МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
_____ Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)
«___» _____лютого_____ 2024 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____ Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)
«___» _____лютого_____ 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

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

на тему: «Культивування *Corynebacterium glutamicum* з метою одержання триптофану»

Виконала: здобувачка_5_ курсу, групи_1_

_____КОЛАКОВСЬКА Альона Володимирівна_____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ___СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна_____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

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

Рецензент _____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

«30» жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОЛАКОВСЬКОЇ Альони Володимирівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Corynebacterium glutamicum* з метою одержання триптофану»

керівник роботи СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна, *асистент.*

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «6» листопада 2023 року № 915-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 29.01.2024
3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Corynebacterium glutamicum;* цільовий продукт*: триптофан;* геометричний об'єм ферментера: *10 м^3;* коефіцієнт заповнення: *0,6*
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; контроль виробництва;

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу триптофану - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу триптофану - 1 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	*Характеристика цільового продукту*	*30.10.2023– 07.11.2023*	
2.	*Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента*	*08.11.2023-30.11.2023*	
3.	*Техніко-економічне обґрунтування*	*31.11.2023-04.12.2023*	
4.	*Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва*	*05.12.2023-11.12.2023*	
5.	*Специфікація обладнання*	*12.12.2023-25.12.2023*	
6.	*Опис технологічної схеми*	*26.12.2023-31.12.2023*	
7.	*Контроль виробництва*	*01.01.2024-08.01.2024*	
8.	*Оформлення кваліфікаційної роботи*	*09.01.2024-15.01.2024*	
9.	*Оформлення графічної частини*	*16.01.2024-22.01.2024*	

Здобувач _____ Альона КОЛАКОВСЬКА
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ Тетяна СУЛЕЙКО
(підпис) (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено проектуванню ділянки виробничого біосинтезу триптофану при вирощуванні мутантного штаму *Corynebacterium glutamicum* KY9218. Робота складається зі вступу, восьми розділів, графічної частини (технологічної схеми та апаратурної схеми) та списку використаної літератури, що містить 61 найменування. Загальний обсяг проекту – 91 сторінок, 2 рисунків, 9 таблиць, 2 креслення формату А3.

У кваліфікаційній роботі викладено обґрунтування та описано технологічний процес ділянки синтезу триптофану мутантом *C. glutamicum* KY9218, що включає перелік допоміжних робіт (підготовка та стерилізація 6% розчинів кислоти та лугу, приготування та фільтруюча стерилізація концентрованого запасного розчину, підготовка та стерилізація композицій поживного середовища), стадії підготовки посівного матеріалу та культивування продуцента у виробничому ферментері. У вступі зазначено відомості про унікальну роль триптофану у функціонуванні людського організму, наведено способи одержання амінокислот у промисловому масштабі, зокрема мікробіологічним шляхом.

В якості новизни запропоновано використання мутантного штаму *C. glutamicum* KY9218 в якості продуцента триптофану зважаючи на синтез найбільшої кількості триптофану серед усіх продуцентів (50 г/л).

Ключові слова: *біосинтез, незамінні амінокислоти, триптофан, мутантний штам, Corynebacterium glutamicum.*

ЗМІСТ

ВСТУП 7

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА 10

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА 14

2.1. Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування 14

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента 17

2.3. Таксономічний статус біологічного агента 18

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ 20

3.1. Потреба у цільовому продукті 20

3.2. Розрахунок потужності виробництва 21

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби продукту і геометричного об'єму ферментера 22

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу 23

3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 1 $м^3$ 24

3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 100 л 25

3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 10 л 25

3.4.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці 26

3.5. Біосинтез цільового продукту 26

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 30

4.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера 30

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря 31

4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища 32

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ 36

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ 46

РОЗДІЛ 7.КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА 57
7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу 57
7.2. Мікробіологічний контроль 65
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту 66
7.3.1. Концентрація цільового продукту 66
7.3.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту 67
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ 69
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місцях емісії твердих, рідких та газоподібних відходів 69
8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва 70
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів 70
8.2.2. Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів 73
8.2.3. Система знешкодження та утилізації твердих відходів 76
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 79

ВСТУП

Значення амінокислот визначається їх унікальною роллю в побудові та проміжному синтезі основних структурних компонентів клітин (білків, нуклеїнових кислот, низькомолекулярних азот- і сірковмісних сполук) і реалізації через ці компоненти більшості функцій, які забезпечують взаємозв'язок різних систем з зовнішнім середовищем [1].

Якісне, збалансоване харчування передбачає забезпечення організму людини нутрієнтами та енергією в межах фізіологічних потреб. До таких речовин, у першу чергу, відносяться ессенціальні нутрієнти – амінокислоти: аргінін, гістидин, валін, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, триптофан, треонін, фенілаланін; поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) родини омега-6 (ω-6) та омега-3 (ω-3); ряд макро- (калій, кальцій, магній, натрій, сірка, фосфор, хлор) та мікронутрієнтів (ванадій, кобальт, кремній, залізо, йод, мідь, марганець, молібден, селен, цинк, фтор); водорозчинні вітаміни – тіамін (B1), рибофлавін (B2), ніацин (B3 або PP), пантотенова кислота (B5), піридоксин (B6), фолієва кислота (B9), ціанкобаламін (B12), аскорбінова кислота (C); жиророзчинні вітаміни – ретинол (A), токоферол (E), кальциферол (D), а також природні фізіологічні речовини високої біологічної активності – фосфоліпіди, білково-лецитинові та глюкопротеїнові комплекси [2].

Амінокислоти є сировиною, з якої будуються клітини організму. Для повноцінної реалізації генетичного коду людини і побудови якісних клітин для нашого організму необхідно 20 амінокислот, серед яких 10 відносяться до незамінних: аргінін (для дітей раннього віку та осіб похилого віку є незамінною), валін, гістидин (незамінна для дітей), ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, фенілаланін.

Триптофан відноситься до групи незамінних амінокислот. Кодуючий генетичний код UGG. Триптофан входить до складу гамаглобулінів, фібриногену, казеїну та ряду інших білків. Це провітамін, який регулює функцію ендокринної системи, нормалізує кров'яний тиск, відповідає за синтез гемоглобіну. Рівень триптофану в організмі впливає на гіпофіз, який регулює вироблення кількості гормону росту. Припускають, що ця амінокислота стимулює секрецію інсуліну, що у свою чергу активує синтез жирних кислот у печінці. Триптофан, як попередник серотоніну – гормону радості, проявляє антидепресантну дію. Надлишок триптофану в організмі шкідливий і навіть є небезпечним. У цьому випадку можуть виникнути болі в м'язових суглобах, з'являється набряклість кінцівок. Тому рекомендується приймати триптофан з продуктів харчування, а не у вигляді лікарських препаратів чи харчових добавок [2].

Для промислового виробництва існує три способи одержання амінокислот [3]:

- екстракція з білкових гідролізатів;
- хімічний синтез;
- мікробіологічний синтез за допомогою бактерій родів *Corynebacterium* та *Brevibacterium*.

Перевагою мікробіологічного синтезу є одержання біологічно активних для організму людини та тварин L-форм амінокислот .

Проте, звичайні мікроорганізми не здатні синтезувати амінокислоти у промислових масштабах, тому що ці метаболіти належать до первинних, тобто потрібні самим бактеріям. Тому для надсинтезу використовують ауксотрофних та регуляторних мутантів.

Так, існують дослідження із селекції продуцентів триптофану, в рамках проведення яких одержують ауксотрофні за фенілаланіном і тирозином мутанти. Ауксотрофні мутанти – це мутанти, що нездатні до синтезу певних амінокислот. Варто зазначити, що одержано позитивні результати щодо підвищення виходу триптофану в біологічного агента *Corynebacterium glutamicum* [3].

Тому **актуальним** є проведення пошуку та використання ефективних біологічних агентів з метою біосинтезу незамінної амінокислоти триптофану.

Новизною даної роботи є використання мутантного штаму *C. glutamicum* KY9218 в якості продуцента триптофану зважаючи на синтез найбільшої кількості триптофану серед усіх продуцентів (50 г/л) та відсутність додаткових методик зниження впливу побічних продуктів при культивуванні, що спрощує технологію одержання цільової амінокислоти.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Триптофан – це амінокислота, яка є незамінною для організму. Вона існує у двох оптично ізомерних формах - L і D, а також у вигляді рацемату [4].

L-триптофан є складовою частиною білків, таких як гамаглобуліни, фібриноген і казеїн. Ця амінокислота відноситься до групи гідрофобних амінокислот, яка містить ароматичне ядро індолу. Триптофан також може бути провітаміном для деяких біологічно активних сполук,

Триптофан може бути у формах L-, D- та DL- (рацемічна) як оптично активна амінокислота. Він добре розчинний у воді, має обмежену розчинність у спирті і не розчинний в діетиловому ефірі. Ця гетероциклічна амінокислота відіграє важливу роль у біологічних процесах.

Організми ссавців використовують триптофан для біосинтезу нікотинової кислоти (вітаміну РР) та серотоніну. Він є необхідним для синтезу м'язових білків, білків антитіл імунної системи, а також відіграє роль у синтезі мелатоніну. Триптофан є важливим будівельним матеріалом для організму, нормалізує роботу нервової системи і травлення. Він також має антидепресивну дію, підвищує опірність до стресу та сприяє покращенню сну. Недостатня кількість триптофану викликає погіршення стану шкіри й волосся, анемію, викликає безсоння [4].

Способи отримання триптофану включають два способи – хімічний, хіміко-ферментативний та мікробіологічний синтез.

Хімічний синтез

За методом Манних індол аміометилюється формальдегідом та диметиламіном. Отриманий 3-діметіламінометіліндол піддається конденсації з метиловим ефіром нітроуксусной кислоти, що призводить до утворення Метилат-3-

індолілнітропропіонової кислоти. Наступним кроком є відновлення нітрогрупи до аміногрупи. Після проведення лужного гідролізу ефіру отримують D, L-триптофан, який зазвичай присутній у формі натрієвої солі. Синтезований хімічним шляхом триптофан може містити домішки токсичних сполук. Синтетичний триптофан використовується як добавка до комбікормів для тварин [5].

Хіміко-ферментативний синтез

Хіміко-ферментативний синтез триптофану здійснюють культивуванням мікроорганізмів. Основні мікроорганізми, які включають до цього процесу:

1. *Corynebacterium glutamicum*: цей мікроорганізм має високу активність ферменту, здатного каталізувати перетворення проміжної сполуки у триптофан.

2. *Escherichia coli*: бактеріальний штам, який також може бути використаний для синтезу триптофану. Штами *E. coli*, модифіковані генетично, здатні виробляти велику кількість триптофану.

3. *Saccharomyces cerevisiae*: дріжджі, які також беруть участь в хіміко-ферментативному синтезі триптофану. Вони мають здатність до біотрансформацій та біосинтезу триптофану з відповідних прекурсорів.

4. *Actinobacteria*: деякі види *Actinobacteria*, такі як *Streptomyces* spp., можуть бути використані для виробництва триптофану. Вони мають високу активність ферментів, які здатні каталізувати біоконверсію проміжних сполук у триптофан [5].

Мікробіологічний синтез

У промисловому виробництві L-триптофану використовують штами дріжджів *Candida utilis*, які мають дефекти генів aro і, в результаті, є ауксотрофними по фенілаланіну і тирозину. Для цього процесу зазвичай використовується синтетична антранілова кислота, що має додаткові переваги. По-перше, це спрощує і здешевлює процес виробництва, а по-друге, дозволяє уникнути механізмів регуляторного контролю (триптофан, як цільовий продукт, інгібує антранілатсинтазу). За наявності мінімальних кількостей природних амінокислот, які не викликають регуляторних ефектів, мутанти *C. utilis* перетворюють антранілову кислоту в L-триптофан у культурному середовищі [6].

У мікробіологічному виробництві триптофану також можна використовувати синтетичний індол. Процес залежить від активності триптофан-інтази та доступності серину.

У організмах тварин L-триптофан перетворюється в різні сполуки, такі як нікотинова кислота і серотонін у савців, пігменти очей у комах, гетероауксин, індикан та алкалоїди в рослинах.

Триптофан відіграє роль у регуляції функцій ендокринної системи, запобігаючи анемії, регулюючи кров'яний тиск і впливаючи на синтез гемоглобіну. Споживання триптофану спонукає гіпофіз виробляти більше гормону росту. Вважається, що ця амінокислота стимулює секрецію інсуліну, що у свій час активує синтез жирних кислот у печінці.

Триптофан має особливе значення у фармакології, де він та його похідні використовують як складові багатьох лікарських препаратів. Він сприяє нормальному функціонуванню різних системних захворювань при таких захворюваннях, як рак, туберкульоз та діабет. Недостатність триптофану може призвести до розвитку пелагри, погіршення стану зубів, помутніння рогівки ока та катаракти. Під час роботи заробити потребу жінки жінки в таких амінокислотах, як триптофан і лізин, а для немовлят - триптофан та ізолейцин.

Триптофан, як попередник серотоніну, має антидепресивну дію на організм. Він сприяє зняттю гіпернозії та нав'язливих станів у дітей, тривожності перед менструацією у жінок, фіброміалгії та синдрому синдрому активної втоми. Як попередник мелатоніну, він сприяє хорошому засинанню і нормальному сну як у ранньому, так і в літньому віці.

Триптофан бере участь у виявлених помилках під час процесу відновлення ДНК. Разом з лізином він утворює трипептид лізин-триптофан-лізин, який коригує помилки, що утворюються під час підведення ДНК. Ця властивість триптофану має велике значення у запобіганні утворенню ракових клітин [2].

Наукові дослідження показують, що триптофан можна знайти в різних продуктах харчування. Особливо багато триптофану містять деякі джерела білка, такі як м'ясо, риба, молочні продукти, яйце, горіхи і розчин.

Основні джерела триптофану включають:

- ✓ М'ясо: птиця (індичка, курка), яловичина, свинина.
- ✓ Риба і морепродукти: лосось, тунець, креветки, кальмари.
- ✓ Молочні продукти: молоко, сир, йогурт.
- ✓ Яйця.
- ✓ Горіхи і настоянки: гарбузові настоянки, соняшникові настоянки, горіхи.
- ✓ Соя і соєві продукти.
- ✓ Однорічні злаки: кіно, амарант, просо.

Ці продукти містять достатньо велику кількість триптофану, але саме споживання продукту з високим вмістом білка може забезпечити достатню кількість цих амінокислот в організмі [7].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

У мікроорганізмів ферменти, що каталізують специфічні реакції в метаболічному шляху, зазвичай працюють узгоджено з різними регуляціями, так зване ретроінгібування, не допускаючи надсинтезу. Розробка метаболічних шляхів для виробництва амінокислот традиційно була зосереджена на посиленні активності та/або доступності ключових ферментів, знищенні або припиненні конкурентних шляхів [3].

Corynebacterium glutamicum KY9218 є сериновим ауксотрофом KY10894 з дефіцитом 3-фосфогліцератдегідрогенази, який є триптофан-продукуючим мутантом, отриманим за допомогою кількох раундів мутагенезу з подвійного ауксотрофного штаму фенілаланіну та тирозину KY9456. Штам *C. glutamicum* KY9218, що містить плазміду pKW9901, який несе гени резистентності до стрептоміцину та спектиноміцину як селектовані маркери, має здатність виробляти 50г/л через 80 годин у періоді культивування у ферментері з підживленням із середовищем сахарози, до якого додали цукор у початковій концентрації 6%, з подальшим збільшенням до 25%. Під час цього біосинтезу вуглець, що від сахарози, здебільшого перенаправлявся на біомасу, CO_2 і триптофан. Було підраховано, що із загального поставленого вуглецю (9,3 моль) 31 і 12% були використані для синтезу триптофану і біомаси відповідно, і цілих 48% було перетворено в CO_2. Після підсумовування вуглецевий баланс склав 90%. Решта 10% представляли собою відтік вуглецю до різноманітних побічних продуктів, таких як інші амінокислоти, кетокислоти та органічні кислоти [3].

Як альтернативу для синтезу амінокислоти використовується *Escherichia coli*. В деяких дослідженнях, штам *E. coli* AGX1757 культивувалася з режимом підживлення і досягала концентрації L -триптофану близько 33,1 г/л, у бульйоні починав з'являтися індол. Поява індолу була викликана інгібуванням триптофансинтази за рахунок накопиченого L -триптофану. Таким чином, різко зменшилася швидкість продукції L -триптофану. Додавання неіонних детергентів у надосадову рідину було ефективним для зниження розчинності L -триптофану. Ця добавка фактично викликала кристалізацію L -триптофану і, як наслідок, інгібуючий ефект триптофансинтази [4].

Було винайдено штами *Bacillus subtilis* AJ 11979 який був стійкий в середовищі антагоністів триптофану - 5-фтортриптофан (5FT), індолміцин (IM), 4 - фтортриптофан і 7-азатриптофан. Саме цей штамм продукував 9,0 г/літр триптофану з 13% вмісту глюкози при 120-годинному культивуванні [5].

Узагальнені дані по вибору біологічного агента для синтезу триптофану представлено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Умови культивування	Концентрація триптофану, г/л	Використане джерело
Corynebacterium glutamicum KY9218	Сахароза -60 Кукурудзяний екстракт – 66 (NH4)2So4 – 17 KH2PO4 – 2 K2HPO4 – 1.2 MgSO4*7H2O-1.7 FeSO4*7H2O-13мг/л MnSO4*4H2O-13мг/л CuSO4*5H2O-6мг/л L-тирозин – 310 мг/л L-фенілаланін 650 мг/л Біотин – 230 мкг/л Тіамін-HCl-450 мкг/л	2-літровий настільний ферментер, 80 годин періодичного культивування з підживленням без антибіотиків, при 800 об/хв, аерація 1 л/хв при 30°C, pH 6,1.	50	[8, 9]

Закінчення таблиці 2.1

Escherichia coli AGX1757	Глюкоза – 40 Антранілова кислота – 0,5 Лимонна кислота 5 KH2PO4 – 2 Дріжджовий екстракт – 1 Гідролізат соєвих бобів – 20 мл MgSO4*7H2O-1 FeSO4*7H2O-20мг/л CaCl2*2H2O – 0.1 Тетрациклін – 10 мг/л Детергент Pluronic L-61 – 50мкл/л	2-літровий настільний ферментер, 80 годин періодичного культивування з підживленням (5,6г/л за годину глюкоза, антранілова кислота від 0,5 до 0,9 г/л в годину) з тетрацикліном. Температура 30˚С з початком підживлення, pH 6,8; 500 об/хв., аерація 0,5 л/хв..	33,1	[10]
Bacillus subtillis AJ11979	Глюкоза -130 NH4Cl – 20 KCl-2 KH2PO4 – 1 MgSO4*7H2O-0.4 FeSO4*7H2O-10мг/л MnSO4*4H2O-13мг/л L-фенілаланін – 0,1 г L-метіонін – 0,1 CaCO3-40 Детергент-0,2	В колбі на качалках, 120 год, 30˚С,	9	[11]

Отже, при виборі біологічного агента було досліджено кількість утвореного триптофану та умови культивування. Як найбільш підхожий, було обрано мутант *C. glutamicum* KY9218, який виробляв найбільшу кількість серед усіх продуцентів – 50 г/л триптофану та не вимагав додаткових методик зниження впливу побічних продуктів при культивуванні, що ускладнювало б технологію одержання, як при культивуванні *E. coli* AGX1757.

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

Corynebacterium glutamicum - це грампозитивна бактерія, яка має паличкоподібну форму. Її клітини зазвичай прямі або слабо згорнуті і мають розмір приблизно 2-3 мікрометри. Вона не утворює спори і не є патогенною для людей або тварин, необов'язкова анаеробна форма і присутня в грунті, воді, повітрі [13].

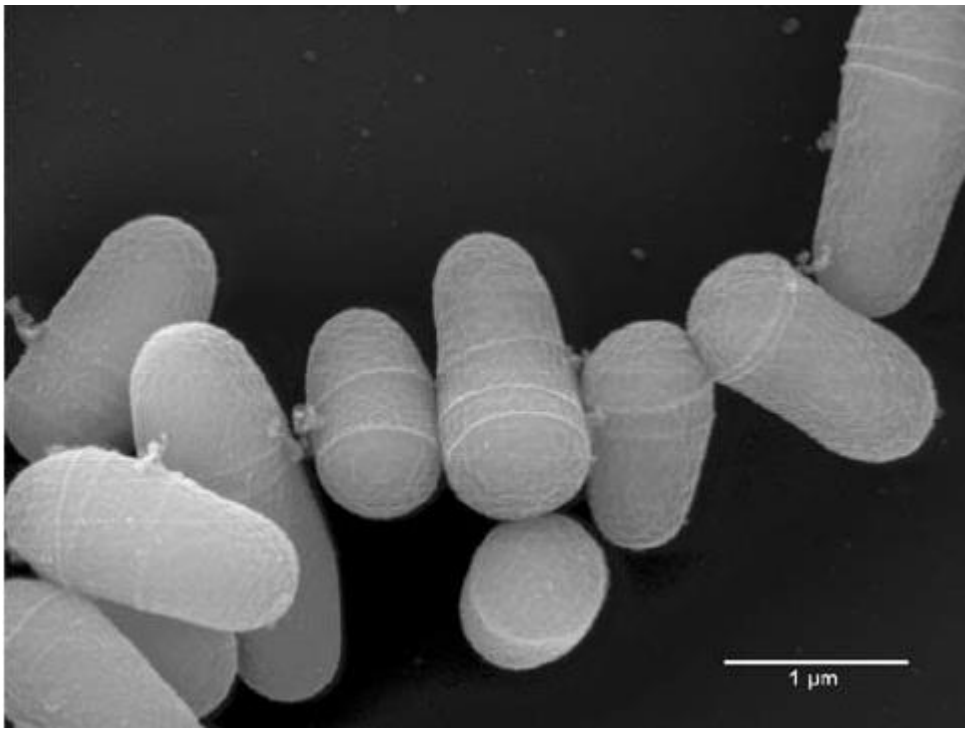

Рис. 3.1. Зображення з електронного мікроскопа *Corynebacterium glutamicum* [12].

У мазках зазвичай можна спостерігати окремі або парні нерухомі мікроорганізми. Клітинна стінка цих мікроорганізмів складається на 70% з пептидоглікану. *C. glutamicum*, як і інші грампозитивні бактерії, має тейхоєві кислоти. Цитоплазматична мембрана складається з подвійного шару білків з інтегральними білками, які занурені в неї. Периферійні білки розташовані на поверхні мембрани, а мезосоми розвинуті добре.

На м'ясо-пептонному агарі (МПА), після трьох днів висіву, *C. glutamicum* формує блискучі, жовті колонії з рівним краєм. Поверхня колоній гладка, і їх діаметр зазвичай не перевищує 5 мм. У рості на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) спостерігається рівномірне помутніння середовища. В певних умовах середовища

можуть накопичуватися речовини, такі як полісахариди, жири, поліфосфати та сірка, які можна вважати запасними речовинами [13].

Фізіолого-біохімічні ознаки. Клітини *C. glutamicum* ростуть і розмножуються при температурі 24 - 40°С. Даний мікроорганізм є мезофілом і оптимальною температурою культивування є 30°С. Енергія отримується при перенесенні електронів по дихальному ланцюгу. За типом живлення *C. glutamicum* є хемоорганотрофом. Ростовим субстратом для них є органічні речовини, адже вони для них являються джерелом вуглецю, електронів та енергії. По відношенню до pH середовища вони являються нейтрофілами (pH від 6 до 8,5), причому при зниженні кислотності середовища у них відразу спостерігається припинення росту, а при подальшому зниженні pH *C. glutamicum* гинуть. Добре росте на глюкозі, сахарозі, мальтозі, фруктозі, етанолі, оцтові кислоті. Не зростає на ксилозі, арабінозі, лактозі, рафінозі.

Для *C. glutamicum* характерний бінарний поділ клітини навпіл. Також у *C. glutamicum* спостерігається і статеве розмноження [14].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

У 1896 році Леманн і Нойман описали рід *Corynebacterium*, до якого належать 75 видів мікроорганізмів, що мають подібну морфологію. Один з цих видів, *C. glutamicum*, був виявлений як продуцент глутамату. У 1950-х роках були відібрані штами, які накопичують глутамат у живильному середовищі. Один з таких штамів, раніше відомий як *Micrococcus glutamicus* і зберігається як ATCC 13032 та NCIMB 10025, був визнаний як штам типу *Corynebacterium glutamicum* [11].

Згідно з дев'ятим виданням керівництва Бергі з систематики бактерій, *C. glutamicum* відноситься до відділу *Firmicutes*, класу *Thallobacneria*, роду *Corynebacterium*. Але у 80-х роках була складена філогенетична класифікація на основі аналізу 16S р-РНК [12].

Філогенетична класифікація *C. glutamicum*.

Надцарство: *Procaryota*

Царство: *Bacteria*

Відділ: *Actinobacteria*

Клас: *Actinobacteria*

Підклас: *Actinobacteria*

Порядок: *Actinomycetales*

Підпорядок: *Corynebacterineae*

Родина: *Corynebacteriaceae*

Рід: *Corynebacteriaceae*

Вид: *Corynebacterium glutamicum* [15]

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

У даній роботі наведено основні характеристики отримання триптофану з використанням мутантного штаму *Corynebacterium glutamicum* KY9218 у ферментері 10 м^3 (коефіцієнт заповнення 0,6) з метою лікування та профілактики населення в Україні, що має депресію.

Роль триптофану у боротьбі з депресією

Депресія є дуже поширеним психічним захворюванням. Варіанти лікування пацієнтів із цією патологією слід підбирати індивідуально та вони можуть включати використання ліків і психотерапії. Дослідники припустили, що низький рівень серотоніну викликає депресію. Втім дані нещодавнього системного комплексного огляду виявили мало доказів зв'язку рівня серотоніну з депресією [16].

Клінічна депресія є одним з найпоширеніших психічних захворювань, яке вражає мільйони людей у всьому світі. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) зазначає, що близько 280 млн осіб у світі живуть з депресією. Такі пацієнти відчувають різні симптоми, які впливають на їх настрій, емоції та здатність займатися повсякденними справами.

Хоча кілька факторів спричиняють розвиток депресії, загальна думка полягає в тому, що вона пов'язана з хімічним дисбалансом у мозку, зокрема низьким рівнем хімічної речовини серотоніну. Однак даних, що підтверджують цю теорію, може бути менше, ніж вважали дослідники спочатку. Так, недавній системний комплексний огляд, опублікований у «Molecular Psychiatry», виявив, що існує мало доказів на підтримку думки про те, що депресія пов'язана з низьким рівнем серотоніну.

Лікування пацієнтів з депресією часто включає кілька підходів. Наприклад, люди з депресією можуть використовувати когнітивну поведінкову терапію, яка покликана допомогти їм працювати зі сприйняттям і моделями мислення або інші форми розмовної терапії, включаючи консультування та психотерапію. Також можна розглянути інші варіанти зміни способу життя [16].

Незважаючи на всі останні досягнення в нейронауці, досі немає пояснення всіх молекулярних аспектів депресії. Однак відомо, що дефіцит біогенних амінів (зокрема серотоніну, дофаміну та норадреналіну), нейротрофічний фактор головного мозку, дерегуляція кишкової мікробіоти, генетичні, імунологічні, ендокринні фактори, фактори навколишнього середовища та нейрогенні проблеми лежать в основі виникнення депресії. Роль моноамінів у депресії широко вивчена. Зокрема, серотонін тісно пов'язаний з депресією. Цей моноамін виробляється з амінокислоти триптофану, а порушення активності серотонінових шляхів пов’язане з патофізіологією депресії. Нині антидепресанти, засновані на зворотному захопленні серотоніну в синаптичній щілині, проявляють ефективність та є одними з найбільш поширених у всьому світі [17].

Вивчення метаболізму триптофану в контексті депресії може відкрити нову інформацію та терапевтичні можливості у лікуванні депресії. Ця амінокислота, метаболізуючись у серотоніновий або кінуреніновий шлях, відіграє вирішальну роль у кількох аспектах, глибоко пов’язаних із фізіопатологією депресії, таких як нейрозапалення, хронічний стрес, дисрегуляція мікробіоти кишечника та рівні експресії нейротрофічного фактору головного мозку. Підтримка балансу триптофану має вирішальне значення для фізіологічного гомеостазу, що є важливим для запобігання розвитку нейропсихіатричних захворювань, таких як депресія [17].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Війна, що триває в Україні, стосується всіх її мешканців без винятку. Тож впливу війни зазнають і військові, і цивільне населення, що перебуває в зоні бойових дій або в окупації, а також мешканці тилу, внутрішні переселенці та ті, хто виїхав

закордон. Через війну мільйони українців матимуть негативні наслідки для психічного здоров'я [18].

Згідно даних ВООЗ, потенційний ризик захворіти внаслідок війни на такі психічні розлади, як депресія і посттравматичний стрес, станом на 2023 рік мають понад 8,5 млн українців [19].

Серед топ-10 фармкомпаній, продукція яких зайняла ринок антидепресантів України, виділяють «Фарма Старт», «Lundbeck», «Pfizer», «Rivopharm», «Egis Pharmaceutical», «Angelini Francesco», «Medochemie», «Teva Pharmaceutical Industries», «Farmlyga», «Sandoz» [20].

Тому приймаємо, що будемо забезпечувати триптофаном 1% українців, що мають депресію:

$$\frac{8\,500\,000 \times 1}{100} = 85\,000 \text{ осіб}$$

Нормою однодозового прийому триптофану виробника «NOW Foods» є 1 капсула дозуванням 1 г (1000 мг) 1-3 рази на день [21]. Беручи це до уваги приймаємо дозу триптофану 1 г 2 рази на добу для 1 людини – тобто, добова доза становить 2 г триптофану.

Тоді добова доза для 85 000 осіб складе:

$$2 \times 85\,000 = 170\,000 \text{ г} = 170 \text{ кг}$$

Припускаємо курс прийому триптофану 1 місяць (30 днів), тоді необхідна кількість триптофану у складі препарату для 85 000 осіб:

$$170 \times 30 = 5100 \text{ кг}$$

Отже, річна потреба у триптофані для 85 000 українців для забезпечення боротьби з депресією курсом 1 місяць складає 5100 кг.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби продукту і геометричного об'єму ферментера

Corynebacterium glutamicum KY9218 є сериновим ауксотрофом та має здатність виробляти 50 г/л триптофану через 80 годин культивування з підживленням [22,23].

Варто розрахувати, який об'єм культуральної рідини знадобиться для отримання 5100 кг цільової амінокислоти:

$$\frac{5100\ \text{кг}}{0{,}05\ \text{кг}} = 102\ 000\ \text{л}$$

Якщо загальні втрати при одержанні триптофану складуть 10 %, то об'єм культуральної рідини становитиме

$$V_{кр} = 102\ 000\ \text{л} / (1\text{-}0{,}9) = 113\ 333\ \text{л}$$

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 70. Тоді значення кількості продукту на добу ($V_д$) :

$$V_д = V_{кр}/T_{рд} = 113\ 333 /70 = 1619\ \text{л}$$

Далі визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_ц = V_{кр} / ((V_д \times T_{цф})/24) = 113\ 333/ ((1619\times 86)/24) = 19\ \text{циклів},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та виробничий біосинтез – 80 год).

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{крц}$):

$$V_{крц}= K1 \times V_д \times T_{цф} / 24 = 1{,}1 \times 1619 \times 86 / 24 \approx 6000\ \text{л},$$

де К1– коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій .

Об'єм ферментера для напрацювання 6000 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6 складає:

$$V_г = V_{крц}/К_{зап} = 6000/0{,}6 = 10\ 000\ \text{л}=10\ \text{м}^3,$$

де $К_{зап}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл напрацьовують $V_{кр}$ = 6 м^3 культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_ф} = \frac{6}{1 - 0{,}1} \approx 6{,}6 \text{ м}^3$$

де $E_ф$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез проводять в апараті з робочим об'ємом $V_{роб.1}$ = 6,6 м^3.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап}$ = 0,6 можливий геометричний об'єм ферментера $V_{ф.1}$ = 6,6/0,6 = 11 м^3. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф}$ = 10 м^3 та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$К_{зап.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{6{,}6}{10} = 0{,}66$$

Коефіцієнт заповнення знаходиться у вибраних межах.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1 + X_ф} = \frac{6{,}6}{1 + 0{,}1} = 6 \text{ м}^3$$

де $X_ф$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 6{,}6 - 6 = 0{,}6 \text{ м}^3$$

3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 1 м^3

Для одержання 600 л культуральної рідини кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.2} = \frac{V_{пм1}}{1 - E_{ін}} = \frac{600}{1 - 0{,}1} = 666{,}6 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.}$ = 666,6/0,6 = 1 111 л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін}$ = 1 м^3 та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$К_{зап.2} = \frac{V_{роб.2}}{V_{сін}} = \frac{666{,}6}{1000} = 0{,}66$$

Коефіцієнт заповнення знаходиться у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс2} = \frac{V_{роб.2}}{1 + X_{ін}} = \frac{666,6}{1+0,1} = 606 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 666,6 - 606 = 60,6 \text{ л}$$

3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 100 л

Для одержання 60,6 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.3} = \frac{V_{пм2}}{1 - E_{ін}} = \frac{60,6}{1-0,1} = 67,3 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.}$ = 67,3/0,6 = 112 л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін}$ = 100 л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$К_{зап.3} = \frac{V_{роб.3}}{V_{сін}} = \frac{67,3}{100} = 0,67$$

Коефіцієнт заповнення знаходиться у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.3}}{1 + X_{ін}} = \frac{67,3}{1+0,1} = 61,3 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 67,3 - 61,3 = 6 \text{ л}$$

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

Для одержання 6 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.4} = \frac{V_{пмз}}{1-E_{ін}} = \frac{6}{1-0,1} = 6,6 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.}$ = 6,6/0,6 = 11 л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін}$ = 10 л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$К_{зап.4} = \frac{V_{роб.4}}{V_{сін}} = \frac{6,6}{10} = 0,66$$

Коефіцієнт заповнення знаходиться у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс4} = \frac{V_{роб.4}}{1+X_{ін}} = \frac{6,6}{1+0,1} = 6 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 6,6 - 6 = 0,6 \text{ л}$$

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

600 мл посівного матеріалу продуцента триптофану можна отримати у колбах на качалці об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2. Тоді необхідна кількість колб:

$$N_к = \frac{600}{750 \times 0,2} = 4 \text{ колби}$$

Таким чином, вирощування посівного матеріалу з метою проведення біотехнологічного одержання триптофану з використанням як продуцента *C. glutamicum* KY9218 в ферментері об'ємом 10 м^3 коефіцієнтом заповнення 0,6 слід проводити протягом чотирьох стадії.

3.5. Біосинтез цільового продукту

Розглянемо катаболізм субстрату. Джерелом вуглецю у середовищі є сахароза. Сахароза перетворюється на Д-глюкозу під дією ферменту бета-фруктофуранозидаза (3.2.1.26) (рис. 3.1).

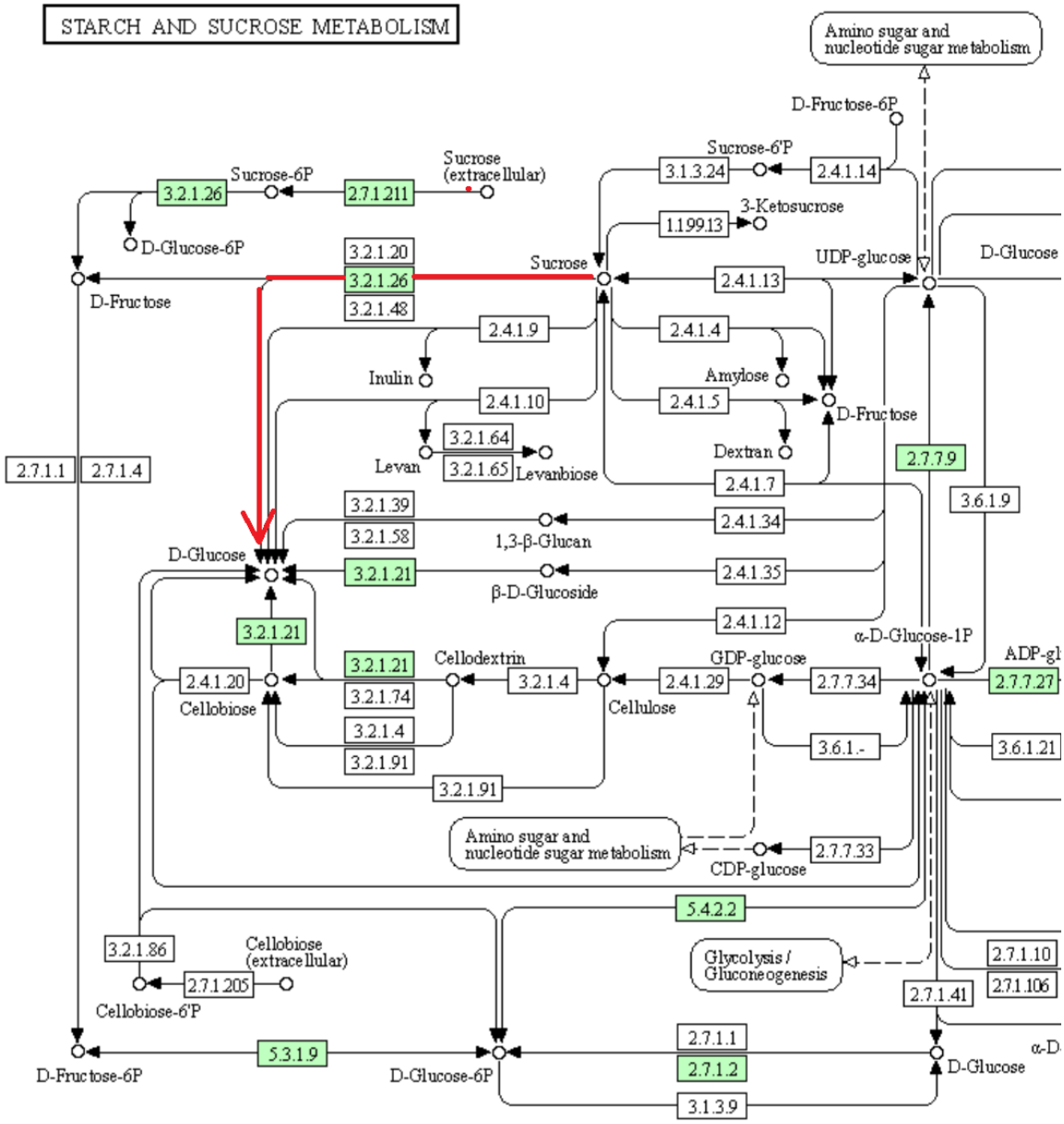

Рис. 3.1. Катаболізм сахарози до глюкози згідно даних Kegg [24]

Надалі відбувається шлях перетворення Д-глюкози до фосфоенолпірувату під дією ферментів (рис. 3.2.):

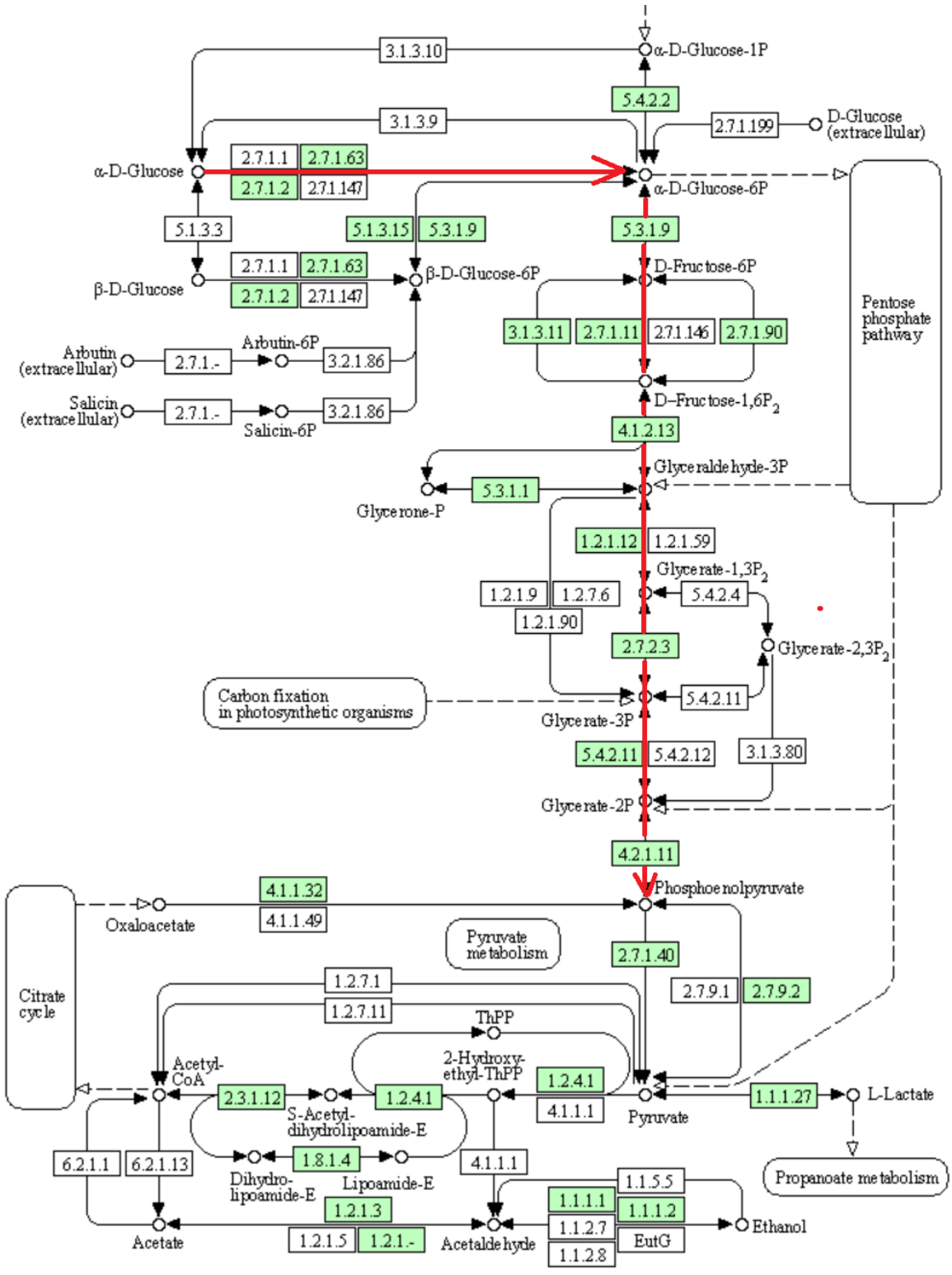

Рис. 3.2. Шлях перетворення Д-глюкози на фосфоенолпіруват (2.7.1.63 - поліфосфат глюкокінази, 5.3.1.19 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза, 2.7.1.90 - АТФ-залежна фосфофруктокіназа, 4.1.2.13 - фруктозо-бісфосфатальдолаза, 5.3.1.1 – тріозофосфатізомераза, 1.2.1.12 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, 2.7.2.3 –

фосфогліцераткіназа, 5.4.2.11 - 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза, 4.2.1.11 – енолаза) [25]

Ланцюг перетворення фосфоенолпірувату до триптофану зображений на малюнку 3.3.

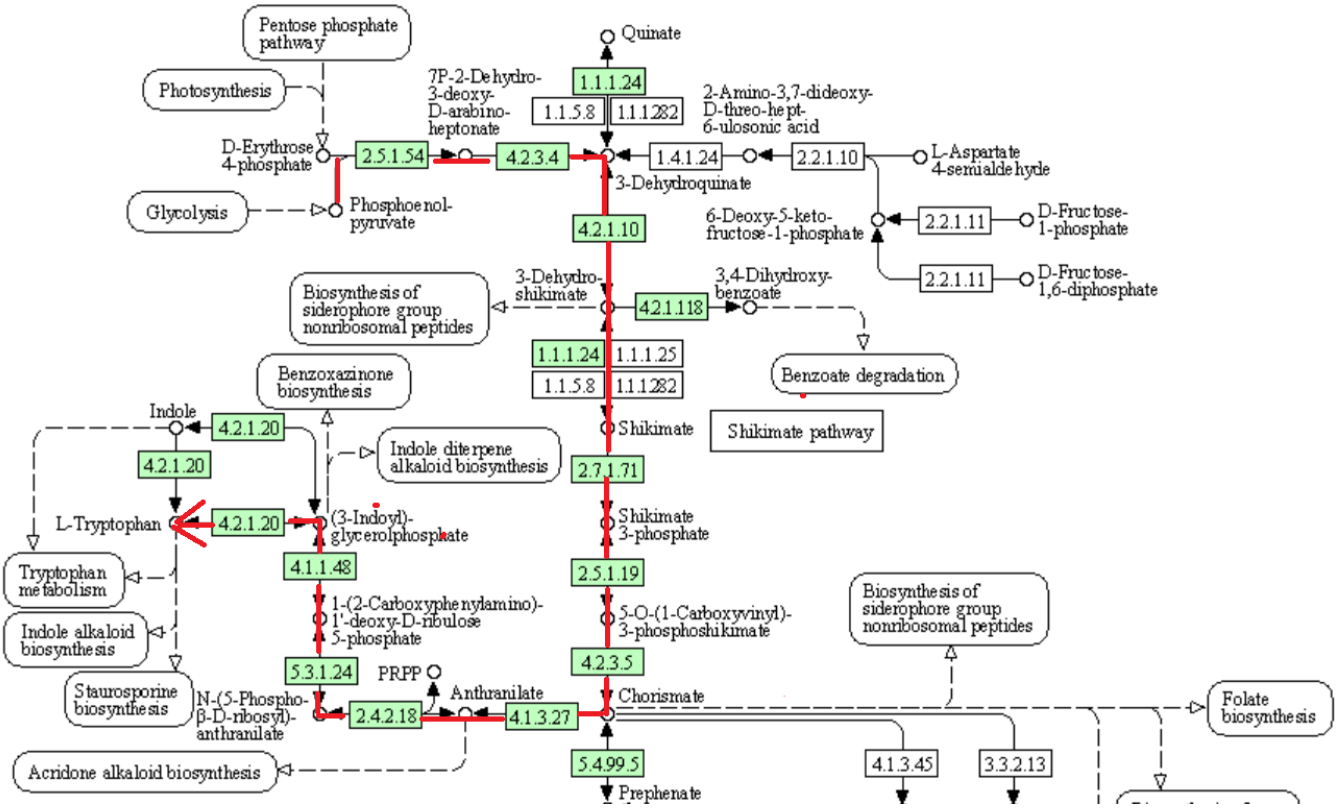

Рис. 3.3. Біосинтез триптофану (2.5.1.54 - 3-дезокси-7-фосфогептулонатсинтаза, 4.2.3.4 - 3-дегідрохінатсинтаза, 4.2.1.10 - 3-дегідрохінатдегідратаза II, 1.1.1.24 - хінат/шикіматдегідрогеназа (NAD+), 2.7.1.71 – шикіматкіназа, 2.5.1.19 - 3-фосфошикімат-1-карбоксивінілтрансфераза, 4.2.3.5 – хоризматсинтаза, 4.1.3.27 - компонент I антранілатсинтази, 2.4.2.18 – антранілатфосфорибозилтрансфераза, 5.3.1.24 - фосфорибозил-ізомераза A, 4.1.1.48 - індол-3-гліцеролфосфатсинтаза, 4.2.1.20 - бета-ланцюг триптофансинтази) [26]

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера

Штам *C. glutamicum* KY9218 є аеробом. Так, в процесі біосинтезу триптофану слід забезпечувати аерацію 1 л/хв [27]. Клітини *C. glutamicum* KY9218 ростуть і розмножуються при температурі 24 - 40℃. Даний мікроорганізм є мезофілом і оптимальною температурою його культивування є 30 ℃. По відношенню до pH середовища *C. glutamicum* KY9218 є нейтрофілом – оптимум pH від 6 до 8,5. Такий режим вирощування даного біологічного агента є сприятливими умовами для розвитку сторонніх мікроорганізмів, які представлені мезофілами, нейтрофілами та аеробами. Тому процес культивування триптофану слід проводити із забезпеченням умов асептики. Асептику забезпечують стерилізацією обладнання, всіх комунікацій, аеруючого повітря та композицій поживного середовища.

Триптофан, синтезований *C. glutamicum* KY9218, є екзометаболітом, тому культивування штаму проводять глибинним методом. Найбільша концентрація триптофану 50 г/л досягається після 80 годин вирощування біологічного агента, тому процес біосинтезу здійснюють періодичним способом.

Отже, виробничий біосинтез триптофану *C. glutamicum* KY9218 буде проходити періодично глибинним методом при здійсненні аерації та забезпеченні асептичних умов. Тому ферментер має бути оснащений сорочкою для подачі глухої пари, барботером, мішалкою, та приладами вимірювання – температури, тиску, розчиненого кисню.

Для виробничого культивування *C. glutamicum* KY9218 з метою отримання триптофану необхідний ферментер об’ємом 10 м^3. Такий ферментер може бути виконаний під замовлення, обираємо фірму «Qingdao Innovaa Bio-Meditech Co., Ltd».

Innova Bio-Meditech є одним із професійних світових постачальників лабораторного та медичного обладнання [28]. Фірма реалізовує ферментери необхідного нам об'єму, та відповідною системою контролю, яка характеризується:

- Системою керування Siemens PLC;
- Усі аспекти керування використовують інтелектуальне ПІД-регулювання, стабільність керування, високу точність керування та мають алгоритм керування самонастроюванням параметрів;
- З функціями відображення в режимі реального часу, запису даних, аналізу даних, графіків і пакетних звітів, вихідного друку, керування паролями та сигналізації про перевищення ліміту тощо [29].

Матеріал виготовлення ферментеру – нержавіюча сталь SUS 316L, оснащений барботером, для контролю аерації встановлений роторний витратомір, наявні датчики контрою температури, швидкості обертання, pH, DO, тиск, подачі, оснащений мішалкою. Ферментер відповідає вимогам, які необхідно задовольнити для реалізації процесу культивування *C. glutamicum* KY9218, обираємо його для виробничого культивування.

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

C. glutamicum KY9218 є аеробом, тому у процесі культивування необхідно забезпечувати аерацію. Необхідна умова при вирощуванні глибинної культури – асептичність, тому повітря необхідно підготувати перед подачею, воно має бути стерильним для здійснення аерацію. Забезпечення стерильності повітря здійснюється за допомогою наступних етапів:

1) Забір атмосферного повітря. Забір повітря здійснюється за допомогою повітрозабірник на висоті 30 м, забір повітря відбувається у віддаленій зоні від технологічних шкідливих викидів у зоні чистого повітря.

2) Грубе очищення повітря. Грубе очищення повітря є необхідним з ціллю очистити повітря від грубого аерозолю – пилу та крупних часток, які можуть підвищити ризик контамінації. Також це є необхідним для захисту компресору від

забруднень. Такі фільтри зазвичай зроблені із волокнистих матеріалів, які затримують на поверхні волокна частинки та пил.

3) Стабілізація термодинамічних показників повітря. Цей етап є необхідним для стискання повітря та зменшення у ньому вмісту вологи. Повітря після проходження фільтру грубої очистки потрапляє у компресор де стискається, внаслідок чого температура повітря підвищується на 15-25 ºС на вході, на виході температура повітря може становити до 250 ºС. Після цього воно потрапляє у теплообмінник – охолоджувач. Наступним елементом є ресивер, який необхідний для стабілізації повітряного потоку та який може виконувати функцію депо повітря у разі скачків потоку.

4) Попередня очистка повітря в головному фільтрі. Попередня очистка повітря здійснюється для затримання часток розміром >1 мкм за допомогою фільтруючого матеріалу. Заміну матеріалу у таких фільтрах здійснюють 2 рази на рік.

5) Очистка повітря в індивідуальному фільтрі. Індивідуальна очистка повітря здійснюється для затримання часток розміром >0,2 мкм. Зазвичай у якості фільтруючого матеріалу використовується скловата або інше синтетичне волокно з маленьким діаметром пор (0,2 мкм). Індивідуальні фільтри встановлюються перед кожним інокулятором та ферментером, ступінь очищення на цій стадії складає Е = 99,999%.

4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для біосинтезу триптофану біологічний агент *C. glutamicum* KY9218 вирощували у середовищі, що містило компоненти (г/л) [8]:

Сахароза – 60

Кукурудзяний екстракт – 66

$(NH_4)_2SO_4$ – 17

KH_2PO_4 – 2

K_2HPO_4 – 1,2

$MgSO_4*7H_2O$ – 1,7

$FeSO_4*7H_2O$ – 13 мг/л

$MnSO_4*4H_2O$ – 13 мг/л

$CuSO_4*5H_2O$ – 6 мг/л

L-тирозин – 310 мг/л

L-фенілаланін – 650 мг/л

Біотин – 230 мкг/л

Тіамін-HCl – 450 мкг/л

У даному поживному середовищі джерелом вуглецю та енергії виступає сахароза, джерело азоту – кукурудзяний екстракт та сульфат амонію.

На першому етапі для вирощування посівного матеріалу в колбах необхідно приготувати 600 мл поживного середовища. Для стерилізації компонентів буде використовуватися автоклав, оскільки об'єм композицій невеликий.

Композиція А: Сахарозу та кукурудзяний екстракт виносять в окрему композицію, стерилізацію проводять за температури 112°С і під тиском 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція Б: Солі магнію стерилізують окремо від солей фосфору для запобігання взаємодії даних речовин, що супроводжується випаданням в осад нерозчинного фосфату магнію при їх спільній стерилізації. Тому $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4*7H_2O$, $FeSO_4*7H_2O$, MnSO4*4H2O, CuSO4*5H2O стерилізують окремо при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв.

Композиція В: KH_2PO_4, K_2HPO_4 (131°С, 0,15 МПа, 50 хв).

Композиція Г: L-тирозин, L-фенілаланін, біотин, тіамін-HCl не витримують впливу високої температури, тому для запобігання їх деградації проводять стерилізуючу фільтрацію розчину вказаних компонентів через фільтр з розміром пор 0,22 мкм.

На другому етапі необхідно приготувати 6 л поживного середовища.

Композиція А: Сахарозу та кукурудзяний екстракт стерилізують безпосередньо у інокуляторі об'ємом 10 л, оскільки це сама велика за об'ємом композиція (5,458 л), стерилізацію проводять за температури 112°С і під тиском 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція Б: (NH4)2SO4, MgSO4*7H2O, FeSO4*7H2O, MnSO4*4H2O, CuSO4*5H2O розчиняють у 200 мл води у колбі на 1 л та стерилізують в автоклаві при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв.

Композиція В: KH2PO4, K2HPO4 розчиняють у 200 мл води у колбі на 1 л та стерилізують в автоклаві при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв.

Композиція Г: Для : L-тирозин, L-фенілаланін, біотин, тіамін-HCl проводять фільтруючу стерилізацію розчину у стерильну колбу.

На третьому етапі необхідно приготувати 60 л поживного середовища.

Композиція А: Сахарозу та кукурудзяний екстракт стерилізують безпосередньо у інокуляторі об'ємом 100 л, оскільки це сама велика за об'ємом композиція (56,185 л), стерилізацію проводять за температури 112°С і під тиском 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція Б: (NH4)2SO4, MgSO4*7H2O, FeSO4*7H2O, MnSO4*4H2O, CuSO4*5H2O розчиняють у 2 л води у реакторі на 5 л та стерилізують при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв.

Композиція В: KH2PO4, K2HPO4 розчиняють у 200 мл води у колбі на 1 л та стерилізують в автоклаві при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв.

Композиція Г: Для : L-тирозин, L-фенілаланін, біотин, тіамін-HCl проводять фільтруючу стерилізацію розчину у стерильну колбу.

На четвертому етапі необхідно приготувати 600 л поживного середовища.

Композиція А: Сахарозу та кукурудзяний екстракт стерилізують безпосередньо у інокуляторі об'ємом 1 000 л, оскільки це сама велика за об'ємом композиція (563,856 л), стерилізацію проводять за температури 112°С і під тиском 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція Б: (NH4)2SO4, MgSO4*7H2O, FeSO4*7H2O, MnSO4*4H2O, CuSO4*5H2O розчиняють у 20 л води у реакторі на 40 л та стерилізують при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв.

Композиція В: KH2PO4, K2HPO4 розчиняють у 1000 мл води у колбі на 5 л та стерилізують в автоклаві при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв.

Композиція Г: Для : L-тирозин, L-фенілаланін, біотин, тіамін-HCl проводять фільтруючу стерилізацію розчину у стерильну колбу.

Для етапу виробничого культивування необхідно приготувати 6 000 л поживного середовища.

Композиція А: Сахарозу та кукурудзяний екстракт стерилізують безпосередньо у ферментері об'ємом 10 $м^3$, оскільки це сама велика за об'ємом композиція (5 728 л), стерилізацію проводять за температури 112°С і під тиском 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція Б: (NH4)2SO4, MgSO4*7H2O, FeSO4*7H2O, MnSO4*4H2O, CuSO4*5H2O розчиняють у 100 л води у реакторі на 250 л та стерилізують при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв.

Композиція В: KH2PO4, K2HPO4 розчиняють у 20 л води у реакторі на 50 л та стерилізують в автоклаві при 131°С, 0,15 МПа, 50 хв.

Композиція Г: Для : L-тирозин, L-фенілаланін, біотин, тіамін-HCl проводять фільтруючу стерилізацію розчину, який потім поміщається у збірник об'ємом 25 л.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведено в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1.

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Компресор повітряний для постійного використання, одноступеневий Виробник: «PG» Продуктивність: 256 м^3/год; Робочий тиск: 220 мБар. [30]
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Кишеньковий фільтр Виробник: «NEW FILTER»; Клас очистки: G4; Кількість кишень: 6; Матеріал: синтетичне волокно; Габарити, мм: 592х592х200. [31]
К-3	Компресор	1	Гвинтовий компресор KESHIDI KSD-150A-PMS Виробник: «KESHIDI»; Продуктивність: 17,4 м^3/хв; Робочий тиск: 8 бар; Габарити, мм: 1800х1250х1670. [32]

Продовження таблиці 5.1

Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач рефрижераторний OMD 710 Виробник: «Omga»; Продуктивність: 710 м^3/год; Робочий тиск: 14 бар. [33]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер (РГ 14,98 м^3) Виробник: «Центррезервуарсервіс»; Матеріал: сталь 09Г2С; Об'єм: 14,98 м^3; Робочий тиск: 3 МПа. [34]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітрянагрівачі водяні WWN 40-20 Виробник: «ГРАНД»; Продуктивність: 1040 м3/год; Габарити, мм: 500х250х164. [35]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Повітряний компактний фільтр тонкого очищення Виробник: «Alter Air»; Клас очистки: F9; Габарити, мм: 592х592х292. [36]
ІФ-8	Індивідуальний фільтр	1	Аерозольний фільтр ФАП-200 Виробник: «NEW FILTER»; Продуктивність: 200 м3/год; Робочий тиск: 300 Па; Ефективність очистки: 99,999% [37]

Продовження таблиці 5.1

І-9	Інокулятор об’ємом 10 л	1	IKA bioreactor Algaemaster 10 Виробник: «IKA»; Частота обертів: 10 -100 rmp; Оснащений сорочкою, барботером, датчика pH, кисню, тиску, температури. Габарити, мм: 800x1000x600. [38]
ІФ-10	Індивідуальний фільтр	1	Аерозольний фільтр ФАП-200 Виробник: «NEW FILTER»; Продуктивність: 200 м3/год; Робочий тиск: 300 Па; Ефективність очистки: 99,999% [37]
І-11	Інокулятор об’ємом 100 л	1	100L Fermenter BLBIO-100SJ Виробник: «BLBIO»; Матеріал: нержавіюча сталь 316L; Оснащений сорочкою, барботером, датчика pH, кисню, тиску, температури. Частота обертів: до 1500 об/хв; Потужність приводу: 0,75-3 кВт; Габарити, мм: 500x500. [39]
ВД-12	Ваговий дозатор для інокулятору на 100 л	1	Дозатор ваговий напівавтоматичний «Норма-С» Виробник: «АГРО-СІМО-МАШБУД»; Кількість доз: 500 доз/год; Межі дозування: 5-50 кг; Габарити, мм: 990x680x660. [40]

Продовження таблиці 5.1

Д-13	Дозатор води для інокулятору на 100 л	1	Дозатор води ДВС-12 Виробник: «Сенсор»; Межі дозування: до 100 л; Продуктивність: 1080 л/год; Робочий тиск: 100 до 500 кПа; [41]
Р-14	Реактор об’ємом 5 л для приготування композиції Б	1	5L Double-wall Glass Reactor Виробник: «Zhengzhou Greatwall Scientific Industrial and Trade Co., Ltd.»; Матеріал: боросилікатне скло 3.3.; Оснащений сорочкою, датчиками контролю швидкості обертання, температури, тиску. Потужність приводу: 0,25-0,75 кВт; Габарити, мм: 591W*520D*1594. [42]
ІФ-15	Індивідуальний фільтр	1	Аерозольний фільтр ФАП-200 Виробник: «NEW FILTER»; Продуктивність: 200 м3/год; Робочий тиск: 300 Па; Ефективність очистки: 99,999% [37]
І-16	Інокулятор об’ємом 1000 л	1	Industry Bioreactor 1 m^3 on order Виробник: «ІКА»; Матеріал: нержавіюча сталь 316L; Оснащений сорочкою, барботером, датчика pH, кисню, тиску, температури. Частота обертів: 750 об/хв; Потужність приводу: 1,5-15 кВт; Габарити, мм: 1200х800. [43]

Продовження таблиці 5.1

ВД-17	Ваговий дозатор для інокулятору на 1000 л	1	Дозатор ваговий напівавтоматичний «Норма-С» Виробник: «АГРО-СІМО-МАШБУД»; Кількість доз: 500 доз/год; Межі дозування: 5-50 кг; Габарити, мм: 990х680х660. [40]
Д-18	Дозатор води для інокулятору на 1000 л	1	Дозатор води ДВС-12 Виробник: «Сенсор»; Межі дозування: до 100 л; Продуктивність: 1080 л/год; Робочий тиск: 100 до 500 кПа; [41]
Р-19	Реактор об’ємом 40 л для приготування композиції Б	1	VERI Reactor 40 L on order Виробник: «De Dietrich Process Systems»; Матеріал: нержавіюча сталь 316L; Оснащений сорочкою, датчиками pH, тиску, температури. Частота обертів: до 1500 об/хв; Потужність приводу: 0,75-3 кВт; Габарити, мм: 400х500. [44]
ВД-20	Ваговий дозатор для реактору на 40 л	1	Дозатор ваговий напівавтоматичний «Норма-С» Виробник: «АГРО-СІМО-МАШБУД»; Кількість доз: 500 доз/год; Межі дозування: 5-50 кг; Габарити, мм: 990х680х660. [40]

Продовження таблиці 5.1

Д-21	Дозатор води для реактору на 40 л	1	Дозатор води ДВС-12 Виробник: «Сенсор»; Межі дозування: до 100 л; Продуктивність: 1080 л/год; Робочий тиск: 100 до 500 кПа; [41]
Н-22	Насос від реактору на 40 л	1	Peristaltic pump BH3-V 100-1 Виробник: «ETATRON D.S.»; Потужність: 100 л/год; Робочий тиск: 1,5 бар; Габарити, мм: 9,6х15,9х28. [45]
ІФ-23	Індивідуальний фільтр	1	Аерозольний фільтр ФАП-200 Виробник: «NEW FILTER»; Продуктивність: 200 м3/год; Робочий тиск: 300 Па; Ефективність очистки: 99,999% [47]
Ф-24	Ферментер об’ємом 10 $м^3$	1	Ферментер 10 $м^3$ Виробник: «Qingdao Innovaa Bio-Meditech Co., Ltd»; Матеріал: нержавіюча сталь SUS 316L; Оснащений сорочкою, барботером, датчика pH, кисню, тиску, температури; Частота обертів: 500 об/хв; Потужність приводу: 1,5-55 кВт; Габарити, мм: 2200х2600. [28]

Продовження таблиці 5.1

ВД-25	Ваговий дозатор для ферментеру	1	Дозатор ваговий ФС-75+ Виробник: «ТехноМашСтрой»; Об’єм накопичувального бункера: 400 кг; Діапазон зважування: до 50 кг. Габарити, мм: 1160х730х2725. [46]
Д-26	Дозатор води для ферментеру	1	Дозатор води ДВС-12 Виробник: «Сенсор»; Межі дозування: до 100 л; Продуктивність: 1080 л/год; Робочий тиск: 100 до 500 кПа; [41]
Р-27	Реактор об’ємом 310 л для приготування композиції Б	1	Хімічний реактор 310 літрів із водяною сорочкою Виробник: «STS Group»; Матеріал: нержавіюча сталь 316L; Оснащений сорочкою, датчиками pH, тиску, температури. Частота обертів: до 3000 об/хв; Потужність приводу: 21 кВт; Габарити, мм: 1750х2200х1960. [47]
ВД-28	Ваговий дозатор для реактору на 250 л	1	Дозатор ваговий ФС-75+ Виробник: «ТехноМашСтрой»; Об’єм накопичувального бункера: 400 кг; Діапазон зважування: до 50 кг. Габарити, мм: 1160х730х2725. [46]

Продовження таблиці 5.1

Д-29	Дозатор води для реактору на 250 л	1	Дозатор води ДВС-12 Виробник: «Сенсор»; Межі дозування: до 100 л; Продуктивність: 1080 л/год; Робочий тиск: 100 до 500 кПа; [41]
Н-30	Насос від реактору на 250 л	1	Насос дозуючий SEKO MS1C165C51C4000 Виробник: «SEKO S.P.A.»; Продуктивність: 500 л/год; Робочий тиск: 3 бар; Потужність: 0,37 кВт. [48]
Р-31	Реактор об’ємом 15 л для приготування запасного розчину	1	Реактор РСМ-15 Виробник: «КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА»; Матеріал: нержавіюча сталь 316L; Оснащений сорочкою, датчиками pH, тиску, температури. Частота обертів: до 375 об/хв; Потужність приводу: 0,25-0,75 кВт; Габарити, мм: 300х350. [49]
ВД-32	Ваговий дозатор для реактору на 15 л	1	Дозатор ваговий напівавтоматичний «Норма-С» Виробник: «АГРО-СІМО-МАШБУД»; Кількість доз: 500 доз/год; Межі дозування: 5-50 кг; Габарити, мм: 990х680х660. [40]

Продовження таблиці 5.1

Д-33	Дозатор води для реактору на 15 л	1	Дозатор води ДВС-12 Виробник: «Сенсор»; Межі дозування: до 100 л; Продуктивність: 1080 л/год; Робочий тиск: 100 до 500 кПа; [41]
Н-34	Насос від реактору на 15 л	1	Peristaltic pump BH3-V 100-1 Виробник: «ETATRON D.S.»; Потужність: 100 л/год; Робочий тиск: 1,5 бар; Габарити, мм: 9,6х15,9х28. [45]
УФ-35	Фільтруюча установка для здійснення стерилізуючої фільтрації	1	Ultrafiltration (UF) Membrane & Modules JXUFA200 Виробник: «JX»; Діаметр пор: 0,2 мкм; Габарити, мм: 200х1415. [50]
Н-36	Насос від фільтруючої установки	1	Peristaltic pump BH3-V 100-1 Виробник: «ETATRON D.S.»; Потужність: 100 л/год; Робочий тиск: 1,5 бар; Габарити, мм: 9,6х15,9х28. [45]

Завершення таблиці 5.1

Р-37	Реактор для приготування 6% розчину H2SO4	1	Скляний реактор із сорочкою s212 об'єм 10 літрів Виробник: ТОВ «Титан Технікс» Матеріал: боросилікатне скло 3.3. Оснащений сорочкою, датчиками pH, тиску, температури. [51]
Р-38	Реактор для приготування 6% розчину NaOH	1	Скляний реактор із сорочкою s212 об'єм 10 літрів Виробник: ТОВ «Титан Технікс» Матеріал: боросилікатне скло 3.3. Оснащений сорочкою, датчиками pH, тиску, температури. [51]

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема синтезу триптофану культивуванням *Corynebacterium glutamicum* KY9218 передбачає допоміжні роботи (підготовку аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес – отримання посівного матеріалу та біосинтез триптофану.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою повітрозабірника на висоті 30 м.

ДР 1.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

Попередня очистка здійснюється фільтрами грубого очищення, які затримують на поверхні волокна частинки та пил з ефективністю Е=90%.

ДР 1.3. Компресіонування повітря

Повітря стискають у компресорі з підвищенням його температури, та тиском 0,35 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря охолоджують для видалення зайвої вологи, це необхідно для того, щоб вода з повітря не випала на волокнах фільтра, оскільки це створює ризик контамінації. Зайва волога видаляється у ресивері.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря нагрівається у теплообміннику до температури 70-90 ^{o}C.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Повітря потрапляє на головний фільтр для затримання часток розміром >1 мкм, ефективність очищення складає Е=99%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Очищення повітря в індивідуальному фільтрі здійснюється з ефективністю Е=99,999% затримуючи частки розміром > 0,2 мкм.

ДР 2. Приготування та стерилізація титруючих розчинів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину H2SO4 для підкислення поживного середовища

У збірник об'ємом 20 л через об'ємно-ваговий дозатор подають 11,3 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій і вносять 2 л 37 %-го розчину H2SO4.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6 % розчину NaOH для підлужнення поживного середовища

У збірник об'ємом 20 л через об'ємно-ваговий дозатор подають 798 г кристалічного NaOH, вносять 13,3 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення наважки NaOH. Отриманий розчин лугу стерилізують при температурі 131°С, тиску 0,15 МПа, упродовж 50 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 600 мл в колбах на качалці

Вміст компонентів для приготування 600 мл поживного середовища наведено *у табл. 4.1.*

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 мл поживного середовища

Компонент	**Концентрація, г/л**	**Вміст компоненту на 600 мл, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, мл**
Сахароза	60	36	А	486,8408
Кукурудзяний екстракт	66	39,6		

Завершення таблиці 4.1

Вода	-	411,2408		
$(NH_4)_2SO_4$	17	10,2	Б	61,2392
$MgSO_4*7H_2O$	1,7	1,02		
$FeSO_4*7H_2O$	0,013	0,0078		
$MnSO_4*4H_2O$	0,013	0,0078		
$CuSO_4*5H_2O$	0,006	0,0036		
Вода	-	50		
KH_2PO_4	2	1,2	В	51,92
K_2HPO_4	1,2	0,72		
Вода	-	50		
Усього: 600 мл				

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 36 г сахарози та 39,6 г кукурудзяного екстракту, наважки переносять у колбу на 1 л, додають 411, 2408 мл питної води, перемішують. Колбу із розчином закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 30 хв при температурі 112 °С.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують наважки солей: 10,2 г (NH4)2SO4, 1,02 г MgSO4*7H2O. На аналітичних вагах зважують наважки солей: 0,0078 г FeSO4*7H2O, 0,0078 г MnSO4*4H2O, 0,0036 г CuSO4*5H2O.

Наважки переносять у колбу на 100 мл, вносять 50 мл дистильованої води, перемішують. Колбу із розчином солей закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 50 хв при температурі 131 °С.

ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують наважки солей: 1,2 г KH2PO4, 0,72 г K2HPO4. Наважки переносять у колбу на 100 мл, вносять 50 мл дистильованої води, перемішують. Колбу із розчином солей закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 50 хв при температурі 131 °С.

ДР 3.2. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 10 л

На даному етапі необхідно приготувати 6 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в *табл. 4.2.*

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 л поживного середовища

Компонент	**Концентрація, г/л**	**Вміст компоненту на 6 л, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, мл**
Сахароза	60	360	А	5594,408
Кукурудзяний екстракт	66	396		
Вода	-	4812,408		
$(NH_4)_2SO_4$	17	102	Б	312,392
$MgSO_4*7H_2O$	1,7	10,2		
$FeSO_4*7H_2O$	0,013	0,078		
$MnSO_4*4H_2O$	0,013	0,078		
$CuSO_4*5H_2O$	0,006	0,036		
Вода	-	200		
KH_2PO_4	2	12	В	119,2
K_2HPO_4	1,2	7,2		
Вода	-	100		
Усього: 6 000 мл				

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 360 г сахарози та 396 г кукурудзяного екстракту. Наважку переносять у інокулятор об'ємом 10 л, подають 4 812,408 мл питної води через об'ємно-ваговий дозатор. Для кращої розчинності компонентів подають пару у сорочку апарата та вмикають мішалку. Потім здійснюють стерилізацію протягом 30 хв за температури 112 °С.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують наважки солей: 102 г $(NH_4)_2SO_4$, 10,2 г $MgSO_4*7H_2O$, 0,078 г $FeSO_4*7H_2O$, 0,078 г $MnSO_4*4H_2O$, 0,036 г $CuSO_4*5H_2O$. Наважки переносять у колбу на 1 л, додають 200мл питної води, перемішують. Колбу із розчином закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 50 хв при температурі 131 °С.

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують наважки солей 12 г KH2PO4, 7,2 г K2HPO4. Наважки переносять у колбу на 1 л, додають 200мл питної води, перемішують. Колбу із розчином закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 50 хв при температурі 131 °С.

ДР 3.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 100 л

На даному етапі необхідно приготувати 60 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в *табл. 4.3.*

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 60 л поживного середовища

Компонент	**Концентрація, г/л**	**Вміст компоненту на 60 л, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, мл**
Сахароза	60	3600	А	56 484,08
Кукурудзяний екстракт	66	3960		
Вода	-	48924,08		
$(NH_4)_2SO_4$	17	1 020	Б	3515,92
$MgSO_4*7H_2O$	1,7	102		
$FeSO_4*7H_2O$	0,013	0,78		
$MnSO_4*4H_2O$	0,013	0,78		
$CuSO_4*5H_2O$	0,006	0,36		
Вода	-	2 200		
KH_2PO_4	2	120		

Завершення таблиці 4.3

K_2HPO_4	1,2	72		
Усього: 60 000 мл				

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою вагового дозатору зважують 3600 г сахарози та 3960 г кукурудзяного екстракту. Наважку переносять у інокулятор об'ємом 100 л, подають 48,924 л питної води через об'ємно-ваговий дозатор. Для кращої розчинності компонентів подають пару у сорочку апарата та вмикають мішалку. Потім здійснюють стерилізацію протягом 30 хв за температури 112 °С.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують наважки солей: 1020 г $(NH_4)_2SO_4$, 102 г $MgSO_4*7H_2O$, 0,78 г $FeSO_4*7H_2O$, 0,78 г $MnSO_4*4H_2O$, 0,36 г $CuSO_4*5H_2O$120 г, KH2PO4, 72 г K2HPO4. Наважки переносять реактор об'ємом 5 л , подають 2,2 л питної води через об'ємно-ваговий дозатор. Для кращої розчинності компонентів подають пару у сорочку апарата та вмикають мішалку. Значення pH композиції доводять до 4,0-4,5. Здійснюють стерилізацію протягом 50 хв при температурі 131 °С.

ДР 3.4. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 1 м^3

На даному етапі необхідно приготувати 600 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в *табл. 4.4.*

Таблиця 4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 л поживного середовища

Компонент	**Концентрація, г/л**	**Вміст компоненту на 600 л, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, мл**
Сахароза	60	36 000	А	565840,8
Кукурудзяний екстракт	66	39 600		
Вода	-	490240,8		

Завершення таблиці 4.4

$(NH_4)_2SO_4$	17	10 200	Б	34159,2
$MgSO_4*7H_2O$	1,7	1 020		
$FeSO_4*7H_2O$	0,013	7,8		
$MnSO_4*4H_2O$	0,013	7,8		
$CuSO_4*5H_2O$	0,006	3,6		
Вода	-	21 000		
KH_2PO_4	2	1 200		
K_2HPO_4	1,2	720		
Усього: 600 000 мл				

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою вагового дозатору зважують 36 000 г сахарози та 39 600 г кукурудзяного екстракту. Наважку переносять у інокулятор об'ємом 1000 л, подають 49,02408 л питної води через об'ємно-ваговий дозатор. Для кращої розчинності компонентів подають пару у сорочку апарата та вмикають мішалку. Потім здійснюють стерилізацію протягом 30 хв за температури 112 ^oC.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою вагового дозатору зважують наважки солей: 10 200 г $(NH_4)_2SO_4$, 1020 г $MgSO_4*7H_2O$, 7,8 г $FeSO_4*7H_2O$, 7,8 г $MnSO_4*4H_2O$, 3,6 г $CuSO_4*5H_2O$, 1200 г KH2PO4, 720 г K2HPO4. Наважки переносять реактор об'ємом 40 л , подають 21 л питної води через об'ємно-ваговий дозатор. Для кращої розчинності компонентів подають пару у сорочку апарата та вмикають мішалку. Значення pH композиції доводять до 4,0-4,5. Здійснюють стерилізацію протягом 50 хв при температурі 131 ^oC..

ДР 3.5. Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м^3

На даному етапі необхідно приготувати 6 м^3 поживного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в *табл. 4.5.*

Таблиця 4.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 м^3 поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 6000 л, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Сахароза	60	360 000	А	5748408
Кукурудзяний екстракт	66	396 000		
Вода	-	4992408		
$(NH_4)_2SO_4$	17	102 000	Б	251592
$MgSO_4*7H_2O$	1,7	10 200		
$FeSO_4*7H_2O$	0,013	78		
$MnSO_4*4H_2O$	0,013	78		
$CuSO_4*5H_2O$	0,006	36		
Вода	-	120 000		
KH_2PO_4	2	12 000		
K_2HPO_4	1,2	7 200		
Усього: 6 000 000 мл				

ДР 3.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою вагового дозатору зважують 360 000 г сахарози та 396 000 г кукурудзяного екстракту. Наважку переносять у ферментер об'ємом 10 000 л, подають 4 972, 568 л питної води через об'ємно-ваговий дозатор. Для кращої розчинності компонентів подають пару у сорочку апарата та вмикають мішалку. Потім здійснюють стерилізацію протягом 30 хв за температури 112 ºС.

ДР 3.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою вагового дозатору зважують наважки солей: 102 000 г $(NH_4)_2SO_4$, 10 200 г $MgSO_4*7H_2O$, 78 г $FeSO_4*7H_2O$, 78 г $MnSO_4*4H_2O$, 36 г $CuSO_4*5H_2O$, 12 000 г KH2PO4, 7 200 г K2HPO4 . Наважки переносять реактор об'ємом 310 л , подають 120 л питної води через об'ємно-ваговий дозатор. Для кращої розчинності компонентів подають пару у сорочку апарата та вмикають мішалку. Здійснюють стерилізацію протягом 50 хв при температурі 131 ºС.

ДР 3.6. Приготування та фільтруюча стерилізація концентрованого запасного розчину

На аналітичних вагах зважують 2170 г L-тирозину, 4550 г L-фенілаланіну, 1,6 г біотину, 3,1 г тіамін-HCl, наважки переносять у реактор об'ємом 25 л, додають 6 л дистильованої води, перемішують. В асептичних умовах проводять стерилізуючу фільтрацію отриманого розчину через фільтр з розміром пор 0,22 мкм у стерильну колбу на 1 л. Стерильний запасний розчин вносять у поживне середовище в розрахованій кількості.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури Corynebacterium glutamicum KY9218

Колекційну культуру штаму SIIM M276 зберігають у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА) в холодильнику при температурі 2-8ºС, здійснюють пересіви кожні 3-4 місяці. При роботі з колекційною культурою забезпечуються строго асептичні умови.

ТП 4.2. Вирощування Corynebacterium glutamicum KY9218 на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з МПА в асептичних умовах. Вирощують при температурі 30-33ºС упродовж 24 год.

ТП 4.3. Вирощування робочої культури Corynebacterium glutamicum KY9218 на агаризованому середовищі

Мікробіологічною петлею пересівають ізольовані колонії на пробірки зі скошеним сусло-агаром із розрахунку – одна ізольована колонія на окрему пробірку. Вирощування робочої культури здійснюють у пробірках при 30-33ºС впродовж 24 год.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

У колбу об'ємом 1 л із 300 мл розчину композиції А (від *ДР 3.1.1*) в асептичних умовах вносять розчин композиції Б (від *ДР 3.1.2*) та В (від *ДР 3.1.3*) Вносять 0,06 мл запасного розчину (від *ДР 3.6*). Розчин перемішують і розливають по 100 мл в 6 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірки з *C. glutamicum* KY9218 (від *ТП 4.3)* вносять по 10 мл фізіологічного розчину, суспендують та вносять у колби з поживним середовищем. Культивування здійснюють у колбах на качалці (800 об/хв) при 30°С упродовж 24 год. В кінці культивування відбирають пробу для мікробіологічного контролю.

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

В інокулятор об'ємом 10 л, де знаходиться композиція А (від *ДР 3.2.1*), подають композицію Б, В (від *ДР 3.2.2, ДР 3.2.3.*). Вносять 0,6 мл запасного розчину (від *ДР 3.6*). Оптимальним значенням pH для одержання триптофану є 6,1; для доведення pH до необхідного рівня подають 6 % розчин лугу (від *ДР 2.2*) з розрахунку 2 мл розчину на 1 л середовища.

Подають посівний матеріал від *ТП 4.4*, вмикають мішалку, подають аеруюче повітря та пару в сорочку апарата.

Культивування проводять протягом 24 год за температури 30°С, pH 6,1, обертах мішалки 800 об/хв та аерації 1 л/хв. Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби для мікробіологічного контролю.

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

В інокулятор об'ємом 100 л, де знаходиться композиція А (від *ДР 3.3.1*), подають композицію Б (від *ДР 3.3.2*). Вносять 6 мл запасного розчину (від *ДР 3.6*). Оптимальним значенням pH для одержання триптофану є 6,1; для доведення pH до необхідного рівня подають 6 % розчин лугу (від *ДР 2.2*) з розрахунку 2 мл розчину на 1 л середовища.

Подають посівний матеріал від *ТП 4.5*, вмикають мішалку, подають аеруюче повітря та пару в сорочку апарата.

Культивування проводять протягом 24 год за температури 30°С, pH 6,1, обертах мішалки 800 об/хв та аерації 1 л/хв. Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби для мікробіологічного контролю.

ТП 4.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м^3

В інокулятор об'ємом 1000 л, де знаходиться композиція А (від *ДР 3.4.1*), подають композицію Б (від *ДР 3.4.2*). Вносять 60 мл запасного розчину (від ДР 3.6).

Оптимальним значенням pH для одержання триптофану є 6,1; для доведення pH до необхідного рівня подають 6 % розчин лугу (від *ДР 2.2*) з розрахунку 2 мл розчину на 1 л середовища.

Подають посівний матеріал від *ТП 4.6*, вмикають мішалку, подають аеруюче повітря та пару в сорочку апарата.

Культивування проводять протягом 24 год за температури 30°С, pH 6,1, обертах мішалки 800 об/хв та аерації 1 л/хв. Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби для мікробіологічного контролю.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 10 м^3

У ферментер об'ємом 10 м^3, де знаходиться композиція А (від *ДР 3.5.1*), подають композицію Б (від *ДР 3.5.2*). Вносять 600 мл запасного розчину (від *ДР 3.6*). Оптимальним значенням pH для одержання триптофану є 6,1; для доведення pH до необхідного рівня подають 6 % розчин лугу (від *ДР 2.2*) з розрахунку 2 мл розчину на 1 л середовища.

Подають посівний матеріал від *ТП 4.7*, вмикають мішалку, подають аеруюче повітря та пару в сорочку апарата.

Біосинтез проводять протягом 80 год за температури 30°С, pH 6,1, обертах мішалки 800 об/хв та аерації 1 л/хв. Кожні 4-6 годин відбирають проби культуральної рідини для контролю показників росту та синтезу, а також для мікробіологічного контролю. В кінці біосинтезу визначають концентрацію триптофану $С_т$ = 50 г/л.

РОЗДІЛ 7.КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу

Постадійний контроль виробництва триптофану *Corynebacterium glutamicum* KY9218 представлено у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю біосинтезу триптофану *Corynebacterium glutamicum* KY9218

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**
Кх 1.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення поживного середовища	Вміст хлоридної кислоти (г) у готовому 6% розчині; час стерилізації, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Мікробіологічну чистоту розчину соляної кислоти 2) Хімічний контроль	Концентрація розчину має становити 6%; Температура стерилізації – 131 ^{o}C; Тиск під час стерилізації – 0,15; Час стерилізації становить від 40 до 60 хв; Мікроорганізми мають бути відсутні

Продовження таблиці 7.1

Кх, Кт, Км 2.1. Приготування та стерилізація 6 % розчину NaOH для підлужнення поживного середовища	Вміст гідроксиду натрію (г) у готовому 6% розчині; час стерилізації, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Мікробіологічну чистоту розчину гідроксиду натрію 2) Хімічний контроль	Концентрація розчину має становити 6%; Температура стерилізації – 131 °С; Тиск під час стерилізації – 0,15; Час стерилізації становить від 40 до 60 хв; Мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Км 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в колбах на качалці	Композиція А, час стерилізації, pH розчину композиції, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу, pH-метр для контролю pH	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту 2) pH	Температура стерилізації – 112 °С; Тиск під час стерилізації – 0,05; Час стерилізації становить 30 хв; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Км 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в колбах на качалці	Композиція Б, час стерилізації, pH розчину композиції, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу, pH-метр для контролю pH	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту 2) pH	Температура стерилізації – 131 °С; Тиск під час стерилізації – 0,15; Час стерилізації становить від 40 до 60 хв; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні

Продовження таблиці 7.1

Кт, Км 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л	Композиція А, час стерилізації, pH розчину композиції, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу, pH-метр для контролю pH	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту 2) pH	Температура стерилізації – 112 °C; Тиск під час стерилізації – 0,05; Час стерилізації становить 30 хв; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Км 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л	Композиція Б, час стерилізації, pH розчину композиції, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу, pH-метр для контролю pH	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту 2) pH	Температура стерилізації – 131 °C; Тиск під час стерилізації – 0,15; Час стерилізації становить від 40 до 60 хв; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Км 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л	Композиція А, час стерилізації, pH розчину композиції, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу, pH-метр для контролю pH	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту 2) pH	Температура стерилізації – 112 °C; Тиск під час стерилізації – 0,05; Час стерилізації становить 30 хв; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні

Продовження таблиці 7.1

Кт, Км 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л	Композиція Б, час стерилізації, pH розчину композиції, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу, pH-метр для контролю pH	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту 2) pH	Температура стерилізації – 131 °C; Тиск під час стерилізації – 0,15; Час стерилізації становить від 40 до 60 хв; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Км 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 $м^3$	Композиція А, час стерилізації, pH розчину композиції, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу, pH-метр для контролю pH	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту 2) pH	Температура стерилізації – 112 °C; Тиск під час стерилізації – 0,05; Час стерилізації становить 30 хв; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Км 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 $м^3$	Композиція Б, час стерилізації, pH розчину композиції, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу, pH-метр для контролю pH	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту 2) pH	Температура стерилізації – 131 °C; Тиск під час стерилізації – 0,15; Час стерилізації становить від 40 до 60 хв; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні

Продовження таблиці 7.1

Кт, Км 3.5.1. Приготування та стерилізація композиції А для ферментера об'ємом 10 м^3	Композиція А, час стерилізації, pH розчину композиції, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу, pH-метр для контролю pH	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту 2) pH	Температура стерилізації – 112 ^{o}C; Тиск під час стерилізації – 0,05; Час стерилізації становить 30 хв; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Км 3.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б для ферментера об'ємом 10 м^3	Композиція Б, час стерилізації, pH розчину композиції, температура стерилізації, наявність сторонньої мікрофлори	Манометр для визначення тиску, термометр для визначення температури, годинник для фіксування часу, pH-метр для контролю pH	Під час стерилізації перевіряють: 1) Тиск 2) Температуру Після стерилізації перевіряють: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту 2) pH	Температура стерилізації – 131 ^{o}C; Тиск під час стерилізації – 0,15; Час стерилізації становить від 40 до 60 хв; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Км 3.6 Приготування та фільтруюча стерилізація концентрованого запасного розчину	Запасний розчин, розмір пор фільтра	Мікроскоп	Перед стерилізуючою фільтрацією	d = 0,22 мкм
Кт, Км 4.1. Підтримання колекційної культури *Corynebacterium glutamicum* KY9218	Колекційна культура, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник	Мікробіологічний контроль	t=2-8^{o}C, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження таблиці 7.1

Кт, Км 4.2. Вирощування *Corynebacterium glutamicum* KY9218 на агаризованому середовищі	Пересіяна культура *Corynebacterium glutamicum* KY9218, чашки Петрі з МПА, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат для витримування чашок Петрі при відповідній температурі, мікроскоп для здійснення мікробіологічного контролю	Після вирощування культури *Corynebacterium glutamicum* KY9218 проводять мікробіологічний контроль	Температура культивування – 30-33 ºС; Час культивування становить 24 год; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Км 4.3. Вирощування робочої культури *Corynebacterium glutamicum* KY9218 на агаризованому середовищі	Пересіяна культура *Corynebacterium glutamicum* KY9218, пробірки з МПА, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат для витримування чашок Петрі при відповідній температурі, мікроскоп для здійснення мікробіологічного контролю	Після вирощування культури *Corynebacterium glutamicum* KY9218 проводять мікробіологічний контроль	Температура культивування – 30-33 ºС; Час культивування становить 24 год; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Км 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний для контролю температури під час вирощування, годинник для фіксації часу, тахометр для контролю швидкості перемішування, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури у колбах на качалці: 1)Температура; 2)Тиск; 3) Час; 4) Швидкість перемішування; Після вирощування інокуляту *Corynebacterium glutamicum* KY9218 в колбах на качалці: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту	Температура культивування – 30 ºС; Час культивування становить 24 год; pH 6,1; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні

Продовження таблиці 7.1

Кт, Кх, Км 4.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, pH, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний для контролю температури під час вирощування, годинник для фіксації часу, тахометр для контролю швидкості перемішування, pH-датчик, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури у колбах на качалці: 1)Температура; 2)Тиск; 3) Час; 4) Швидкість перемішування; 5) pH; Після вирощування інокуляту *Corynebacterium glutamicum* KY9218 в колбах на качалці: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту	Температура культивування – 30 ºС; Час культивування становить 24 год; pH 6,1; Швидкість перемішування – 800 об/хв; Подача стерильного повітря – 1 л/хв; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Кх, Км 4.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, pH, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний для контролю температури під час вирощування, годинник для фіксації часу, тахометр для контролю швидкості перемішування, pH-датчик, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури у колбах на качалці: 1)Температура; 2)Тиск; 3) Час; 4) Швидкість перемішування; 5) pH; Після вирощування інокуляту *Corynebacterium glutamicum* KY9218 в колбах на качалці: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту	Температура культивування – 30 ºС; Час культивування становить 24 год; pH 6,1; Швидкість перемішування – 800 об/хв; Подача стерильного повітря – 1 л/хв; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні

Завершення таблиці 7.1

Кт, Кх, Км 4.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м^3	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, pH, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний для контролю температури під час вирощування, годинник для фіксації часу, тахометр для контролю швидкості перемішування, pH-датчик, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури у колбах на качалці: 1)Температура; 2)Тиск; 3) Час; 4) Швидкість перемішування; 5) pH; Після вирощування інокуляту *Corynebacterium glutamicum* KY9218 в колбах на качалці: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту	Температура культивування – 30 ºС; Час культивування становить 24 год; pH 6,1; Швидкість перемішування – 800 об/хв; Подача стерильного повітря – 1 л/хв; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні
Кт, Кх, Км 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м^3	Культуральна рідина, температура, pH, тривалість культивування, концентрація триптофану, мікробіологічна чистота	Термометр технічний для контролю температури під час вирощування, годинник для фіксації часу, тахометр для контролю швидкості перемішування, pH-датчик, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури у колбах на качалці: 1)Температура; 2)Тиск; 3) Час; 4) Швидкість перемішування; 5) pH; Після вирощування інокуляту *Corynebacterium glutamicum* KY9218 в колбах на качалці: 1) Відсутність сторонніх мікроорганізмів, мають бути присутні тільки клітини продуценту	Температура культивування – 30 ºС; Час культивування становить 24 год; pH 6,1; Швидкість перемішування – 800 об/хв; Подача стерильного повітря – 1 л/хв; Сторонні мікроорганізми мають бути відсутні

Протягом культивування кожні 4-6 годин відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю визначення концентрації біомаси та цільового продукту – триптофану; джерел вуглецю (сахароза) та азоту (кукурудзяний екстракт, сульфат амонію).

7.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом розсіву культури на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з триптон-соєвим агаром (ТСА) або м’ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) – для виявлення дріжджів та грибів [52].

Corynebacterium glutamicum - це грампозитивна бактерія, яка має паличкоподібну форму. Її клітини зазвичай прямі або слабо згорнуті і мають розмір приблизно 2-3 мікрометри. У мазках зазвичай можна спостерігати окремі або парні нерухомі мікроорганізми. Клітинна стінка цих мікроорганізмів складається на 70% з пептидоглікану. *C. glutamicum*, як і інші грампозитивні бактерії, має тейхоєві кислоти. Цитоплазматична мембрана складається з подвійного шару білків з інтегральними білками, які занурені в неї. Периферійні білки розташовані на поверхні мембрани, а мезосоми розвинуті добре.

На м'ясо-пептонному агарі (МПА), після трьох днів висіву, *C. glutamicum* формує блискучі, жовті колонії з рівним краєм. Поверхня колоній гладка, і їх діаметр зазвичай не перевищує 5 мм [53].

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю розподіляють по склу петлею (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2

краплини імерсійного масла. Після роботи ватою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об’єктива [52].

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація цільового продукту

Для визначення триптофану у супернатанті можна використати метод іонообмінної хроматографії, як у роботі [55].

Згідно статті [54], для визначення триптофану використовувалася хроматографічна система Dionex BioLC. У визначенні використовували набір аніонообмінних колонок AminoPac PA10 (2 × 250 мм, P/N 55406, Dionex) із захисним кожухом PA10 (2 × 50 мм, P/N 55407, Dionex). Форма електрохімічної хвилі: +0,13 В від 0,00 до 0,04 с, +0,33 В від 0,05 до 0,21 с, +0,60 В від 0,22 до 0,46 с, +0,33 В від 0,47 до 0,56 с, 1,67 В від 0,57 до 0,58 с, + 0,93 В за 0,59 с і +0,13 В за 0,60 с, використовуючи еталонний режим pH. Струм був інтегрований між 0,21 і 0,56 с.. Елюент являв собою розчин 50мМ NaOH в 1М ацетаті натрію. Триптофан розділяли на наборі колонок AminoPac PA10 зі швидкістю потоку 0,35 мл/хв і температурою колонки 40 ºС. Тривалість визначення триптофану становила 12 хв.

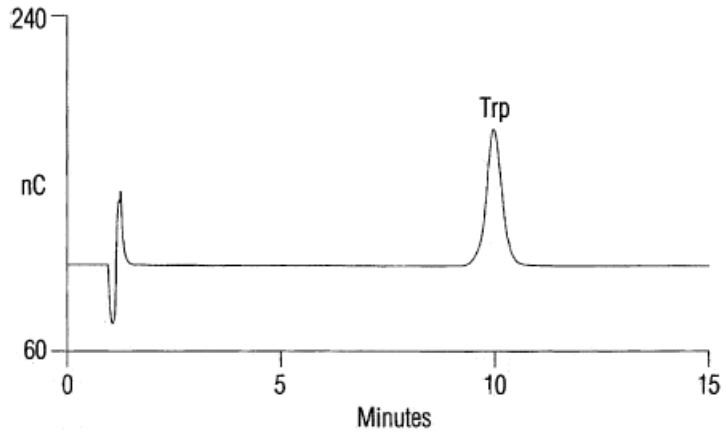

Рис. 5.2. Хроматограма розділення триптофану за допомогою колонки AminoPac PA10.

Представлений метод швидко визначає триптофан у клітинних культурах шляхом прямого виявлення після високоефективного аніонообмінного розділення. Пряме виявлення мінімізує підготовку зразка та дозволяє аналітику оптимізувати

умови гідролізу, не турбуючись про зміни ефективності дериватизації від зразка до зразка. Цей метод дозволяє безпосередньо контролювати клітинні культури та процеси ферментації, надаючи можливість оптимізувати умови культивування [56].

7.3.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту

Концентрація джерела вуглецю. Відбирали зразки культуральної рідини та центрифугували при 14680 об/хв протягом 20 хв. В отриманому супернатанті визначали кількість сахарози.

Концентрацію сахарози можна визначити за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), як описано у статті [57,58].

Використовували хроматограф, оснащений рефрактометричним детектором 2410. У дослідження використовували колонку Shodex Sugar-Pak 6.5x300 мм, температура була встановлена на рівні 90°C, в якості елюенту використовували високоочищену воду Milli-Q. Кількісне визначення сахарози проводили шляхом порівняння площі піку досліджуваного зразка із площею піку стандарту сахарози в концентрації 1 мг/мл.

Рис. 5.1. Колонка Shodex Sugar-Pak 6.5x300 мм [59]

Концентрація джерела азоту. Концентрацію амонійного азоту визначають фотометричним шляхом із реактивом Несслера [60].

Попередньо готують розчин I, у якому CHg=0,05M (розчиняють у воді 2,2720г йодиду ртуті (II) і 1,6600 г йодиду калію і доводять об'єм розчину до 100см3) і розчин

II, у якому СОН=2М (розчиняють у воді 8,000 г гідроксиду натрію і доводять об'єм розчину до 100 см3). Відбирають певні об'єми одержаних розчинів у відповідності з заявленими співвідношеннями VHg=0,001×25/0,05= 0,5см3, VOH=80 0,5×0,05/2=1,0 см3 і вносять їх у мірну колбу місткістю 25 см3. Після цього вносять при перемішуванні суміш, що складається з 20 см3 розчину хлориду амонію з концентрацією 1,25 мкг NH4/см3 і 0,5 см3 50%-го розчину тартрату калію/ натрію, додають воду до мітки і через 10 хв вимірюють оптичну густину при довжині хвилі 440 нм і при 600 нм в кюветі з товщиною шару 5 см. Концентрацію NH4+ визначають порівнянням зі значеннями для стандартного розчину. Відносна похибка визначення становить 2% [60].

Також джерелом азоту є кукурудзяний екстракт, його визначали методом К'єльдаля [55]. Визначення загального азоту за методом К'єльдаля проходить у три етапи: мінералізація (розкладання) зразка, нейтралізація кислоти концентрованим лугом з наступною перегонкою (дистиляцією) водяною парою, титруванням перегнаного дистиляту розчином кислоти або лугу відомої концентрації (титрантом). Мінералізацію (розкладання) зразка проводять за температури 44–440 °С при наявності концентрованої сірчаної кислоти і каталізатора. Азот (N) із зразка у вигляді аміаку, зв'язується з сірчаною кислотою з утворенням сульфату амонію (NH4)2 SO4. Мінералізат охолоджують, а потім розбавляють водою і нейтралізують концентрованим натрієвим лугом, в результаті чого утворюється гідроокис амонію:

NH4OH((NH4)2SO4 + 2NaOH= 2NH4OH+Na2SO3

Це нестійка сполука, яка розкладається на аміак і воду при нагріванні водяною парою. Наступний етап – перегонка (дистиляція) водяною парою. При цьому аміак разом з парою попадає в прийомну колбу, де аміак зв'язується із розчином борної кислоти. Потім дистилят титрують розчином сірчаної кислоти. За кількістю реагенту, який був витрачений на титрування зв'язаного аміаку, визначають вміст загального білка.

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місцях емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Аналіз рідких відходів. Проаналізувавши технологічну схему, можна визначити, що рідкі відходи являють собою відпрацьовані мийні засоби та дезінфектанти. Також рідким відходом є культуральна рідина після вирощування клітин продуцента триптофану. Культуральна рідина може містити такі речовини як уламки клітин, амінокислотні залишки, залишки сахарози, солей та органічних кислот.

Аналіз газоподібних відходів. *Corynebacterium glutamicum* – це грампозитивна та факультативно анаеробна бактерія, широко використовується для промислового виробництва амінокислот, таких як L-глутамат і L-лізин. Проте *C. glutamicum* росте і виробляє амінокислоти саме в аеробних умовах.

З огляду на це, газоподібними відходами є відпрацьоване повітря зі стадій вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу триптофану.

Аналіз твердих відходів. Тверді відходи, що утворюватимуться на підприємстві, являють собою пакувальний матеріал, а саме пластик, поліетилен, картон, папір, відпрацьовані контейнери і тд, відпрацьовані лабораторні розхідні матеріали (фільтри, піпетки, скляний посуд), а також біомаса після проведення біосинтезів. Згідно нормативної бази України, підприємства укладають договори на аутсорсингове знешкодження твердих відходів. Такі підприємства мають відповідну ліцензію на провадження подібної діяльності

8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Знешкодження фармацевтичних відходів відбувається в кілька етапів [61]:

1. Прийняття рішення про необхідність знешкодження фармацевтичних відходів.

2. Узгодження порядку знищення відходів з відповідними державними органами.

3. Планування витрат на фінансування експертизи, кадрів, витрат часу, площ, обладнання та методів знищення відходів.

4. Сортування ЛЗ за окремими категоріями, які вимагають різних методів знешкодження.

5. Знешкодження фармацевтичних відходів [61].

Так, в літературі представлено винахід, що стосується біологічного очищення стічних вод і може бути використаний для очистки промислових стічних вод [62].

В основу даної установки поставлено задачу створення ефективної глибокої біологічної очистки стічних вод в умовах їх критичної нерівномірності потрапляння на установку, та із забезпеченням її безперервного функціонування автономно, в умовах нестабільного електропостачання.

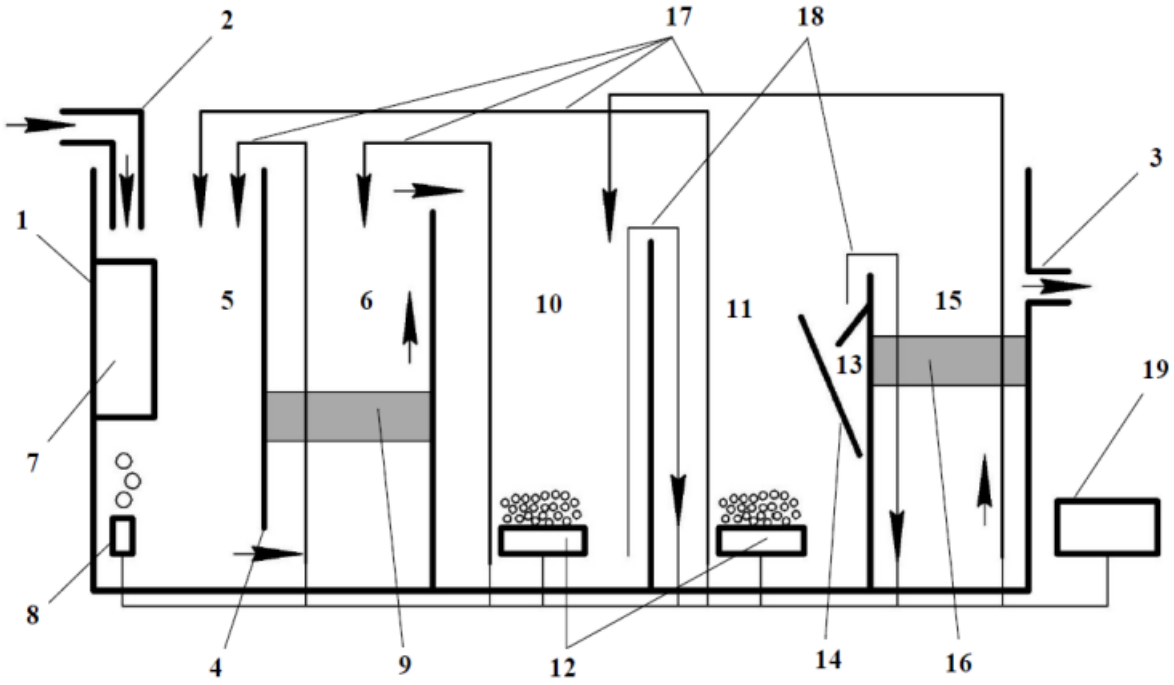

Рис. 2.1. Установка для біологічної очистки стічних вод [62].

Локальна установка для біологічної очистки стічних вод, що містить корпус 1 із каналом підведення 2 стічних вод, каналом відведення 3 очищеної рідини та послідовно розміщеними у вигляді переливного каскаду блоками анаеробного біореактора, аеробного біореактора, біореактора доочищення.

Блок анаеробного біореактора виконаний у вигляді двох гідравлічно з'єднаних, за допомогою придонного каналу 4, камер 5, 6. В одній із камер 5 встановлено корзину-уловлювач 7 для відокремлення нерозчинних відходів та великобульбашковий аератор 8 для подрібнення крупних розчинних відходів. Інша камера 6 виконана із носієм прикріпленої мікрофлори 9, наприклад, у вигляді сітчастого біологічного завантаження.

Блок аеробного біореактора виконаний із послідовно розміщених принаймні двох камер 10, 11 із аераторами 12. При цьому в оптимальному виконанні установки, в камерах 10,11 блока аеробного біореактора використані SBR- реактори. В цьому випадку останньою, при послідовному розміщенні камер є камера 11. Тому ця камера 11 виконана із зоною попереднього відстоювання 13, обмеженою щонайменше одним похилим ребром 14. Блок біореактора доочищення 15 забезпечений носіями 16

прикріпленої мікрофлори та каналом відведення 3 очищеної рідини. Установка забезпечена пристроями 17 рециркуляції активного мулу між камерами блоків анаеробного біореактора, аеробного біореактора та біореактора доочищення 15. Крім того, установка додатково містить примусові засоби 18 послідовної подачі рідини від камери до камери блока аеробного біореактора, та від останньої камери 13 блока аеробного біореактора до блока біореактора доочищення 15. Як пристрій рециркуляції активного мулу та примусовий засіб подачі води використаний ерліфт.

Установка забезпечена програмно-апаратним модулем 19, який за часовим циклом керує усіма режимами та процесами роботи шляхом вмикання або вимикання компресора, аераторів 8, 12, пристроїв перекачування рідини 17, 18, і не вимагає додаткового втручання з боку обслуговуючого персоналу або споживача.

Послідовне застосування принаймні двох аеробних реакторів забезпечує процес якісної глибокої біологічної очистки стічних вод. А виконання анаеробного біореактора, відповідно до винаходу, дозволить забезпечити постійне перемішування рідини (суміші активного мулу і стічних вод) при надходженні різних по своєму складу стічних вод.

При цьому в анаеробному біореакторі відбувається постійне усереднення стічних вод, їх подрібнення великобульбашковим аератором та попередня очистка з використанням носіїв прикріпленої мікрофлори. Це знижує навантаження на адаптацію активного мулу до нерівномірності по часу і складу стічних вод, що надходять, та нівелює нерівномірність навантаження на активний мул в наступній зоні очищення (аеробному біореакторі).

Крім того, перемішування сприяє постійному перебуванню суміші активного мулу і стічних вод у завислому стані, що мінімізує осад мулу на дно камер. Виконання корпусу у вигляді переливного каскаду дозволить установці працювати як багатосекційний переливної анаеробний септик, що в разі відсутності електроенергії забезпечить очистку стічних вод і видалення очищеної води без ризику затоплення установки в цілому і виносу активного і поверхневого мулу разом зі стічними водами [62].

Крім того, наявність в аеробній камері зони попереднього відстоювання, виключає ризик вимивання активного і поверхневого мулу при різкій або залповій подачі стічних вод [62].

8.2.2. Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів

Гази викидів мікробіологічних виробництв характеризуються наявністю широкого спектру одорантів, присутніх в них в незначних кількостях, але достатніх для відчуття неприємного запаху. Слід зазначити, що на основних технологічних стадіях біотехнологічних виробництв може відбуватися надходження в навколишнє середовище так званого «біологічного чинника», основними джерелами якого є [63]:

• аерозоль газоповітряних викидів від устаткування, ферментації стадій відділення та загущення біомаси, що містить живі клітини;

• аерозоль від сушильних установок, що містить інактивовані клітини;

• аерозоль на стадіях виділення з культуральної рідини екзометаболітів;

• продукти біосинтезу організмів на стадіях їх виділення з біомаси;

• стічні води виробництв, що містять живі, інактивовані клітини та продукти їх метаболізму.

Одоранти представлено продуктами метаболізму культур – продуцентів та супутньої мікрофлори, а також сполуками, які утворюються у процесах біологічної, термічної та окиснювальної деструкції біомаси [63].

Складність проблеми дезодорації газоповітряних викидів обумовлена наступними причинами [64]:

1. Низькою концентрацією одорантів (менш ніж гранично допустима), через що застосовувати рекуперацийні методи дезодорації із вилученням цільового компоненту для подальшого використання стає економічно недоцільно.

2. До складу викидів разом із одорантами можуть входити водяна пара, а також аерозоль у твердій або рідкій фазах, що ускладнює процес очистки.

3. Важко оцінити ефективність дезодорації, оскільки вона в більшості випадків носить суб'єктивний характер (навіть, коли концентрація одоранту менше дозволеного нормативу запах може відчуватися)

Загальна класифікація методів очищення і дезодорації за допомогою мікроорганізмів наведена на рис. 2.2.

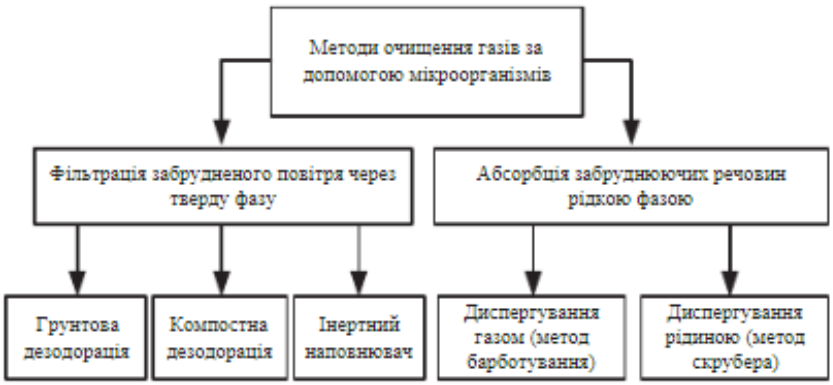

Рис. 2.2. Класифікація методів очищення і дезодорації викидів за допомогою мікроорганізмів [64].

З схеми видно, перш за все методи утилізації компонентів забруднень газів мікроорганізмами підрозділяються на процеси, які відбуваються в твердій і рідкій фазах. Біофільтрація є способом обробки, при якій газ, що очищається, проходить через шар мікроорганізмів, зосереджених в пористому носії твердої фази. Залежно від типу носія реалізуються способи з інертним матеріа-лом (цеолітом, керамзитом і т. д.), грунтом, торфом або використовуються компости. Можуть застосовуватися і інші носії органічного і неорганічного походження належної вологості і температури. Типовим прикладом очищення за допомогою рідкої фази є спосіб барботування газів через рідину з активним мулом.

Інтенсифікація процесу біоочищення безпосередньо пов'язана з використанням чистих культур та їх асоціацій, адаптованих до певних компонентів забруднень [64].

В загальному випадку процес очищення і дезодорації викидів за допомогою мікроорганізмів можна представити як наступну послідовність етапів:

Етап 1. При контакті газів, що містять компоненти забруднюючих речовин або одоранти з абсорбентом або фільтруючим шаром відбувається розчинення і

емульгування цих компонентів у воді (у разі біоабсорбції), а також адсорбція на фільтруючому шарі (у разі біофільтрації).

Етап 2. Розчинені і емульсовані у воді компоненти забруднень віддаляються з рідкої фази і фільтруючого шару за рахунок адсорбції (поглинання) їх мікроорганізмами.

Етап 3. Адсорбовані компоненти забруднень піддаються біохімічному окисненню у живих клітинах (стадія регенерації біологічного сорбенту), стають живленням для мікроорганізмів і служать для їх розмноження.

Розглянуті три процеси є послідовними етапами безперервних синхронних реакції, в результаті яких підтримується ефект очищення і дезодорації викидів від забруднень.

При апаратурній реалізації процесу біологічного очищення газів існує можливість проведення процесу за двома варіантами:

- ✓ етапи 1, 2, 3 можуть бути суміщені в одному апараті;
- ✓ етапи 1 може протікати в окремому масообмінному апараті
- ✓ абсорбері або скрубері, а етапи 2, 3 в апараті типу аеротенк.

Експериментально встановлено, що в діапазоні концентрацій H_2S у воді 15–120 мг/дм^3 при застосуванні такого способу очищення відпрацьованого повітря швидкість окиснення змінювалася від 12 мг/г за годину у області мінімальних концентрацій до максимальних значень рів-них приблизно 40 мг/г за годину. Близькі і аналогічні за характером результати змін отримані і для швидкості окиснення SO_2 у воді. У діапазоні концентрацій NH^3 у воді 2,5–20 мг/дм^3 швидкість окиснення змінювалася від приблизно 1,5 мг/г за годину при мінімальних концентраціях до максимального значення рівного 5 мг/г за годину. В цілому такий метод показує технологічну застосовність біореактору для очищення від H_2S, SO_2 і NH_3 [64].

8.2.3. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

В процесі виробничої діяльності, по мірі модернізації та оновлення основних засобів, освоєння нових видів діяльності у будь-якого суб'єкта господарювання неминуче повинні виникати відходи [65].

Першим етапом є ідентифікація відходів. Ідентифікація відходів – віднесення відходів до певних категорій та класифікаційних груп, виходячи з їх походження, складу, стану, небезпеки для довкілля, здоров'я людини, технологічних можливостей утилізації, знешкодження.

Під час ідентифікації і паспортизації відходів, а також при подальшому заповненні форм статистичної та податкової звітності враховують такі класифікаційні ознаки:

1. Найменування відходу, найменування класифікаційних груп відходів, код (за ДК 005-96);

2. Небезпечні складники відходів (С01-С85 – згідно з додатком В до ДК 005-96);

3. Властивості відходів, що визначають їх небезпечність (Н1-Н15 − згідно з додатком Г до ДК 005-96);

4. Операції щодо поводження з відходами (D1- D16, R1- R14 − згідно з додатком Е до ДК 005-96);

5. Групи небезпечних відходів (0101-1201 − згідно з додатком 2 до Інструкції щодо заповнення форми державного статистичного спостереження N 1-небезпечні відходи або Y1-Y45 згідно із розділом А Жовтого переліку відходів);

6. Клас небезпеки (I – IV клас згідно з ДСанПіН 2.2.7. 029-99);

7. Фізичний (агрегатний) стан відходу (Р, Т, Ш, Г, С, У згідно з додатком Б до ДК 005-96);

8. Хімічний склад (у відсотках);

9. Тип відходу за складом (неорганічний, органічний, змішаний);

10. Фізико-хімічні і теплофізичні властивості та ін [65].

Згідно із статтею 7 Закону України «Про відходи», встановлюються наступні нормативи у сфері поводження з відходами:

- ✓ граничні показники утворення відходів у технологічних процесах;
- ✓ питомі показники утворення відходів, використання та втрат сировини у технологічних процесах;
- ✓ інші нормативи, передбачені законодавством.

Збирають відходи за допомогою їх вилучення з місць (об'єктів) утворення, сортування (за потреби) за заданими ознаками на однорідні складники та зберігають в спеціалізованих місцях (об'єктах) до забезпечення оброблення, перероблення, утилізації або видалення.

Небезпечні відходи (I–III класів небезпеки) в міру накопичення збирають у тару, призначену для кожної категорії (класу) небезпеки, і доставляють у місця (об'єкти) зберігання з дотриманням таких вимог:

1) збирають та зберігають відходи на підставі інструкції і плану заходів, що розробляють підприємства;
2) транспортування відходів від місць утворення до місць збирання, тимчасового накопичування та зберігання повинно унеможливлювати змішування відходів між собою та їх потрапляння в довкілля;
3) надзвичайно небезпечні відходи (I класу) збирають в герметичну, як правило, жорстку, закриту тару (сталеві бочки, контейнери тощо);
4) високонебезпечні відходи (II класу) збирають виходячи з їх фізичного стану в поліетиленові мішки, пакети, бочки і інші види тари, що закривається і запобігає поширенню шкідливих речовин (інгредієнтів) у довкілля;
5) помірно небезпечні відходи (III класу) збирають у тару, яка забезпечує їх локалізацію, зокрема відкриту (якщо немає іншого рішення, узгодженого в установленому порядку), що дає змогу виконувати вантажно-розвантажувальні і транспортні роботи, унеможливлює негативний вплив на здоров'я людей, поширення у довкілля шкідливих речовин.
6) малонебезпечні відходи (IV класу) збирають у відкриту тару або у вигляді конусоподібної купи в умовах, що дають змогу виконувати

вантажнорозвантажувальні і транспортні роботи. Зазначені відходи можуть бути об’єднані з комунальними (побутовими) відходами в місцях розміщення останніх або використані як ізоляційний матеріал, а також для різних робіт у разі планування території без негативних наслідків для довкілля та здоров’я людей [65].

Для збирання і тимчасового накопичування відходів на підприємствах, в цехах, на дільницях повинні бути відведені й обладнані відповідні майданчики, встановлена промаркована тара, відсіки, бункери тощо з чітким позначанням виду відходів, групи, ступеня (класу) небезпеки, марки. Конструкція та розміри тари повинні забезпечувати легку заповнюваність та відвантаження відходів і унеможливлювати їх змішування, а також забруднення і псування відходів, які можна використовувати як вторинну сировину.

За погодження з управлінням охорони навколишнього природного середовища низку відходів підприємство може самостійно утилізувати власноруч (наприклад, деревні відходи), проте специфічні відходи (зокрема, акумулятори, люмінесцентні лампи, мастила, шини) повинні утилізувати лише спеціалізовані підприємства, які мають на те відповідні дозволи.

Якщо підприємство не має власних потужностей з утилізації, оброблення чи видалення відходів, то найбільш доцільним буде укладання договорів на відповідні послуги зі спеціалізованим підприємством, яке має ліцензію на провадження господарської діяльності із здійснення операцій у сфері поводження з небезпечними відходами. Мікробну біомасу утилізують шляхом її спалювання [65].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Застосування незамінних амінокислот при вирощуванні різних видів тварин / М. П. Ніщеменко, М. М. Саморай, Т. Б. Прокопішина та ін. // Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і інституту біології тварин.- 2012. - Вип. 13, № 3-4. - С. 437-443.
2. Шляхи корекції організованого харчування дітей середнього шкільного віку, які мешкають на територіях радіоекологічного контролю (Методичні рекомендації) [Електронний ресурс] Режим доступу: https://nrcrm.gov.ua/downloads/2018/mr2018_7.pdf .
3. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник – К.: Видавництво Ліра-К, 2020. – 258 с.
4. Біологічна хімія / Л. М. Вороніна, В. Ф. Десенко, Н. М. Мадієвська [та ін.]; за ред. проф. Л. М. Вороніної // Х.: Основа: Видавництво НФАУ, 2000. – 608 с.
5. Fernstrom J. D. (2005). Branched-chain amino acids and brain function. The Journal of nutrition, 135(6 Suppl), 1539S–46S. https://doi.org/10.1093/jn/135.6.1539S.
6. Hermann T. (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. Journal of biotechnology, 104(1-3), 155–172. https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00149-4.
7. Біологічні стимулятори. - Науковий журнал. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://bio-s.org.ua/
8. Ikeda, M., & Katsumata, R. (1999). Hyperproduction of tryptophan by Corynebacterium glutamicum with the modified pentose phosphate pathway. Applied and environmental microbiology, 65(6), 2497–2502. https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2497-2502.1999.
9. Ikeda, M., & Katsumata, R. (1992). Metabolic Engineering To Produce Tyrosine or Phenylalanine in a Tryptophan-Producing Corynebacterium glutamicum Strain. Applied and

environmental microbiology, 58(3), 781–785. https://doi.org/10.1128/aem.58.3.781-785.1992.

10. Syoji Azuma; Hiroshi Tsunekawa; Mitsuyasu Okabe; Rokuro Okamoto; Shuichi Aiba (1993). Hyper-production ofl-trytophan via fermentation with crystallization. 39(4-5), 471–476. doi:10.1007/bf00205035.

11. Kurahashi, O., Yokozeki, K., Nakamori, S., Yamanaka, S., & Enei, H. (1987). Production of L-tryptophan by 5-fluorotryptophan and indolmycin resistant mutants of Bacillus subtilis K. Agricultural and biological chemistry, 51(1), 231-235

12. Corynebacterium glutamicum ATCC 13032T [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.actino.jp/DigitalAtlas/subwin.cgi?target=1-2 .

13. Ikeda, Masato; Katsumata, Ryoichi (1995). Tryptophan Production by Transport Mutants of Corynebacterium glutamicum. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59(8), 1600–1602. doi:10.1271/bbb.59.1600.

14. Пат. № US5563052A USA Process for producing L-tryptophan/ Ryoichi Katsumata Masato Ikeda – Опубл. 1996-10-08.

15. "Мікробіологічний журнал ім. В.І. Шмальгаузена" [Електронний ресурс] Режим доступу: http://microbiolj.org.ua/ua/

16. Новий погляд на причини розвитку депресії [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.apteka.ua/article/641980 .

17. Correia, A. S., & Vale, N. (2022). Tryptophan Metabolism in Depression: A Narrative Review with a Focus on Serotonin and Kynurenine Pathways. International journal of molecular sciences, 23(15), 8493. https://doi.org/10.3390/ijms23158493.

18. Панько, Т.В. (2023). Депресія і війна. Здоров'я України. Тематичний номер «Неврологія. Психіатрія. Психотерапія», 1 (64), 10-11.

19. Понад 8,5 мільйона українців мають ризик психічних розладів через війну - ВООЗ [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.ukrinform.ua/rubric-

society/3567887-ponad-85-miljona-ukrainciv-maut-rizik-psihicnih-rozladiv-cerez-vijnu-vooz.html .

20. Арестович уже не рятує. Через війну українці витратили на антидепресанти 500 млн грн за пів року. Хто на цьому заробляє [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://forbes.ua/money/arestovich-vzhe-ne-ryatue-cherez-viynu-ukraintsi-vitratili-na-antideprisanti-500-mln-grn-za-piv-roku-khto-na-tsomu-zaroblyae-07092022-8085 .

21. NOW Foods, L-триптофан, подвійна концентрація, 1000 мг, 60 таблеток [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ua.iherb.com/pr/now-foods-l-tryptophan-double-strength-1-000-mg-60-tablets/18418?gclid=EAIaIQobChMI2qbg6IXcgQMVET4GAB1QpQx0EAQYAyABEgJYDvD_BwE&gclsrc=aw.ds .

22. Ikeda, M., & Katsumata, R. (1999). Hyperproduction of tryptophan by Corynebacterium glutamicum with the modified pentose phosphate pathway. Applied and environmental microbiology, 65(6), 2497–2502. https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2497-2502.1999.

23. Ikeda, M., & Katsumata, R. (1992). Metabolic Engineering To Produce Tyrosine or Phenylalanine in a Tryptophan-Producing Corynebacterium glutamicum Strain. Applied and environmental microbiology, 58(3), 781–785. https://doi.org/10.1128/aem.58.3.781-785.1992.

24. Kegg. Starch and sucrose metabolism - Corynebacterium glutamicum ATCC 13032. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/pathway/cgl00500

25. Kegg. Glycolysis / Gluconeogenesis - Corynebacterium glutamicum ATCC 13032/ [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/pathway/cgl00010

26. Kegg. Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis - Corynebacterium glutamicum ATCC 13032. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.genome.jp/pathway/cgl00400

27. Ikeda, M., & Katsumata, R. (1999). Hyperproduction of tryptophan by Corynebacterium glutamicum with the modified pentose phosphate pathway. Applied and environmental microbiology, 65(6), 2497–2502. https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2497-2502.1999.

28. Qingdao Innovaa Bio-Meditech Co., Ltd. About us. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.innovabiomed.com/innova-bio-meditech.html

29. Qingdao Innovaa Bio-Meditech Co., Ltd. Bioreactor/Fermenter for Cultivated. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.innovabiomed.com/bioreactor-fermenter-for-cultivated-meat.html?gclid=Cj0KCQiAmNeqBhD4ARIsADsYfTeVG6kHL-KgzNQeBfwAwQYFoeoiJOtgGEG0vle6kySvnntBzc7Np6YaAhLbEALw_wcB

30. Повітрозабірник. Компресор повітряний для постійного використання, одноступеневий. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://full-pool.com.ua/kompressor-povitryanyj-dlya-postijnogo-vykorystannya-odnostupenevyj-220-380v-2-2kvt-28kg-265m3-rik

31. Фільтр грубої очистки. Кишенькові фільтри G4 вентиляції від NEW FILTER. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/kishenkovi-filtri-g4-dlya-sistem-ventilyatsiyi-_-vigotovlennya-filtriv.html

32. Компресор. Гвинтовий компресор 110 кВт | KESHIDI KSD-150A-PMS. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://pneumatic-service.com.ua/vintovye-kompressory_catalog/vintovye-kompressory-standartnye/vintovoy-promyshlennyy-kompressor-keshidi-ksd-150a/?sku=761

33. Теплообмінник-охолоджувач. Осушувач рефрижераторний OMD 710. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://tech-market.com.ua/ua/p743584555-osushitel-szhatogo-vozduha.html

34. Ресивер. РГ 14,98 м3. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://rezervuary.com/ua/p791149280-resiver-gazovozdushnyj-1498.html

35. Теплообмінник-нагрівач. Повітрянагрівачі водяні WWN. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://grand-kiev.com.ua/ua/kanalne-obladnannya/kanalne-obladnannya-dlya-pryamokutnih-kanaliv/povitronagrivachi/povitryanagrivachi-vodyani-wwn.html

36. Головний фільтр очистки. Повітряний компактний фільтр тонкого очищення. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://shop.alterair.ua/product/kompaktnyy-filtr-tonkoy-ochistki-f5-f9-eu5-eu9/

37. Індивідуальний фільтр. Аерозольний фільтр ФАП-200. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/aerozol/filtr-aerozolniy-fap-200.html

38. Інокулятор об'ємом 10 л. IKA bioreactor Algaemaster 10. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://profilab24.com/en/laboratory/analytical-devices/ika-photo-bioreactor-algaemaster-10-control

39. Інокулятор об'ємом 100 л. 100L Fermenter BLBIO-100SJ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.china-bioreactor.com/en/product/182.html

40. Ваговий дозатор для інокулятору на 100 л. Дозатор ваговий напівавтоматичний «Норма-С». [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://simo.com.ua/ua/obladnannya/dozator-vesovoi-poluavtomaticheskii-norma-s

41. Дозатор води для інокулятору на 100 л. Дозатор води ДВС-12. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://bon.ua/obyavlenie/dozator-vody-smeshivayushchii-dvs-12-91ce5c

42. Реактор об'ємом 5 л для приготування композиції Б. 5L Double-wall Glass Reactor. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.bio-equip.cn/enshow1equip.asp?equipid=132895

43. Інокулятор об'ємом 1000 л. Industry Bioreactor 1 m3 on order. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.ikaprocess.com/en/Products/Process-plants-cph-18/?gclid=CjwKCAiAu9yqBhBmEiwAHTx5p4pQC39WOddIRMKgBYXhZ20WkcvJeGfzqSRuBRB46IpKOrlj-eM70hoCa2EQAvD_BwE

44. Реактор об’ємом 40 л для приготування композиції Б. VERI Reactor 40 L on order. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.ddpsinc.com/veri-pharma-reactor56425en

45. Насос від реактору на 40 л. Peristaltic pump BH3-V 100-1. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://sealing.com.ua/en/pumps/peristaltic-pumps/peristaltichniy-nasos-bh3-v-100-15-90-260v-santoprene/

46. Ваговий дозатор для ферментеру. Ваговий дозатор ФС-75+ . [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://tmagro.com.ua/ua/p1345417342-vesovoj-dozator.html

47. Реактор об’ємом 250 л для приготування композиції Б. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://stprom.com.ua/ua/p1722213436-himicheskij-reaktor-250.html

48. Насос від реактору на 250 л. Насос дозуючий SEKO MS1C165C51C4000. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://dosingtech.com.ua/uk/product/nasos-dozuyuchij-seko-ms1c165c51c4000-500-l-god-3-bar-pp-fpm/

49. Реактор об’ємом 25 л для приготування композиції Г. Реактор РСМ-25. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.kft2.com.ua/reaktor25.html

50. Фільтруюча установка для здійснення стерилізуючої фільтрації композиції Г. Ultrafiltration (UF) Membrane & Modules JXUFA200. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.jx-purification.com/Ultrafiltration-UF-Membrane-Modules-Used-for-Dring-Water-From-GE-with-PES-PVDF-PAN-pd46595331.html

51. Скляний реактор із сорочкою s212 об'єм 10 літрів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://hms-ua.com/ua/p1445439783-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html

52. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.

53. Ikeda, Masato; Katsumata, Ryoichi (1995). Tryptophan Production by Transport Mutants of Corynebacterium glutamicum. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59(8), 1600–1602. doi:10.1271/bbb.59.1600.

54. Патент 57802. Спосіб визначення амонійного азоту. Калініченко І. О., Демуцька Л. М./ Опубл. 15.07.2003.
55. Г.В. Кушнир, Т.Р. Левицкий, Г.П. Ривак, та ін. Характеристика сучасних методів визначення білку у кормах та рослинному матеріалі. Науковий вісник ЛНУВМБ ім. С.З. Гжицького. -2017. -19(82): 97-100. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://nvlvet.com.ua/index.php/journal/article/view/1344/1343
56. Hanko, V. P., & Rohrer, J. S. (2002). Direct determination of tryptophan using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. Analytical biochemistry, 308(2), 204–209. https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00215-4.
57. Ikeda, Masato; Katsumata, Ryoichi (1995). Tryptophan Production by Transport Mutants of Corynebacterium glutamicum. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59(8), 1600–1602. doi:10.1271/bbb.59.1600.
58. Biagini, G., Faleri, C., Cresti, M., & Cai, G. (2014). Sucrose concentration in the growth medium affects the cell wall composition of tobacco pollen tubes. Plant reproduction, 27(3), 129–144. https://doi.org/10.1007/s00497-014-0246-y.
59. Sugar-Pak I Column, 10 µm, 6.5 mm X 300 mm, 1/pkg [Електронний ресурс] Режим доступу: https://mz-at.de/en/shop/wat085188-sugar-pak-i-column-10-m-6-5-mm-x-300-mm-1-pkg.html.
60. Патент 57802. Спосіб визначення амонійного азоту. Калініченко І. О., Демуцька Л. М./ Опубл. 15.07.2003.
61. Дослідження методів знешкодження та утилізації відходів фармацевтичних підприємств. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/11523/1/332-335.pdf
62. Патент на винахід № 125355. Локальна установка біологічної очистки стічних вод/ Сігорських С.В. Опубл. 10.11.2021.

63. Процеси та апарати біологічної очистки та дезодорації газоповітряних викидів. Монографія / Л. В. Кричковська, О. В. Шестопалов, Г. Ю. Бахарєва, К. В. Слісь. – Харків: НТУ «ХПІ», 2013. – 200 с
64. Аналіз існуючих процесів та апаратів біологічної очистки газових викидів / О. В. Шестопалов, І. В. Пітак
65. Борисовська О.О. Інвентаризація та облік відходів : навч. посібник / Дніпро: Літограф, 2017. – 168 с.

ДОДАТКИ

Концентрація цільового продукту:

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, June 1999, p. 2497–2502 Vol. 65, No. 6
0099-2240/99/$04.00+0
Copyright © 1999, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Hyperproduction of Tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the Modified Pentose Phosphate Pathway

MASATO IKEDA[1]* AND RYOICHI KATSUMATA[2]

Technical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Hofu, Yamaguchi 747-8522,[1] and Laboratory of Animal Microbiology, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Aobaku, Sendai 981-0914,[2] Japan

Received 11 January 1999/Accepted 16 March 1999

A classically derived tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain was recently significantly improved both by plasmid-mediated amplification of the genes for the rate-limiting enzymes in the terminal pathways and by construction of a plasmid stabilization system so that it produced more tryptophan. This engineered strain, KY9218 carrying pKW9901, produced 50 g of tryptophan per liter from sucrose after 80 h in fed-batch cultivation without antibiotic pressure. Analysis of carbon balances showed that at the late stage of the fermentation, tryptophan yield decreased with a concomitant increase in CO_2 yield, suggesting a transition in the distribution of carbon flow from aromatic biosynthesis toward the tricarboxylic acid cycle via glycolysis. To circumvent this transition by increasing the supply of erythrose 4-phosphate, a direct precursor of aromatic biosynthesis, the transketolase gene of *C. glutamicum* was coamplified in the engineered strain by using low- and high-copy-number plasmids which were compatible with the resident plasmid pKW9901. The presence of the gene in low copy numbers contributed to improvement of tryptophan yield, especially at the late stage, and led to accumulation of more tryptophan (57 g/liter) than did its absence, while high-copy-number amplification of the gene resulted in a tryptophan production level even lower than that resulting from the absence of the gene due to reduced growth and sugar consumption. In order to assemble all the cloned genes onto a low-copy-number plasmid, the high-copy-number origin of pKW9901 was replaced with the low-copy-number one, generating low-copy-number plasmid pSW9911, and the transketolase gene was inserted to yield pIK9960. The pSW9911-carrying producer showed almost the same fermentation profiles as the pKW9901 carrier in fed-batch cultivation without antibiotic pressure. Under the same culture conditions, however, the pIK9960 carrier achieved a final tryptophan titer of 58 g/liter, which represented a 15% enhancement over the titers achieved by the pKW9901 and pSW9911 carriers.

L-Tryptophan, one of the limiting essential amino acids required in the diet of pigs and poultry, is the second least abundant of the common amino acids, generally constituting 1% or less of the average protein mass (18). Although L-tryptophan has much commercial potential as a supplement in animal feed, its application is hampered by high production costs; thus, a method for cost-effective production by fermentation is being sought.

We have been pursuing tryptophan production with *Corynebacterium glutamicum*, an amino acid-producing organism which is widely used for the industrial production of various amino acids (15). Recently, we attempted to metabolically engineer an existing tryptophan-producing mutant of *C. glutamicum* and reported the remarkable gains to be made in titer, yield (percent conversion from sugar), and productivity (product formation rate) (7, 11). The significant improvement was achieved both by a rational molecular approach to deregulating and/or overexpressing the terminal pathways leading to both tryptophan and serine, the other substrate of the final reaction in the tryptophan pathway, and by construction of a plasmid stabilization system based on the presence of the serine-biosynthetic gene on the plasmid and the gene's absence from the chromosome. The stable recombinant strain, KY9218 carrying pKW9901, produced 50 g of tryptophan per liter after 80 h in fed-batch fermentor cultivation with antibiotic-free medium. To our knowledge, the titer exceeds any of those that have ever been reported for fermentative production of tryptophan from sugar by microorganisms. However, further improvement seems likely to be achieved if more carbon flux is redirected from central metabolism to the aromatic pathway.

The tryptophan-biosynthetic pathways in the engineered strain have already undergone extensive genetic improvements to efficiently channel carbon toward tryptophan production. Therefore, the principal factor limiting carbon flux toward tryptophan might be the potential of the strain to supply the direct precursors of aromatic biosynthesis, phosphoenolpyruvate (PEP) and erythrose 4-phosphate (E4P), into the aromatic pathway. Carbon flux distribution studies described herein imply that E4P is the first limiting metabolite for tryptophan biosynthesis in the engineered *C. glutamicum*. Thus, further yield improvement will most likely involve engineering the pentose phosphate pathway to increase the availability of E4P.

Studies with glucose 6-phosphate dehydrogenase- or transketolase-defective *C. glutamicum* mutants suggest that E4P can be formed from sugar by two routes, the oxidative pentose phosphate pathway and the nonoxidative pentose phosphate pathway (4, 8), although little information has been available about the contribution of either pathway to E4P synthesis in amino acid-producing *Corynebacterium*. However, supplying carbon for E4P synthesis through the nonoxidative pathway may be more advantageous than supplying it via the oxidative pathway because the latter pathway inevitably involves the release of 1 mol of CO_2, accompanied by oxidation of 1 mol of hexose. Therefore, we undertook a strategy to increase the potential of the producer to supply E4P through the nonoxidative pentose phosphate pathway.

Transketolase is a key enzyme of the nonoxidative pentose

* Corresponding author. Mailing address: Technical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Kyowa-machi, Hofu, Yamaguchi 747-8522, Japan. Phone: 0835-22-2518. Fax: 0835-22-2466. E-mail: m.ikeda@kyowa.co.jp.

Поживне середовище:

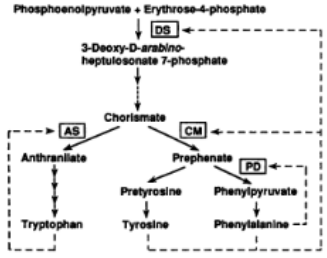

FIG. 1. Pathways and primary regulations of aromatic amino acid biosynthesis in *C. glutamicum*. Broken lines indicate feedback inhibition. AS, anthranilate synthase.

Media. Complete medium BY (14), minimal medium MM (18), and enriched minimal medium MMYE (14) were used for cultivation of *C. glutamicum*. Solid plates were made by the addition of Bacto-Agar (Difco) to 1.6%. RCGA medium (14) was used for regeneration of *C. glutamicum* protoplasts. When required, supplements or antibiotics were added at the following final concentrations: spectinomycin, 400 μg/ml for RCGA plates or 100 μg/ml for BY and MM plates; kanamycin, 200 μg/ml for RCGA plates or 10 μg/ml for BY and MM plates; phenylalanine and tyrosine, 100 μg/ml. TP1 medium used for production in test tubes contained (per liter): glucose, 60 g; KH_2PO_4, 1 g; K_2HPO_4, 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g; $(NH_4)_2SO_4$, 20 g; corn steep liquor, 10 g; $MnSO_4 \cdot 4\sim6H_2O$, 10 mg; D-biotin, 30 μg; and $CaCO_3$, 20 g (pH 7.2). TS1 medium used for second-seed culture in jar fermentation contained (per liter): sucrose, 50 g; KH_2PO_4, 2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $(NH_4)_2SO_4$, 5 g; urea, 0.6 g; corn steep liquor, 40 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg; $MnSO_4 \cdot 4\sim6H_2O$, 10 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 4 mg; L-phenylalanine, 362 mg; L-tyrosine, 266 mg; D-biotin, 100 μg; thiamine-HCl, 5 mg; and $CaCO_3$, 20 g (pH 7.2). TP2 medium used for production in 2-liter jar fermentors contained (per liter): sucrose, 60 g; KH_2PO_4, 2 g; K_2HPO_4, 1.2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.7 g; $(NH_4)_2SO_4$, 17 g; corn steep liquor, 66 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 13 mg; $MnSO_4 \cdot 4\sim6H_2O$, 13 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 6 mg; L-tyrosine, 310 mg; L-phenylalanine, 650 mg; D-biotin, 230 μg; and thiamine-HCl, 450 μg (pH 6.8).

Cultivations for production of amino acids. (i) Test tubes. Cells grown on a BYG (containing 1.0% glucose in medium BY) plate were inoculated into 3 ml of BYG medium containing phenylalanine and tyrosine (200 μg/ml each). After 24 h of cultivation at 30°C, 0.5 ml of the seed culture was transferred to a large test tube containing 5 ml of TP1 medium. Cultivation was carried out acrobically at 30°C for 72 h.

(ii) Two-liter jar fermentors. A 2.4-ml amount of the first-seed culture in BYG medium was inoculated into 120 ml of TS1 medium in a 1-liter flask. After 24 h of cultivation at 30°C on a rotary shaker, the second-seed broth was transferred into a 2-liter jar fermentor containing 550 ml of TP2 medium. After the sugar initially added was consumed, solution containing 44% sucrose was continuously fed until the total amount of sugar supplied in the medium reached 20%. The culture was agitated at 800 rpm and aerated at 1 liter/min at 30°C, and the pH was maintained at 6.1 with NH_4OH. Cultivations of recombinant strains were carried out in medium with spectinomycin (100 μg/ml).

Preparation and manipulation of DNA. Chromosomal DNA was extracted from protoplasts of *C. glutamicum* KY10693 and KY10694 by the method of Saito and Miura (19). The protoplasts were prepared as described previously (14). Plasmid DNA was isolated by the alkaline lysis method (15) and, if necessary, purified by CsCl-ethidium bromide equilibrium density gradient centrifugation (14). DNA digestion and ligation were carried out as described by Maniatis et al. (15). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were obtained from Takara Shuzo Co., Ltd., Kyoto, Japan.

Transformations. The protoplast transformation method used has been described previously (14).

Enzyme assays. Cells were grown at 30°C in 40 ml of MMYE medium, harvested in exponential phase, washed with cold 40 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), and suspended in 5 ml of the same buffer. Then, the cells were continuously sonicated for 15 min on ice with an ultrasonic disruptor (model UR-200P; Tomy Seiko Co., Ltd.), and cellular debris was removed by centrifugation at 10,000 rpm for 20 min at 4°C to obtain the supernatants. The crude extracts were dialyzed against the above potassium phosphate buffer for 6 h and used for the enzyme assay. Protein was determined by the method of Bradford (1) with the Bio-Rad kit. Enzyme activities in crude cell extracts were measured by the method of Sprinavasan and Sprinson (22) for the DS assay and by the method of Cotton and Gibson (2) for the CM and PD assay except that the assays were carried out at 30°C.

Analysis. Cell growth was monitored by measuring the OD_{660} with a spectrophotometer (model 100-20; Hitachi Co., Ltd.). Sugar concentration was measured by an Auto Analyzer (model AA-II; Technicon Co., Ltd.). The aromatic amino acids were analyzed by high-performance liquid chromatography (Shimazu Co., Ltd.) after derivation with *o*-phthalaldehyde.

RESULTS

Cloning of the DS, CM, and PD genes. As a first step to metabolic engineering, we cloned the three biosynthetic genes encoding the first enzyme in the common pathway, DS, and the branch-point enzymes CM and PD. Cloning of the desensitized DS gene from a regulatory mutant, *C. glutamicum* KY10694, was carried out as follows. Chromosomal DNA of strain KY10694 and vector pCG115 were completely digested with *Sal*I, mixed, and treated with T4 DNA ligase. The ligation mixture was used to transform the protoplasts of prototrophic strain *C. glutamicum* KLS4. Transformants were selected on RCGA plates containing spectinomycin (400 μg/ml). Regenerated spectinomycin-resistant colonies were transferred by replica-plating to MM agar plates containing spectinomycin (100 μg/ml) and *p*-fluorophenylalanine (PFP) (800 μg/ml). Twelve PFP-resistant clones were obtained among about 10^5 spectinomycin-resistant transformants. All plasmids purified from these clones were shown to have a common 6.7-kb *Sal*I fragment by restriction enzyme cleavage analysis. Retransformation of KLS4 with pCA1, one of the resulting recombinant plasmids, resulted in the concomitant spectinomycin- and PFP-resistant phenotype. Cells carrying pCA1 showed an eightfold-higher level of DS activity than the plasmidless cells. The overexpressed DS was insensitive to synergistic inhibition by phenylalanine and tyrosine, indicating that the cloned segment had the desensitized DS gene.

To clone the desensitized CM gene from the same strain, KY10694, its chromosomal DNA and vector pCE53 were completely digested with *Sal*I and ligated. As a result of transforming the protoplasts of a CM-deficient phenylalanine

Визначення концентрації джерела вуглецю:

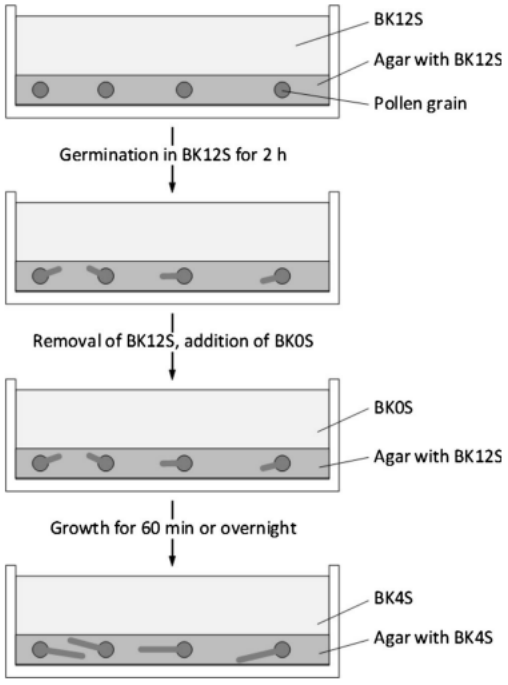

Fig. 1 Schematic diagram of the osmotic treatment carried out on tobacco pollen tubes. Pollen grains were germinated in plate wells containing 1 ml of semisolid agar prepared in the standard germination medium (BK12S). The agar was covered with 2 ml of BK12S medium. After 2 h of germination, the layer of BK12S medium was removed and the agar was washed with BK0S medium, and then coated with 2 ml of BK0S and germination allowed to continue for additional 60 min or overnight. The concentration of sucrose in the agar consequently reached the theoretical value of 4 %

camera. After rehydration, pollen grains were dispersed in 1 ml of semisolid medium consisting of 0.5 % low-melting point agar dissolved in BK medium containing 12 % sucrose (BK12S) (Brewbaker and Kwack 1963). The pollen solution was added to wells. After agar solidification, wells were coated with 2 ml of BK12S for 2 h during which pollen germinated. The growth medium (BK12S) was changed by washing thoroughly the agar surface with 2 ml of sucrose-depleted BK (BK0S) and leaving 2 ml of BK over the agar layer. Consequently, the concentration of sucrose in the agar reached theoretically the concentration of 4 % (BK4S) by dilution (Fig. 1). Pollen tubes were grown under stress conditions for 60 min and then subjected to analysis. When necessary for recovery tests, pollen tubes were osmotically stressed for 60 min with BK4S, followed by 60 min of recovery during which the concentration of sucrose in the agar was gradually restored to 12 % by washing with highly concentrated solutions. For long-term growth assays, the standard medium was washed with BK0S after 2 h of growth thus allowing pollen tubes to grow in BK4S overnight.

To test whether the effects on pollen tube growth were dependent on the depletion of sucrose as an energy source (in addition to be an osmolyte), pollen tubes were grown in a medium containing 4 % sucrose and 4.5 % mannitol in order to mimic the concentration of 12 % sucrose (Zerzour et al. 2009). Osmotic stress was induced by washing repeatedly the agar-containing wells with BK4S in order to dilute the concentration of mannitol to theoretically zero. Times of analysis were the same of the previous test.

Control of sucrose concentration

The concentration of sucrose after replacing the standard BK12S growth medium with BK0S is theoretically 4 %. The reliability of this hypothesis was verified by taking agar samples from the wells every 5 min after replacement of the growth medium and measuring sucrose concentration. We used a HPLC equipped with a refractometric detector 2410 for measuring agar samples appropriately diluted in H_2O. The column used was a Shodex sugar-6.5 × 300 mm PAK, with temperature set at 90 °C and Milli-Q water as eluent. Quantitative determination of sucrose was made by comparing the peak area of samples to that of sucrose standard at a concentration of 1 mg/ml.

Video microscopy

Samples were observed and monitored using an inverted microscope (Nikon) DIAPHOT TMD with a 40X objective. Images of samples were acquired using a Hamamatsu C2400-75i CCD camera (Hamamatsu Photonics) connected to Argus-20 (Hamamatsu) and then to a video acquisition system (Cai et al. 2000). Growing pollen tubes were monitored for the duration of the experiment, and resulting video clips were captured in MPEG-2 format at a resolution of 720 × 576 pixels using the software PCTV Center.

Analysis of video clips and measurement of growth speed

Video clips were analyzed for the growth rate of pollen tubes. MPEG-2 files captured by the PCTV Center software were converted into AVI (MJPEG compression) by the software VirtualDub (http://virtualdub.org/). AVI files were then opened by ImageJ software (freely available from http://www.rsbweb.nih.gov/ij/) and analyzed by the Kymograph plug-in. This plug-in allows researchers to measure the speed of moving objects in a series of images. For each frame in a picture series, we analyzed and

Визначення концентрації джерела азоту:

заважаючого впливу домішок металів у пробі) та реактиву Несслера Через 10хв вимірюють оптичну густину розчину забарвленої сполуки, що утворилась, при довжині хвилі 425нм

Згідно стандарту [ГОСТ 4Г92-82 Вода питьевая Методы определения минеральных азотсодержащих веществ] [3], даний метод повинен забезпечувати нижню межу визначення амонійного азоту у воді на рівні 0,15мг NH^+_4/дм^3 При цьому відносна похибка результатів повинна становити 5% в усьому інтервалі концентрацій (до 3мг NH^+_4/дм^3)

Як показали наші дослідження, застосування торгових препаратів реактиву Несслера, виготовлених згідно одних і тих же технічних умов [Технические условия 6-09-2089-77 Реактив Несслера (калия тетраиодомеркуриат в щелочном растворе)] [4], при аналізі однієї і тієї ж проби води дає різні результати як по чутливості, так і по точності (експериментальні дані наведені в табл 1),

Для з'ясування причин розбіжностей результатів визначення амонійного азоту з різними препаратами реактиву Несслера нами був проведений аналіз двох торгових препаратів А (з етикеткою - УКРХИМЭКСПО Реактив Несслера чда ТУ 6-09-2089-77 Перефасовано ОАО "Киевский завод РИАП") і Б (з етикеткою - 160008 Реактив Несслера Калия тетраиодо-меркуриат(II) в щелочном растворе чда $K_2[HgI_4]KOH(NaOH)$ ТУ 6-09-2089-77 Серия 5 Дата 12-97 Гарантийный срок хранения 1 год) на вміст тетрайодомеркуріату та гідроксиду, оскільки концентрації цих компонентів не вказуються ні на етикетках торгових препаратів, ні в ТУ [4] Встановлено, що препарат А містить 0,0490М K_2HgI_4 і 1,18М KOH, а препарат Б - 0,0613М K_2HgI_4 і 2,15М NaOH Таким чином, у препараті А концентрації тетрайодомеркуріату та гідроксиду менші, ніж в препараті Б відповідно в 1,25 та 1,85 разів

Оскільки при визначенні амонійного азоту за відомим способом додається один і той же об'єм реактиву Несслера, при застосуванні різних препаратів цього реактиву в аналізованій пробі встановлюються різні концентрації тетрайодомеркуріату та гідроксиду І, як випливає з даних табл 1, це призводить до розбіжностей в результатах аналізу, високої похибки визначення та низької чутливості Так, нормована стандартом [3] чутливість визначення з препаратами А і Б не досягається ні для природної, ні для дистильованої води Більше того, препарат А взагалі є непридатним для аналітичного застосування, тому що він не забезпечує повноти переведення визначуваного компонента в забарвлений продукт реакції ні при низьких, ні при високих концентраціях амонійного азоту в пробі, а звідси - висока похибка визначення

У порівнянні з препаратом А препарат Б дає кращі результати, особливо на дистильованій воді Але при переході до високомінералізованої води, якою, наприклад, є коподязна, результати визначення амонійного азоту з препаратом Б також характеризуються високою похибкою, а отже низькою точністю

Таким чином, основними недоліками відомого способу визначення амонійного азоту з реактивом Несслера є низька чутливість, низька точність, велика розбіжність результатів при переході від одного препарату реактиву до іншого

В основу винаходу поставлена задача вдосконалити спосіб визначення амонійного азоту з реактивом Несслера шляхом встановлення оптимальних умов проходження хімічної реакції, які-забезпечать найбільш повне переведення визначуваного компонента в забарвлений продукт реакції, а також оптимальних умов вимірювання аналітичного сигналу, і тим самим - досягнення технічного результату підвищення чутливості та точності визначення амонійного азоту

Для вирішення поставленої задачі запропоновано спосіб визначення амонійного азоту, що включає обробку аналізованої проби сумішшю розчинів тетрайодомеркуріату калію та гідроксиду калію (натрію) з наступним вимірюванням оптичної густини розчину, в якому, згідно винаходу, готують розчини тетрайодомеркуріату калію з концентрацією (0,05-0,2)М, в перерахунку на ртуть(II), і гідроксиду калію або натрію з концентрацією (2-8)М, в перерахунку на гідроксид, і визначають об'єми вказаних розчинів із наступних співвідношень

V_{Hg}=0,001 V_o/C_{Hg} ÷ 0,002 V_o/C_{Hg}

V_{OH} = 80 V_{Hg} C_{Hg}/C_{OH} ÷ 100 V_{Hg} C_{Hg}/C_{OH}, де

V_{Hg} - об'єм розчину тетрайодомеркуріату калію з молярною концентрацією (0,05-0,2)М, в перерахунку на ртуть(II), см^3,

V_{OH} - об'єм розчину гідроксиду калію або натрію з молярною концентрацією (2-8)М, в перерахунку на гідроксид, см^3,

V_o - реакційний об'єм, см^3,

C_{Hg} - молярна концентрація тетрайодомеркуріату калію, в перерахунку на ртуть(II), М,

C_{OH} - молярна концентрація гідроксиду калію або натрію, в перерахунку на гідроксид, М,

причому суміш розчинів готують безпосередньо перед введенням в пробу, а оптичну густину вимірюють при двох значеннях довжини хвилі

Нами експериментальне встановлено, що саме заявлені концентрації та об'єми вказаних розчинів створюють в реакційному об'ємі оптимальні концентрації тетрайодомеркуріату калію (0,001-0,002)М, в перерахунку на ртуть(II), і гідроксиду калію (натрію) (0,08-0,2)М , в перерахунку на гідроксид, що забезпечує високу чутливість і високу точність визначення амонійного азоту

При цьому слід відмітити, що підвищення точності визначення, особливо при низькій концентрації амонійного азоту в пробі, досягається одночасно і оптимізацією умов вимірювання аналітичного сигналу, тобто вимірюванням оптичної густини одержаного розчину при двох значеннях довжини хвилі - в умовах сильного поглинання світла забарвленою сполукою і в умовах, де вона світло практично не поглинає Це дає змогу врахувати поглинання світла випадково забрудненими стінками кювети та домішками завислих речовин у пробі, що не здійснюється відомим способом

Визначення концентрації цільового продукту:

Preparation of animal feed alkaline hydrolysates

Dried Mehaden fishmeal (courtesy of The IAMS, Lewisburg, OH) was suspended in 4 M NaOH to a known concentration ranging from 20 to 25 mg/mL, sealed under argon as described above, and hydrolyzed for 17 h at 110 °C. Hydrolysate was centrifuged for 10 min at 16,000*g* and the supernatant was diluted 60-fold with water. The diluted supernatant (0.33–0.42 mg/mL) was directly injected (25 µL) for analysis.

Nonhydrolyzed samples

Escherichia coli culture (Strain A19, met(+), [delta]tonA; courtesy of Stanford University, Palo Alto, CA) was grown in culture flasks incubated at 37 °C, agitated at 280 rpm, and containing a defined minimal media supplemented with glucose, inorganic salts, amino acids (including Trp), vitamins, metal ions, and buffer (MOPS, pH 7.2). Samples were removed from the culture hourly for up to 6 h and immediately centrifuged at 16,000*g* for 8 min to remove particulates. The supernatant was diluted 65-fold in water and 10 µL was injected to determine Trp. Aliquots of a 50 mg/mL YPD Broth solution, the standard concentration for yeast cultures, were centrifuged at 16,000*g* for 10 min, and the supernatant was diluted 100-fold with water prior to analysis (25-µL injection). The diluted supernatant was also spiked with 10 µM Trp to evaluate recovery from the broth matrix. A 200-mg/mL glucose solution was prepared, diluted 10-fold, and spiked with 10 µM Trp to evaluate Trp recovery from 100 mM glucose.

Chromatography system

The chromatography system used for this work was a Dionex BioLC system configured for *AAA-Direct* [46]. The anion-exchange column set used in this work was the AminoPac PA10 (2 × 250 mm, P/N 55406, Dionex) with its PA10 guard (2 × 50 mm, P/N 55407, Dionex). The electrochemical waveform was +0.13 V from 0.00 to 0.04 s, +0.33 V from 0.05 to 0.21 s, +0.60 V from 0.22 to 0.46 s, +0.33 V from 0.47 to 0.56 s, −1.67 V from 0.57 to 0.58 s, +0.93 V at 0.59 s, and +0.13 V at 0.60 s, using the pH reference mode. Current was integrated between 0.21 and 0.56 s for detection. Combination reference electrodes needed replacement approximately every 6 months. The gold working electrode demonstrated stable response over the term of this study, and no fouling was observed for the samples investigated. The eluent (50 mM NaOH in 1 M sodium acetate) was prepared with the precautions previously described [46]. Trp was separated on an AminoPac PA10 column set using a flow rate of 0.35 mL/min and a column temperature of 40 °C. The run time was 15 min.

Results and discussion

Chromatography (selectivity)

Trp elutes between 40 and 42 min from the AminoPac PA10 column set during a 75-min gradient used to separate all the common amino acids [44]. The eluent concentration when Trp elutes is approximately 40 mM NaOH/700 mM sodium acetate. Therefore, we investigated high concentrations of acetate and NaOH to elute Trp. Isocratic conditions were optimized for retention time, detector response, baseline noise, and convenience. Increases in acetate and NaOH eluent concentrations, flow rate, and column temperature decreased retention times and increased baseline noise. Optimal detector response was observed at 50 mM NaOH. Based on this study, we recommend a 50 mM NaOH/1.0 M sodium acetate eluent with a flow rate of 0.35 mL/min and a column temperature of 40 °C for rapid Trp determination (Fig. 1). The phosphoamino acids were late-eluting compounds using the gradient method, but with this method, they elute much earlier than Trp. Neither common amino acids nor carbohydrates coeluted with Trp. Injecting Trp in 4 M NaOH (10 µL) did not alter Trp's retention time.

Linearity, limits of detection, and precision

We found that there was a linear relationship between the concentrations and the peak area up to 200 µM (10 µL injected, $r_2 = 0.9990$). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined as previously described [47]. The LOD and LOQ were 0.12 ± 0.03 µM (1.2 picomol) and 0.41 ± 0.09 µM (4.1 picomol), respectively, for 10-µL injections. To determine precision we made 144 uninterupted 25-µL full loop injections of 10 µM Trp (80 h). Retention time and area RSDs were 0.6 and 3%, respectively.

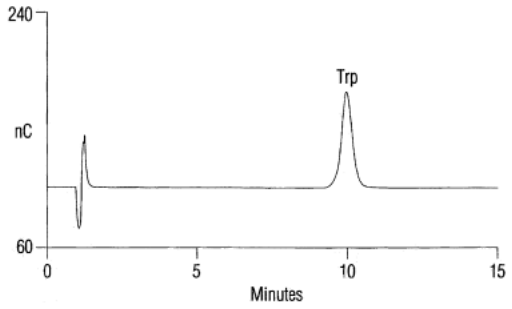

Fig. 1. Separation of Trp (25 µL of 10 µM) using the AminoPac PA10 with a 40 °C column temperature and a 50 mM NaOH/1.0 M sodium acetate eluent flowing at 0.35 mL/min.