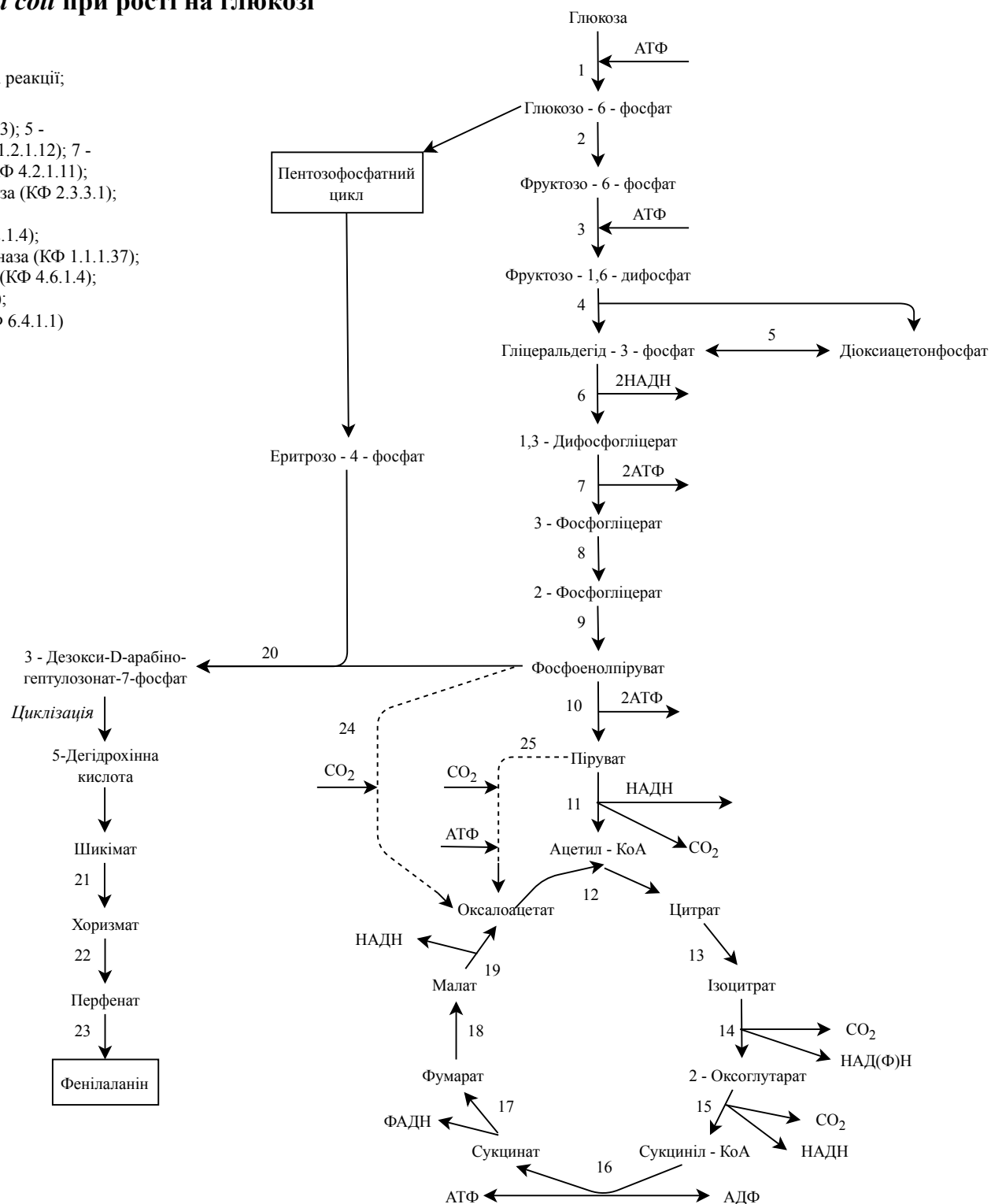
52. *Абашина К.О.* Конспект лекцій з навчальної дисципліни «Утилізація промислових відходів. Харків : ХНУМГ ім.О.М. Бекетова, 2016. – 58с.

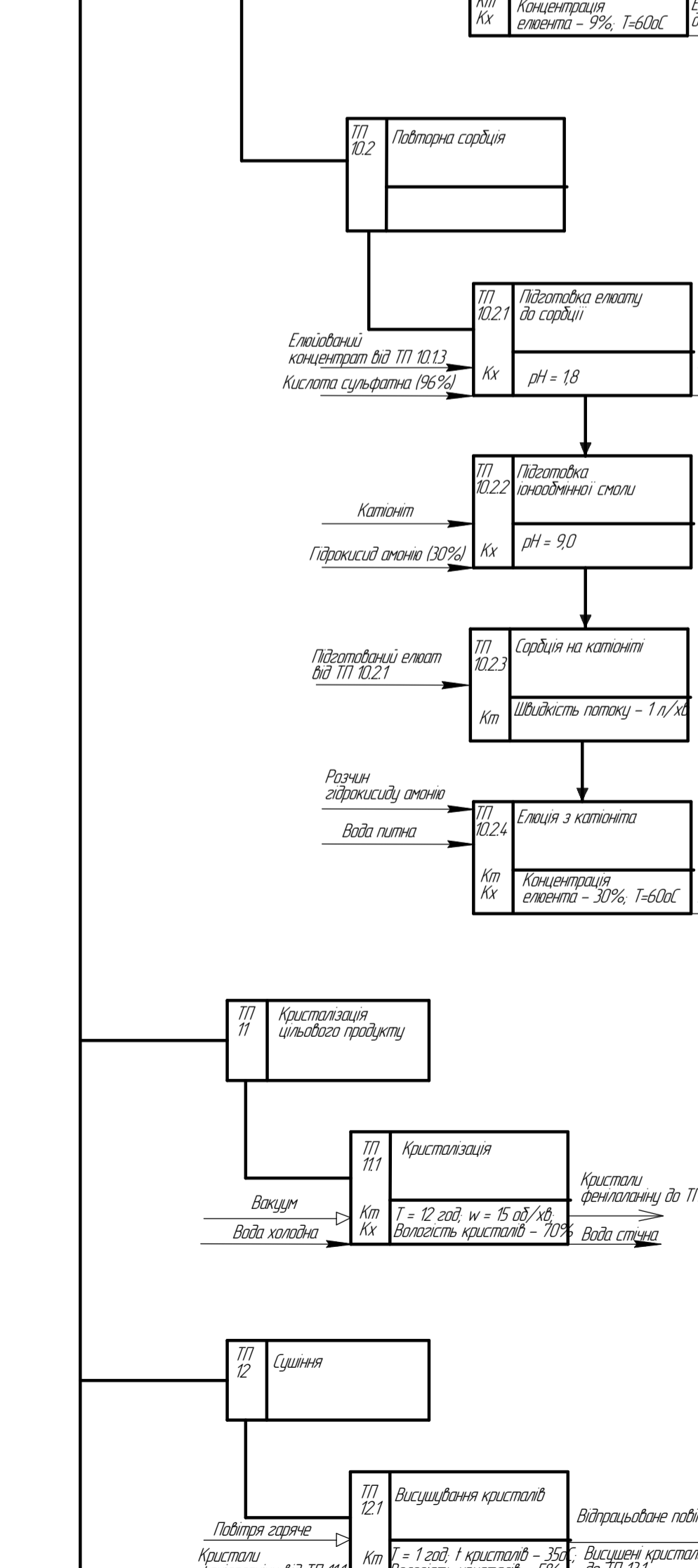
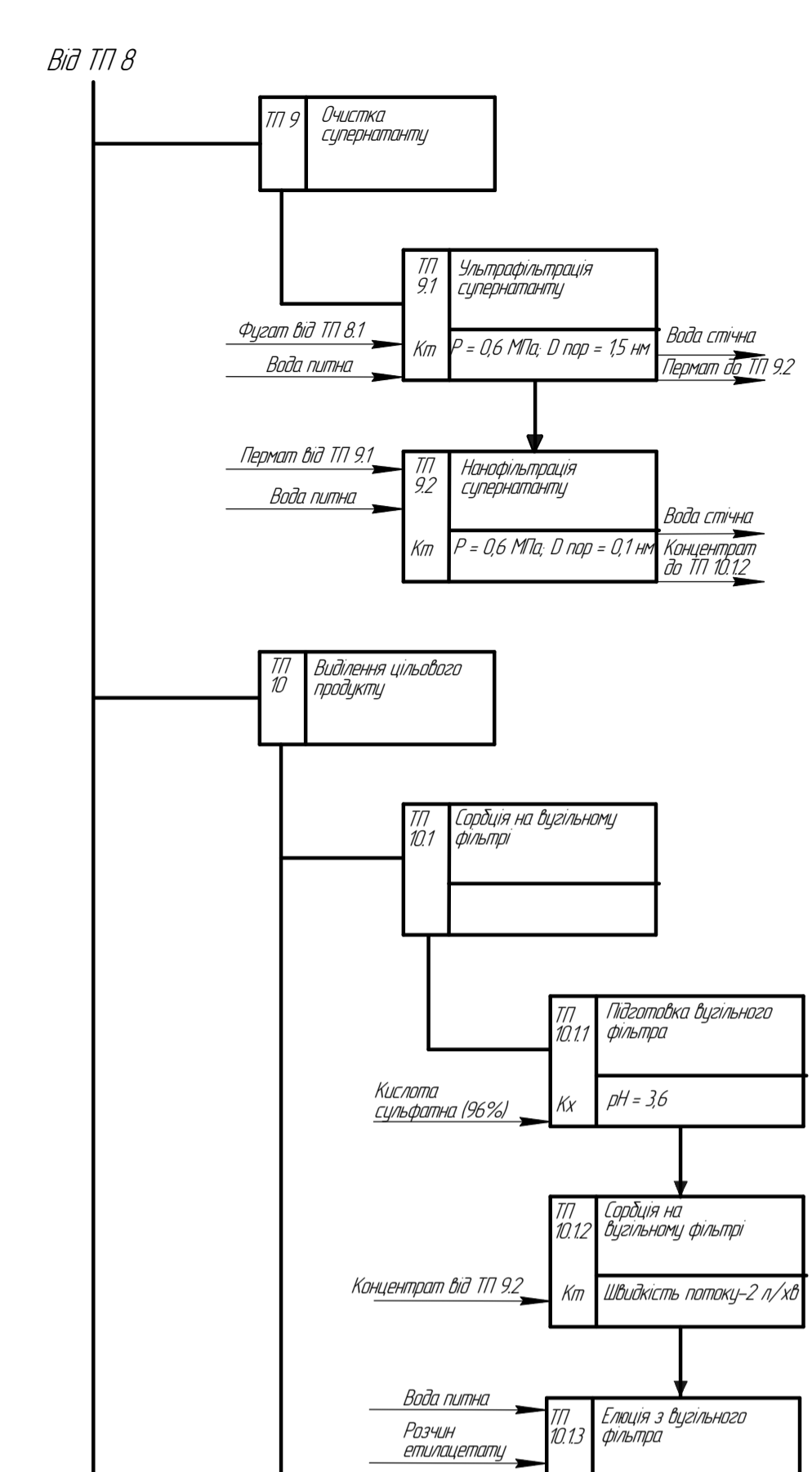
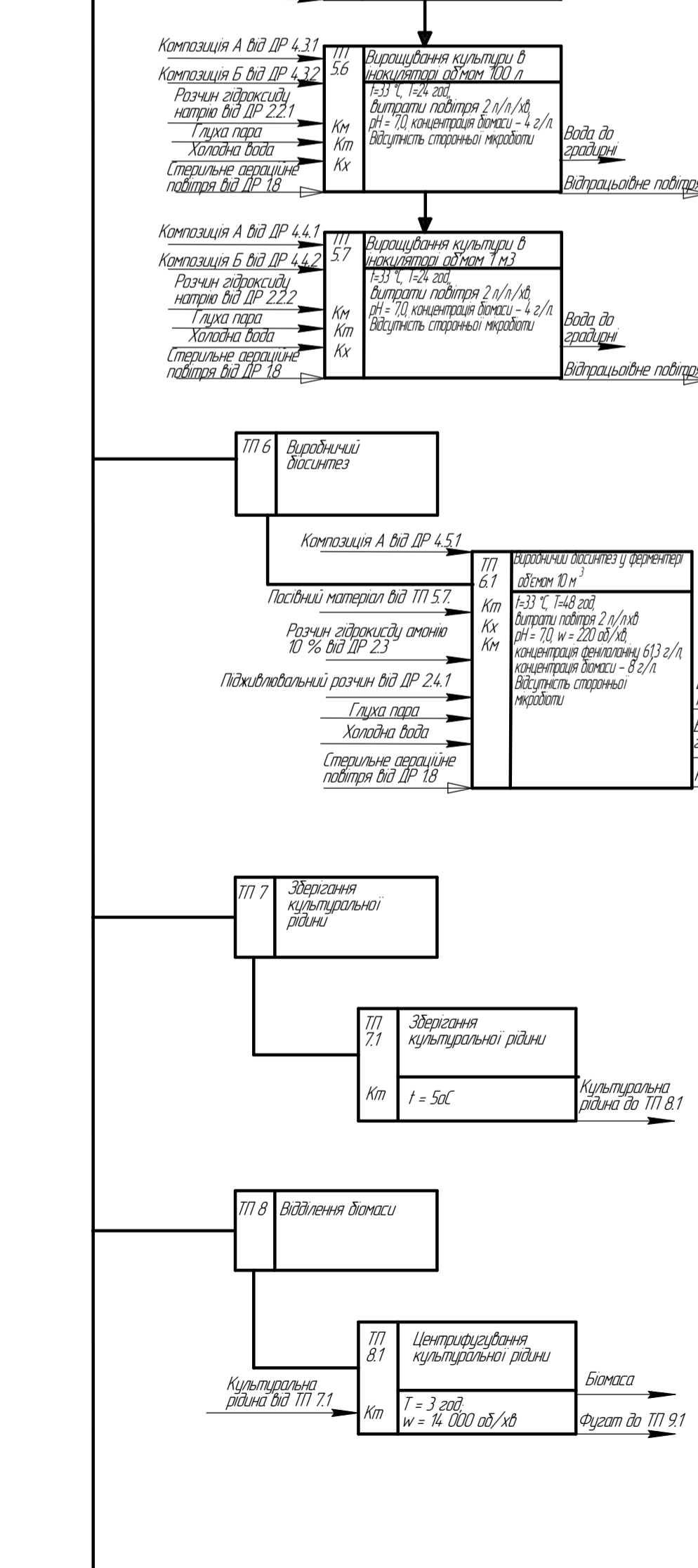
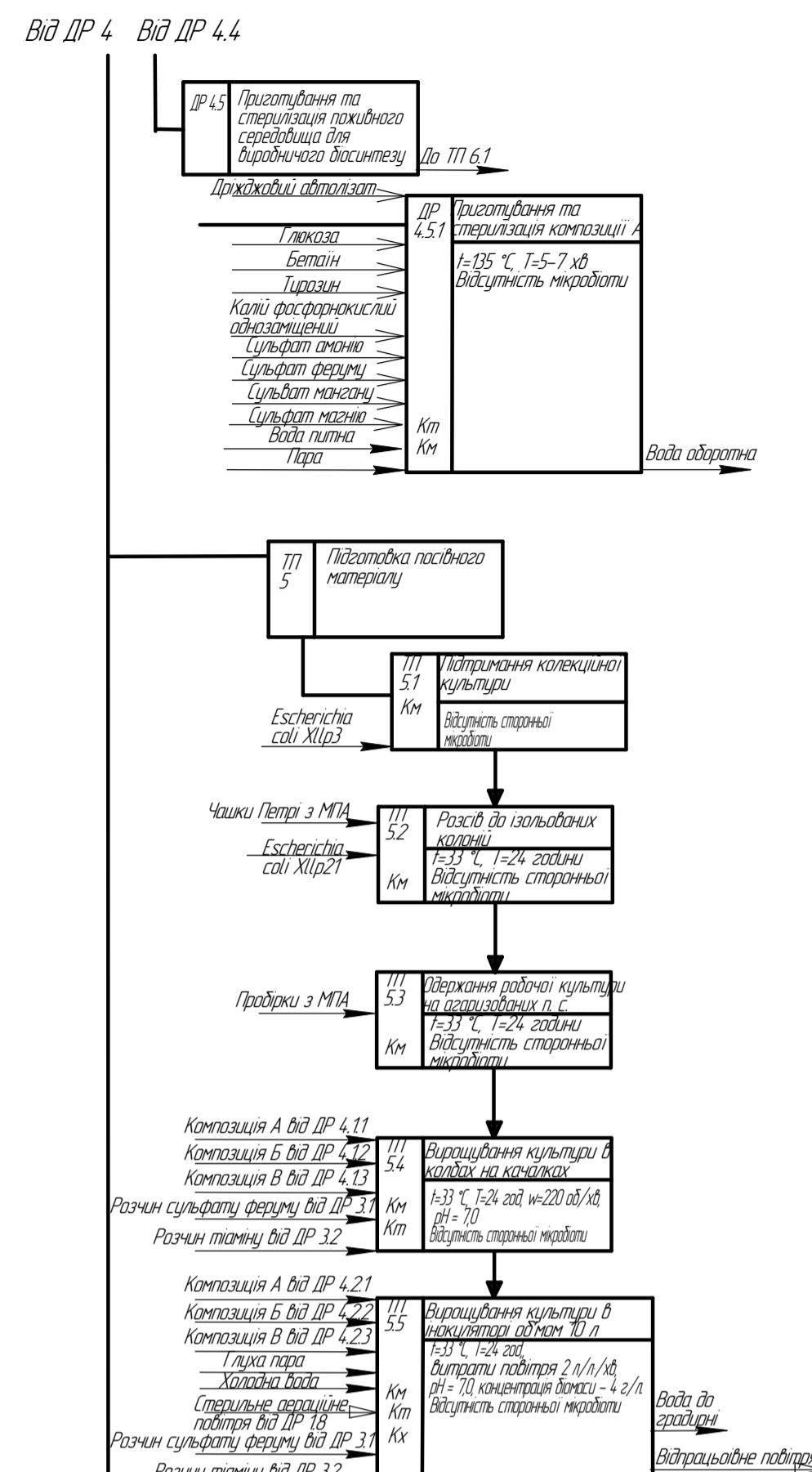
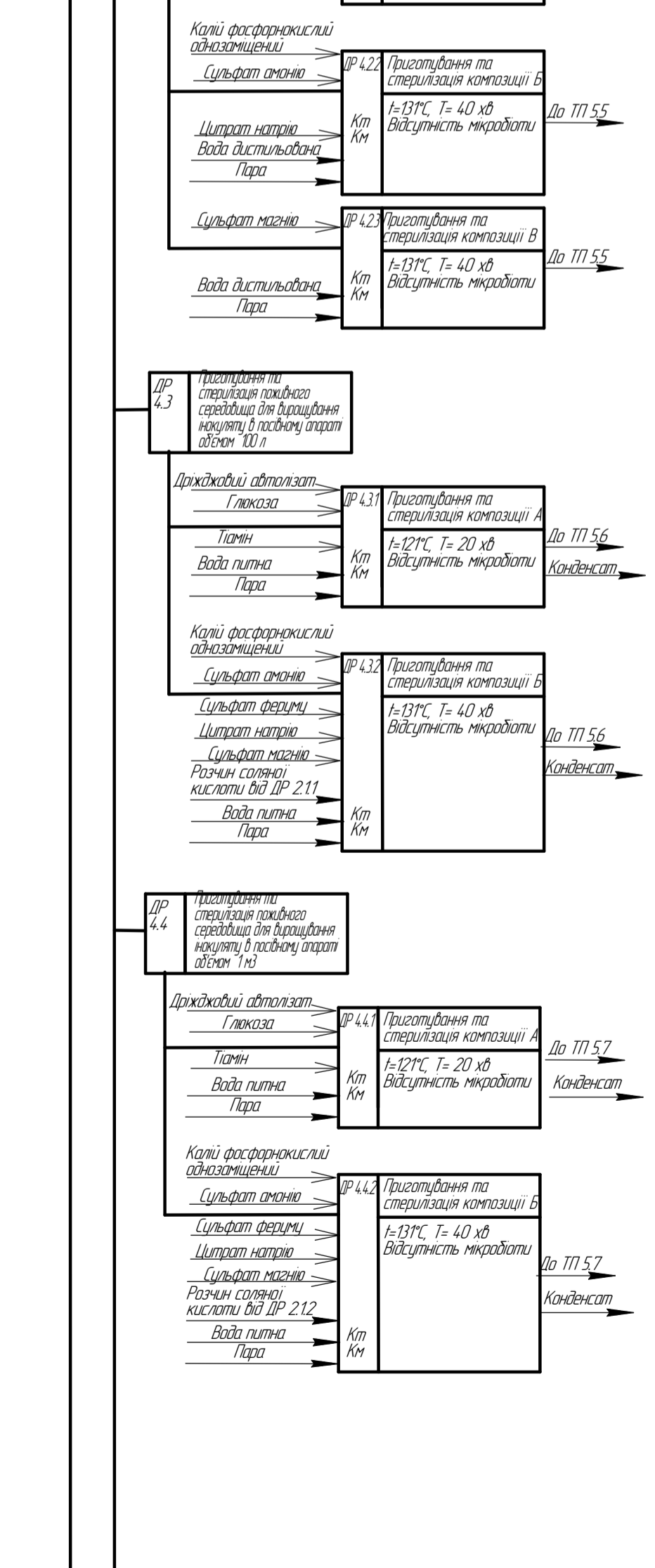
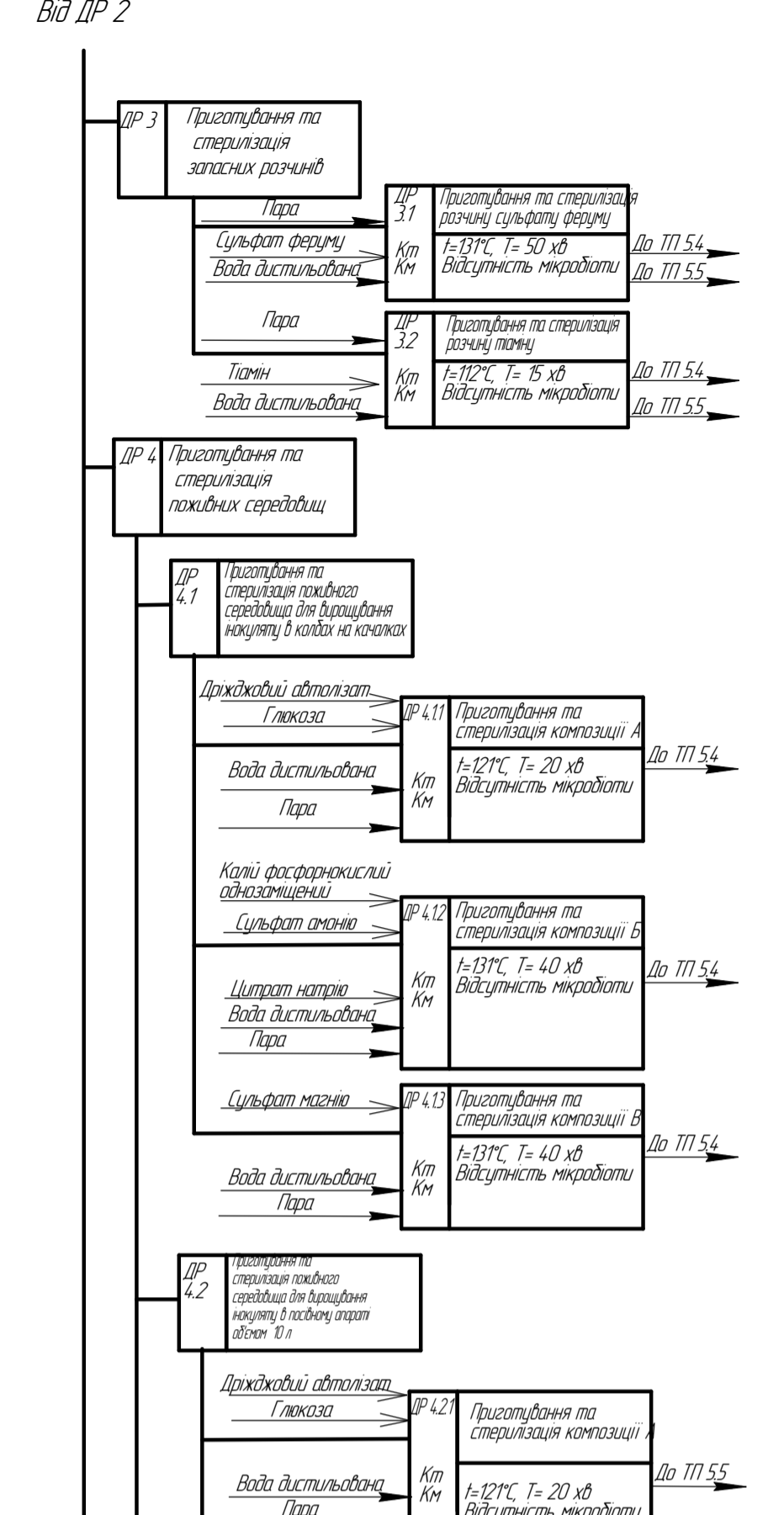
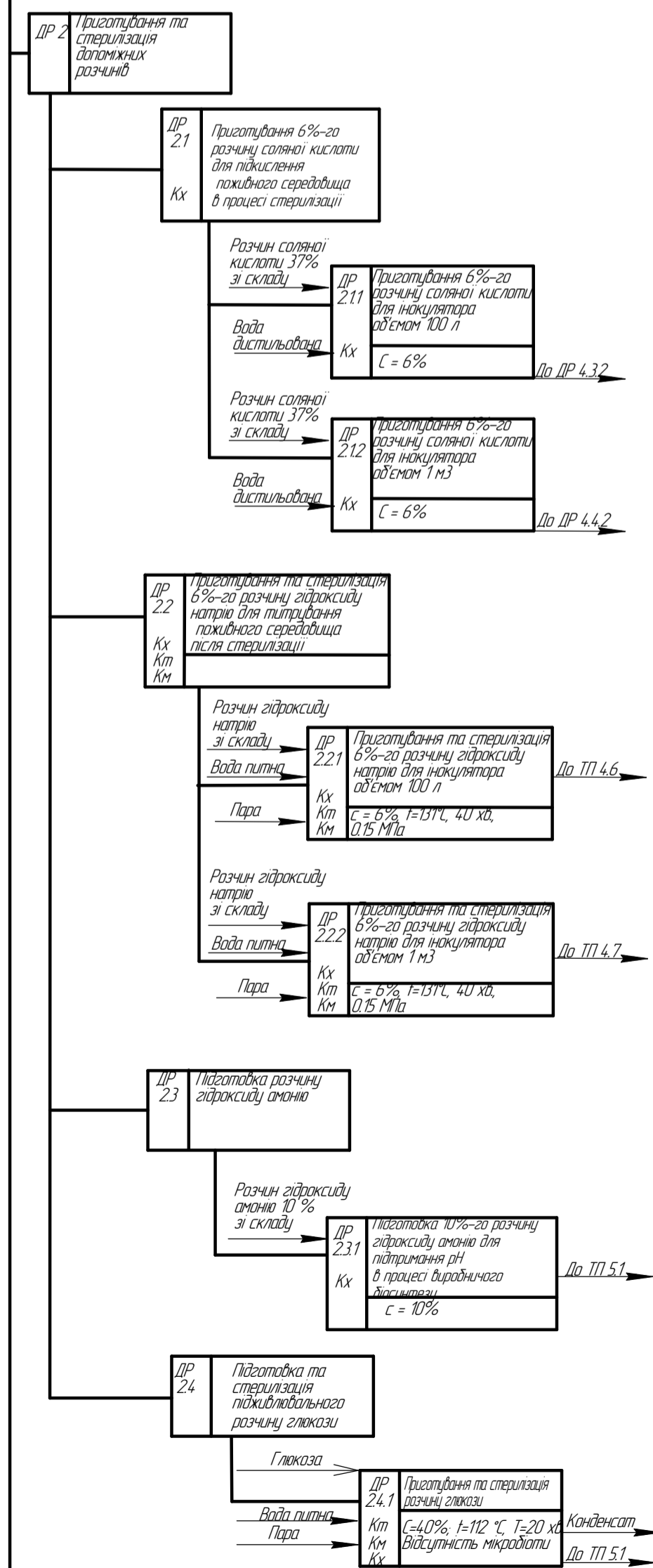
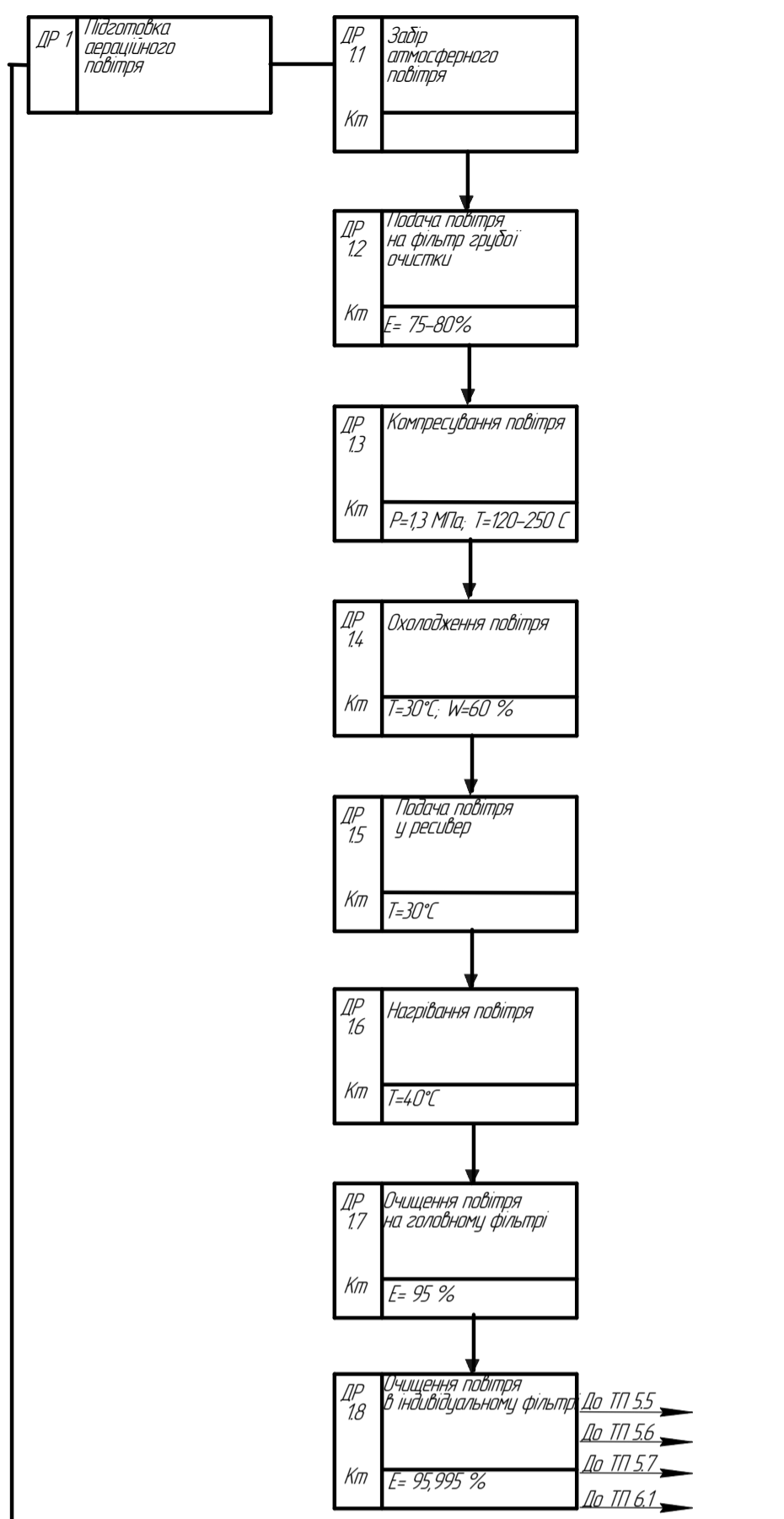
53. Hakkarainen M., Albertsson A. Long Term Properties of Polyolefins II *Advances in Polymer Science.* - Volume 169.-2004. - P. 177-200.

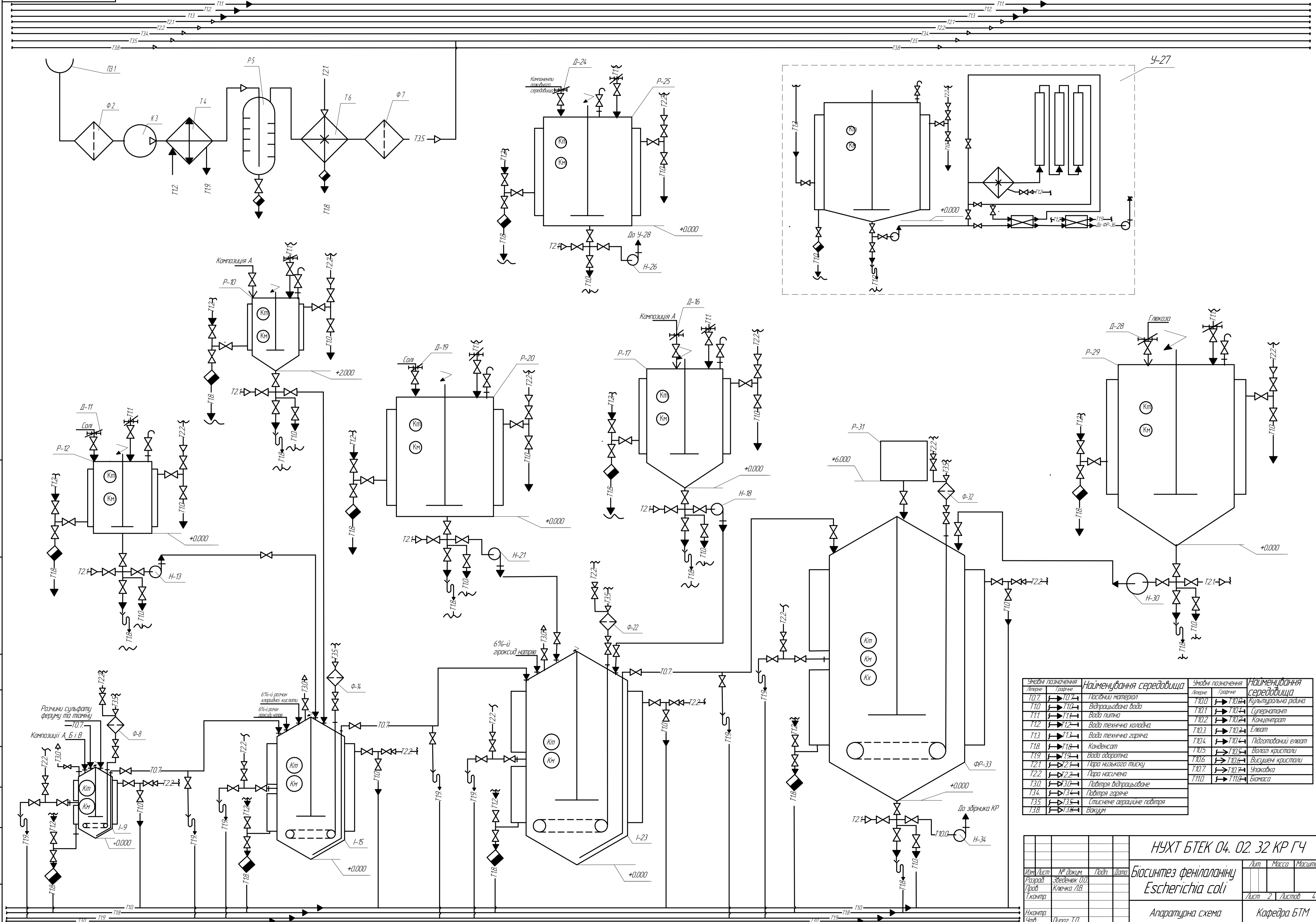
Схема біосинтезу фенілаланіну продуцентом *Escherichia coli* при рості на глюкозі

Умовні позначення: 1) \leftarrow основний шлях біосинтезу; 2) - - - - - анаплеротичні реакції;

- Перелік ферментів: 1 - гексокіназа (КФ 2.7.1); 2 - глюкозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 - фосфоглицераткіназа (КФ 2.7.1.11); 4 - фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 - триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 - фосфоглицераткіназа (КФ 2.7.2.3); фосоглицератмутаза (КФ 5.4.2.12); 9 - енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 11 - піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.4.1.); 12 - цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 13 - аконітаза (КФ 4.2.1.3); 14 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 15 - 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 1.2.4.2); 16 - сукцинаттіокіназа (КФ 6.2.1.4); 17 - сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 18 — фумараза (КФ 4.2.1.2); 19 — малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 20 - 3-дезоксисарабіногептулозо-7-фосфатсинтаза (КФ 2.5.1.54); 21- хоризматсинтаза (КФ 4.6.1.4); 22 - хоризматмутаза (КФ 5.4.99.5); 23 - префенатдегідратаза (КФ 1.3.1.13); 24 - фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31); 25- піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1)





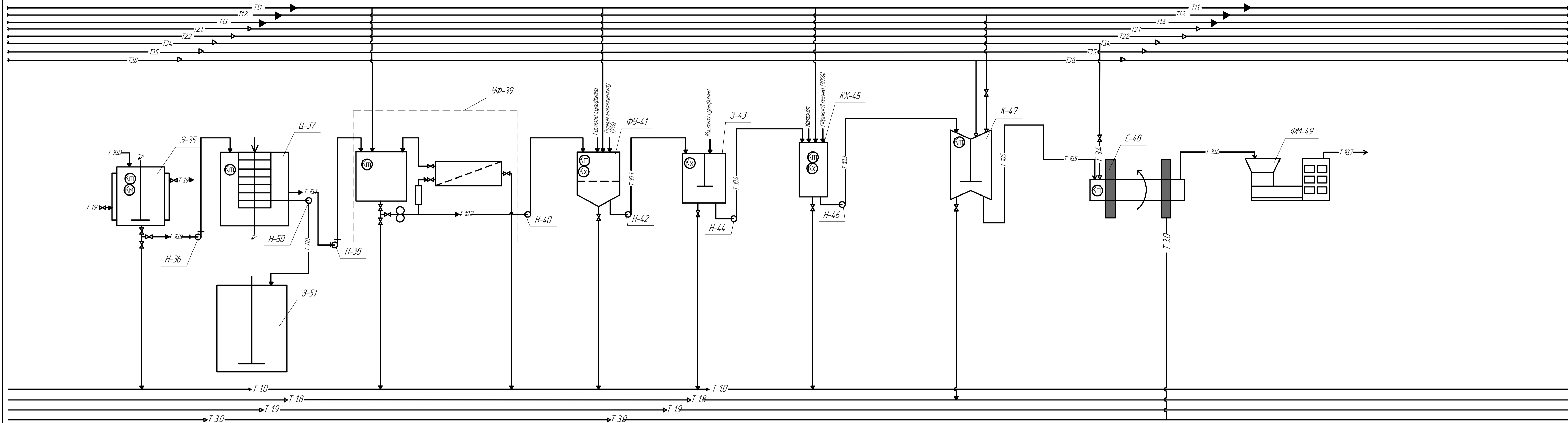


Умовні позначення	Найменування середовища	Умовні позначення	Найменування середовища
T0.7	Підігріваний матеріал	T10.0	Культуральна рідини
T10	Відрацьована вода	T10.1	Супернатант
T11	Вода питна	T10.2	Концентрат
T12	Вода технічна холодна	T10.3	Елюат
T13	Вода технічна гаряча	T10.4	Підготований елюат
T18	Конденсат	T10.5	Вологі кристали
T19	Вода одарована	T10.6	Висушені кристали
T21	Пара низького тиску	T10.7	Улагодка
T22	Пара насичена	T11.0	Біомаса
T3.0	Підігрів відрацьоване		
T3.4	Підігрів гаряче		
T3.5	Стиснене аераційне повітря		
T3.8	Вакуум		

НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ГЧ
 Біосинтез феніланіну
Escherichia coli
 Апаратурна схема
 Кафедра БТМ

Лист 2 / Листів 4
 Формат А1

КМУ ДС-ЗД, 181 Часова версія © 2019, 000 "АКОРА-Система проектних робіт". Ресурси: Все права захищено.
 Не для комерційного використання



Умовні позначення		Найменування середовища	Умовні позначення		Найменування середовища
Литера	Температура		Литера	Температура	
T 0.7	→ T 0.7 →	Пастбище матеріал	T 10.0	→ T 10.0 →	Культуральна рідинка
T 1.0	→ T 1.0 →	Відпрацьована вода	T 10.1	→ T 10.1 →	Супернатант
T 1.1	→ T 1.1 →	Вода питна	T 10.2	→ T 10.2 →	Концентрат
T 1.2	→ T 1.2 →	Вода технічна холодна	T 10.3	→ T 10.3 →	Елюат
T 1.3	→ T 1.3 →	Вода технічна гаряча	T 10.4	→ T 10.4 →	Підготований елюат
T 1.8	→ T 1.8 →	Конденсат	T 10.5	→ T 10.5 →	Вологі кристали
T 1.9	→ T 1.9 →	Вода одаротна	T 10.6	→ T 10.6 →	Висушені кристали
T 2.1	→ T 2.1 →	Пара низького тиску	T 10.7	→ T 10.7 →	Упаковка
T 2.2	→ T 2.2 →	Пара насичена	T 11.0	→ T 11.0 →	Біомаса
T 3.0	→ T 3.0 →	Повітря відпрацьоване			
T 3.4	→ T 3.4 →	Повітря гаряче			
T 3.5	→ T 3.5 →	Стиснене аераційне повітря			
T 3.8	→ T 3.8 →	Вакуум			

Лист
Сторінка №

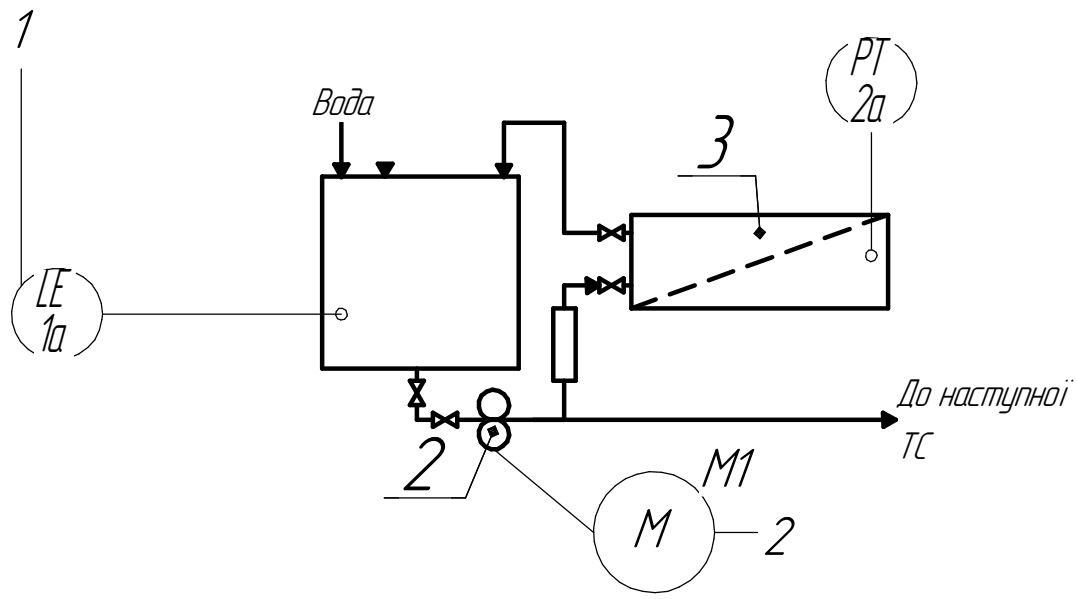
НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ГЧ
© 2019 ООО "АЛЮС-Систем приватизація". Ресурси: Все права захищено.
Лист № 3 / Листів 4
Не для комерційного використання

НУХТ БТЕК 04. 02. 32 КР ГЧ				Лист	Масштаб
Біосинтез фенілаланіну <i>Escherichia coli</i>				3	4
Апаратурна схема				Кафедра БТМ	
Ізм.	Лист	№ док.	Підп.	Дата	Формат
					A1
Розроб.	Зведений О.О.				
Проб.	Клочко Л.В.				
Т.контр.					
Н.контр.					
Утв.	Лирог Т.Л.				

НУХТ 04. 04. 32 КР ГЧ

Перв. примен.

Справ. №



КОУПАС-ЗД v1814 Україна версія © 2019 ООО "АКОН-Системы проектирования", Россия Все права защищены

Подп. и дата

Инв. № дробл.

Взам. инв. №

Подп. и дата

Инв. № подл.

1 80%±3
2 Управл.
3

Прилади	(LT)	(H)	(PT)
мігнєві Прилади	1a	SB1	2a
на щиті		(H) (FS) (NS)	
		SB2, SAT, KM1	
П/К	RA		
	RP		
	AR		
	LB		
	C		
	S		
	I		
ПК	R		
	C		
	S		

НУХТ 04. 04. 32 КР ГЧ

Изм./Лист	№ докум.	Подп.	Дата
Разраб.	Звєдєняк О.О.		
Проб.	Ключка Л.В.		
Т.контр.	Клименко О.М.		
Н.контр.			
Утв.	Пироз Т.П.		

Схема автоматизації ділянки ультрафільтрації

Схема автоматизації

Лист	Масса	Масштаб
		1:1
Лист	Листов	1
Кафедра БТМ		