

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(номер і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

**З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

Багатиренко Дарії Миколаївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез триптофану *Escherichia coli*

керівник роботи Тетеріна Світлана Миколаївна, к.т.н, доцент

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Escherichia coli*, цільовий продукт – триптофан

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту; РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування; РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту; РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми; РОЗДІЛ 6. Продуктовий розрахунок, матеріальний баланс, розрахунок технологічного обладнання; РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання; РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми; РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва; РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва; список використаної літератури, додатки.

5. Перелік графічного матеріалу Апаратурна схема виробництва триптофану – 2 аркуші формату А1, 1 аркуш формату А3. Технологічна схема виробництва триптофану – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки біосинтезу – 1 аркуш формату А4.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Романов Микола Сергійович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	08.05.2020	17.05.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	23.03.2020-30.03.2020	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	23.03.2020-30.03.2020	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	30.03.2020-7.04.2020	
4	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	7.04.2020-14.04.2020	
5	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	14.04.2020-24.04.2020	
6	РОЗДІЛ 6. Продуктовий розрахунок, матеріальний баланс, розрахунок технологічного обладнання	24.04.2020-1.05.2020	
7	РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання	1.05.2020-8.05.2020	
8	РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми	8.05.2020-17.05.2020	
9	РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	8.05.2020-17.05.2020	
10	РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва	8.05.2020-17.05.2020	
11	Оформлення пояснювальної записки	17.05.2020-22.05.2020	
12	Виконання графічної частини проекту	22.05.2020-27.05.2020	

Здобувач _____ Багатиренко Д.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Тетеріна С.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва триптофану з використанням, генно-інженерного штаму *Escherichia coli* TRTH0709, який за 40 годин культивування здатен синтезує 40,2 г/л цільової амінокислоти[1]. Триптофан являє собою незамінну амінокислоту, яка є унікальною для життєдіяльності людини.

У даному дипломному проекті розраховано техніко-економічне обґрунтування річної потреби амінокислоти для застосування її спортсменами, у складі БАД, а також профілактики інсомній у студентах, і людей похилого віку[2].

Потужність виробництва триптофану становить- 8915 кг за рік.

Технологічна схема виробництва триптофану включає допоміжні роботи, а саме: приготування мийно- дезінфікуючих розчинів, підготовку виробничих приміщень, підготовку обладнання та комунікацій, а також аераційного повітря, приготування та стерилізацію поживних середовищ, і безпосередньо технологічний процес: підготовка посівного матеріалу, виробниче культивування в ферментері об'ємом 6,3 м³, відділення біомаси за допомогою центрифуги з гравітаційним вивантаженням осаду [3], очищення цільової амінокислоти за допомогою іонообмінної сорбції (на колонках з катіонітом та аніонітом)[4], в подальшому кристалізація цільової амінокислоти за допомогою льодяної оцтової кислоти[4], очищення кристалічної суспензії за допомогою ультрафільтрації[4], сушіння триптофану за допомогою вакуум сушки [4] та дробіння кристалічного порошку за допомогою молоткової дробарки[5].

Дипломний проект складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (68 найменувань), апаратурної схеми (3 листа формату А1) та технологічної схеми (3 листа формату А1). Загальний обсяг роботи – 191сторінок, 15 рисунків, 27 таблиці.

Ключові слова: *Escherichia coli* TRTH0709, триптофан, біосинтез, ферментер, виділення, БАД, виробниче культивування, іонообмінна сорбція.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	13
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКАБІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	19
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	19
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	27
2.3. Отримання генно-модифікованого штаму <i>Escherichia coli</i> TRTH0709.....	31
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	33
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	33
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	36
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	40
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	41
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	45
4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	45
4.2. Біосинтез триптофану за використання <i>E.coli</i> TRTH0709.....	47
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	51
5.1. Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу..	51
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	53
5.1.2. Обґрунтування стадії підготовки повітря	54
5.1.3. Вибір миючо-дезінфікуючих засобів.....	56
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	60
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	68
5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту.....	79
РОЗДІЛ 6.ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ	81

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	122
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	135
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	156
9.1. Мікробіологічний контроль.....	156
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	157
9.2.1. Визначення біомаси.....	157
9.3. Визначення вмісту вологи.....	157
9.4. Карта постадійного контролю.....	158
РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	168
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	175
ДОДАТКИ.....	181

ВСТУП

На сьогодні вже досягли значних успіхів методи генної інженерії, перетворюють клітини бактерій, дріжджів і ссавців на “фабрики” для масштабного виробництва будь-якого білка. Це дає можливість детально аналізувати структуру й функції білків і використовувати їх як лікарські засоби[6].

Триптофан – α -аміно- β -індолілпропіонова незамінна амінокислота. В невеликих кількостях міститься у багатьох природних білках. Триптофан - незамінна амінокислота, яка є попередником як серотоніну, так і мелатоніну [6].

Мелатонін - це гормон, який виробляється при шишковидній залозі у тварин, що регулює сон. Серотонін є нейротрансмітером головного мозку, фактором згортання тромбоцитів та нейрогормоном, який знаходиться в органах тіла[7].

Існує ряд умов або захворювань, що характеризуються дефіцитом триптофану. Він приймає участь в утворенні нікотинової кислоти. Порушення обміну триптофану призводять до недоумства, а також можуть слугувати показниками таких захворювань, як туберкульоз, рак, діабет. Недолік триптофану в кормах та їжі може бути причиною функціональних і органічних розладів у тварин та людини. Триптофан належить до азотмісних гетероциклічних ароматичних сполук. Оцінка дефіциту триптофану проводиться шляхом вивчення екскреції метаболітів триптофану в сечі або крові[7].

Кров може бути найбільш чутливим тестом, тому що амінокислота триптофану транспортується унікальним способом. Потреба в триптофані та протеїні знижується з віком. Мінімальна щоденна потреба у дорослих становить 3 мг / кг /день або близько 200 мг на добу [7]

					НУХТ БТЕК 04.02.38			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив.	Багатиренко				Вступ	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт.							1	191
Керівник	Тетеріна С.М					Кафедра БТМ 10		
Н. Контр.								
Зав.	Пирог Т.П							

На сьогодні особливо актуальне питання займають амінокислоти, дослідження їх біосинтезу різними продуцентами, механізми їх дії. Вирішення цих питань має не тільки фундаментальне значення, але й практичне з точки зору раціонального використання амінокислот. Використання в медицині, харчовій індустрії, в фармакології, різноманітних добавках. Але продуктивність штамів – продуцентів можна збільшити у багато разів за допомогою одержання високопродуктивних мутантних форм мікроорганізмів, використовуючи рекомбінантні ДНК, можна отримати штами мікроорганізмів, у яких вихід триптофану буде перевищувати вихідний штам [8].

Перспективи промислового використання триптофану засноване на властивостях даної амінокислоти утворювати нікотинову кислоту та серотонін. Інтерес до триптофану обумовлений корисними властивостями, як для людини так і для тварини[9].

Триптофан необхідний для виробництва вітаміна В₃, сприяє вивільненню гормонів росту і допомагає пригнічувати апетит, сприяє нарощення м'язової маси, допомагає усунути зайву вагу, а також симптоми втоми, лікує безсоння. Проте, наявність в Україні цієї унікальної не замінної амінокислоти дефіцитна [9].

Мета курсового проекту- церозробка ділянки виробництва (апаратурна і технологічна схеми) амінокислоти триптофану *Escherichia coli* *um*.TRTH0709.

Актуальним на сьогодні є розробка вітчизняної технології отримання субстанції триптофану мікробіологічним шляхом з використанням високоефективних генно-інженерних штамів, що значно покращать вихід цільової амінокислоти біологічного агента, яка в подальшому буде використовуватися у складі БАД (біологічно-активних добавок) для спортивного харчування, так як в наш час люди намагаються за собою все більше і більше слідкувати та багато часу приділяти своїй зовнішності, займаються спортом та вживати різноманітні добавки білкової природи для покращення результату, в свій раціон харчування. Цільовий продукт є дієвим і для лікування захворювань центральної нервової системи (інсомній) [10]

Новизною даного проекту є використання для синтезу триптофану штаму *Escherichia coli* TRTH0709[1], який у порівнянні з іншими продуцентами (*Candida*

utilis шт.295[11], *Bacillus subtilis* шт. IFBG МК-1[12], *Corinebacterium glutamicum* шт. Т-3 295[13]) триптофану, здатен продукувати 40,2 г/л амінокислоти, за 40 годин культивування. *Candida utilis* шт.295, *Bacillus subtilis* шт. IFBG МК-1, *Corinebacterium glutamicum* шт. Т-3 295 продукують у тричі менше триптофану (6 г/л, 5,8 г/л, 4 г/л відповідно) за довший час (44години,48 годин,168годин відповідно). А також здійснення кристалізації льодяною оцтовою кислотою для очищення цільової амінокислоти та підбір сучасного обладнання для здійснення ефективного біосинтезу та високої очистки триптофану, з найменшими витратами цільового продукту.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Триптофан – ароматична незамінна амінокислота, яка крім обов'язкової присутності в повноцінних білках і його похідних входять до складу багатьох найважливіших продуктів обміну, що мають циклічну будову (див. *рис.1.1*)[14].

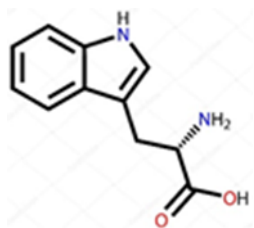


Рис 1.1 Структурна формула триптофану[14].

Молекулярна формула триптофана має вигляд $C_{11}H_{12}N_2O_2$, а молекулярна маса дорівнює 204,228 Да. Температура плавлення і розкладання триптофану однакова, і становить 293 °С. Щодо температури кипіння, то її у амінокислот немає, вони розкладаються, ще до переходу в пароподібний стан [14].

Амінокислота триптофан характеризується не розчинністю у діетиловому ефірі та хлороформі, розчинна в етанолі (78⁰С) та воді (75⁰С). Має вигляд кристалів, безбарвна та гірка на смак [14]. Для ароматичних амінокислот, зокрема, триптофану характерна ксантопротеїнова реакція. Реакція зумовлена нітруванням бензольного кільця циклічних амінокислот та утворенням нітросполук жовтого кольору, який при додаванні аміаку переходить у оранжевий. Жовте забарвлення спостерігається у випадках, коли концентрована азотна кислота потрапляє на шкіру, нігті [14].

Також, саме триптофан обумовлює спектри поглинання білків в ультрафіолетовій області спектра. Зазвичай вважають, що максимум поглинання білків відповідає 280 нм.

					НУХТ БТЕК 04.02.38			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Багатиренко				Розділ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт							12	191
Керівник	Тетеріна С.М					Кафедра БТМ 13		
Н. Контр.								
Зав.Кафедр	Пирог Т.П							

Триптофан існує в оптично активних L- і D-, та рацемічній DL-формі, яка не є оптично активною. Здатен до флюоресценції [15].

Мікробіологічний синтез триптофану

Для виробництва триптофану застосовують одноступінчатий синтез за допомогою бактерійних мутантів ауксотрофів з порушеною регуляцією синтезу амінокислот, так і двоступінчатий синтез, що включає спочатку здобуття попередника триптофану, а потім його ферментативне перетворення на кінцевий продукт - триптофан.

У мутантів із зниженою активністю ферментів, що каталізують перетворення хоризмової кислоти на префенову, спостерігається підвищений синтез амінокислоти триптофану, проте для нормального розвитку цих мутантів

в поживне середовище необхідно додавати дефіцитні амінокислоти - фенілаланін і тирозин - в кількостях, що не викликають регуляторне інгібування ферментів синтезу триптофану [6].

Щодо хімічного синтезу, то амінокислоти (окрім гліцину) мають асиметричний вуглецевий атом і існують в двох дзеркальних ізомерних формах, званих енантіомерами, L- і D-конфігурації [6].

Енантіомери володіють однаковими хімічними властивостями. Їх хімічний синтез завершується зазвичай здобуттям D,L-ізомерів, які досить складний розділити на індивідуальні ізомери хімічною дорогою, що необхідне для подальшого використання амінокислот, оскільки всі молекули білків організму складаються з L- ізомерів[6].

У *Escherichia coli* триптофан синтезується з хоризмату, основного спільного попередника ароматичної амінокислоти триптофану, а також тирозину і фенілаланіну, ефірних сполук[6].

Шлях від еритрозо-4-фосфату до хоризмату відомий як загальний шлях, або шикіматний шлях.

Загальний шлях регулюється на декількох рівнях:

- транскрипційна регуляція (зв'язування триптофану з репресором)
- посттрансляційна регуляція (інгібування антранілсинтази триптофаном)[6].

Біосинтез триптофану є енергетично дорогим процесом через його вимогу до еритрозо-4-фосфату, фосфоенолпірувата і АТФ для біосинтезу хоризмату, а також глутаміну, фосфорибозилпірофосфату і серину для перетворення хоризмата в триптофан [6].

Отже, доцільніше використовувати при виробництві амінокислот біологічний синтез, при якому використовувані мікроорганізми утворюють амінокислоти в біологічно активній L-формі .

Використання триптофану

Харчова промисловість. Природний L-триптофан використовують як харчову дієтичну добавку, зокрема в свій раціон його вживають спортсмени, для бадьорості та витривалості [16].

Триптофан є компонентом харчових білків. Яскравим прикладом є насіння соняшника, воно містить 337 мг триптофану в 100г продукту , це говорить про те, що цей продукт можна використовувати в харчовій промисловості як джерело незамінної амінокислоти, додаючи в різні харчові вироби.[16]

В даний час в тваринництві стоїть проблема збалансованого раціону. Натуральні корми, використовувані в тваринництві, мають не оптимальний амінокислотний склад. Для доведення концентрації амінокислот в раціон до оптимуму потрібне додавання препаратів чистих амінокислот, особливо незамінних, отриманих промисловим способом. Таким чином, L-триптофан додають до корму, які потім споживають тварини, аби запобігти хвороб, які розвиваються через відсутність незамінної амінокислоти [16].

Використання в медицині

Триптофан також використовують як лікарський засіб в медицині для запобігання розвитку хвороб.

Препарат L-триптофан 50 мг/кг (див.рис.1.2) досить ефективний запобігає стресорну напруга ССС і стресорну гіперглікемію. Відновлює рівень серотоніну і кінуреніну в плазмі крові [17].



Рис.1.2 Препарат L-триптофан [17].

У складі комбінованого лікарського засобу: L-триптофан з тіотриазоліном у формі таблеток, вкритих плівковою оболонкою.

Були проведені квантово-хімічні розрахунки, які показали, що незважаючи на можливість утворення між компонентами нестійких водневих зв'язків система L-триптофан, 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат і морфолін являє собою суміш речовин.

Крім того, проведено дослідження, які підтвердили, що L-триптофан та тіотриазолін є сумішшю діючих речовин, які не взаємодіють між собою. Все вищенаведене дозволяє поєднати діючі речовини в одній лікарській формі у формі таблеток з плівковим покриттям. Отримання вологим гранулюванням [18].

Препарати аміносол (див.рис.1.3а) та цитовір (див.рис.1.3б) діючою речовиною яких є триптофан [17].



(а)



(б)

Рис. 1.3 Лікарські засоби з діючою речовиною триптофан аміносол (а) та цитовір (б) [17].

Роль триптофану в організмі людини

Триптофан бере участь у підтриманні азотистої рівноваги в процесах обміну, актах збудження і гальмування, а також трансформації одного виду енергії в іншу. Нікотинова кислота, що утворюється із триптофану, є важливим компонентом в енергетичному обміні. Бере участь у синтезі білків, а також у синтезі ряду біологічних активних речовин: вітаміну В3 (нікотинової кислоти), серотоніну, мелатоніну та ін.

L-Триптофан регулює функцію ендокринного апарату, який запобігає анемії, регулює кров'яний тиск, відповідає за синтез гемоглобіну.

Триптофан як попередник серотоніну, виявляє антидепресивну дію, сприяє зняттю тривожного стану, гіперактивності, нав'язливих станів, сприяє засинанню та нормальному сну. Адсорбується із шлунково-кишкового тракту[19].

Триптофан грає важливу роль, допомагаючи організму виробляти вітамін В3 і гормон мелатонін. Триптофан є амінокислотою, необхідної для синтезу в організмі нікотинової кислоти (РР), гемоглобіну, освіти сироваткових білків. Він істотно впливає на зростання людини: чим менше вік, тим вище потреба в триптофану [19].

Проте, при порушеннях імунної системи, надлишковий прийом триптофану може спровокувати розвиток захворювань. Триптофан посилює седативну дію більшості заспокійливих засобів і антидепресантів. Це може бути небезпечно при

порушеннях серцево-судинної системи та дихання. Не виключені алергічні реакції на триптофан, особливо, у складі конкретних продуктів (пшеничне борошно, яловичина, курятина, сир, гарбузове насіння, молоко, шоколад, картопля, білий рис, банани) [19].

Триптофан бере участь у виправленні помилок процесу подвоєння ДНК. Разом лізином вони утворюють трипептид лізин-триптофан-лізин, який виправляє помилки, котрі виникають при подвоєнні ДНК. Ця властивість триптофану має першорядне значення під час вагітності, та для запобігання утворення ракових клітин [19].

РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Триптофан - амінокислота, необхідна для нормального росту немовлят та балансу азоту у дорослих. Відсутність цієї кислоти або порушення процесів її синтезу призводить до важких захворювань (пелагра, діабет, туберкульоз).

Нині триптофан отримують двома способами:

1) мікробний синтез L-триптофану за допомогою генно-інженерних штамів [20].

2) трансформація попередника амінокислоти за допомогою ферментних систем мікроорганізмів до L-триптофану [20].

На сьогодні, для синтезу триптофану можуть використовувати дріжджі *Candida utilis* та бактерії *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corinebacterium glutamicum* [20].

У таблиці 2.1 наведено порівняльну характеристику продуцентів триптофану. Так, концентрація цільового продукту у *E.coli* um.TRTH0709 є найвищою – 40,2 г/л [1], у порівнянні з *Candida utilis* 295 - 6 г/л [11] та *B. subtilis* IFBG МК-1 – 5,8 г/л [12]. Якщо порівнювати умови культивування продуцентів триптофану, то вирощування *E.coli* TRTH1012 є найменш тривалим процесом (40 годин), *B. subtilis* IFBG МК-1 – 47 годин, а *Candida utilis* 295 та *C. glutamicum* Т – 144 та 168 [13] годин відповідно (див. табл 2.1).

Якщо порівнювати склад поживного середовища, то у *E.coli* воно багатокomпонентне, два середовище, одне – для отримання інокуляту, інше- для біосинтезу, не зважаючи на це, вихід цільового продукту вищий, за інших продуцентів.

					НУХТ БТЕК 04.02.38			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Багатиренко				Розділ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт							18	191
Керівник	Тетеріна.С.М					Кафедра БТМ 19		
Н. Контр.								
Зав.Кафедр	Пирог Т.П							

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів триптофану

Продуцент	Склад поживного середовища (г/л)	Умови культивування	Концентрація цільового продукту (г/л)	Література
<i>E.coli</i> шт. TRTH0709	TF1(середовище для отримання інокуляту, г/л): глюкоза- 50 ; дріжджовий екстракт- 5; KH_2PO_4 -1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -1,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 1,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.001; тіамін-0. 005; 2 мл р-ну мікроелементів (г/л): $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,278; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0.00002; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0.20; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -2.0; H_3BO_3 -0.25; ZnCl_2 -0.15 TF2(середовище для біосинтезу, г/л) глюкоза-8; дріжджовий екстракт-1; KH_2PO_4 -4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -3,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 4,0; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 2,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.15; тіамін-0. 005; 2 мл р-ну мікроелементів вище наведеного складу	$t = 37^\circ \text{C}$; аерації - 1-3 $\text{м}^3 / \text{хв}$; Перемішування 300-900 об /хв; рН -7,0; тривалість культивування – 40 годин;	40,2	[15].
<i>C. utilis</i> шт. 295	м'яса -104; сечовина -5,0; K_2HPO_4 - 0,1; MgSO_4 -0,05; CaCl_2 -0,1;	рН -7,5-8,0; інтенсивна аерація; тривалість культивування -144 годин;	6	[16].
<i>B.subtilis</i> шт. IFBG МК-1	глюкоза-6,0; гідролізат казеїну-0,05; KH_2PO_4 -0,05; K_2HPO_4 -0,05; MgSO_4 -0,05; CaCl_2 -0.03; NaCl -0.005; сечовина-0,5	$t - 35^\circ \text{C}$; рН-7,0; тривалість культивування -48 годин; перемішування 240 об/хв	5,8	[17].
<i>C.glutamic-um</i> шт. Т-3	глюкоза-20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -20; KH_2PO_4 -1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -1; солодовий екстракт-10; крейда-1;	рН-6,8; $t - 30^\circ$; тривалість культивування -168 год ;	4	[18].

Отже, із табл. 2.2 , можна зробити висновок про те, що *E.coli* шт. TRTH0709, найпродуктивніший біологічний агент триптофану.

На основі аналізу складу поживного середовища, розраховуємо їх вартість.(див. табл. 2.2)

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на1 л середовища	Джерело інформації
<i>E.coli</i> шт. TRTH0709	TF1(середовище для інокуляту):			[19].
	глюкоза- 50	60	3	
	дріжджовий екстракт- 5	2000	10	
	KH ₂ PO ₄ -1	47,33	0,047	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O-1,5	11	0,0165	
	(NH ₄) 2SO ₄ - 2	30	0.06	
	C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ · 2H ₂ O- 1,5	27,50	0,04125	
	FeSO ₄ · 7H ₂ O- 0.001	80	0.00008	
	тіамін-0.005	260	0,0013	
	2 мл р-ну мікроелементів (г/л):			[19].
	FeCl ₃ × 6H ₂ O- 0,278	37	0,010	
	NaMoO ₄ ×2H ₂ O-0.00002	95	0,0000019	
	CuSO ₄ ×5H ₂ O-0.20	92	0,0184	
	MnSO ₄ ×H ₂ O-2.0;	115	0,23	
	ZnCl ₂ -0,15	35	0.00525	
	H ₃ BO ₃ -0.25	36	0.009	
	TF2(середовище для біосинтезу):			[19].
	глюкоза-8	60	0,48	
	дріжджовий екстракт-1	2000	2	
	KH ₂ PO ₄ -4	47,33	0,189	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O-3,5	11	0,0385	
	(NH ₄)2SO ₄ - 4,0	30	0,12	
	FeSO ₄ · 7H ₂ O- 0.15	80	0,012	
C6H5O7Na3 · 2H2O- 2,5	1,5	0,00375		
2 мл р-ну мікроелементів		0,272		
Вартість 1 л середовища(TF1)-13,43грн та (TF2)-3,11. Разом-16,54.				

Продовження таблиці 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на1 л середовища	Джерело інформації
<i>Candida utilis</i> шт. 295	Меляса-104;	11	1,144	[19]
	Сечовина-5,0;	14,58	0,0729	[20]
	K ₂ HPO ₄ -0.1;	47,33	0,004733	[19]
	MgSO ₄ -0.05;	11	0,00055	
	CaCl-0.1;	22	0,0022	
	Вартість 1 л середовища-1,22 грн.			
<i>B. subtilis</i> ум. IFBG МК-1	глюкоза-6,0	60	0,36	[7]
	гідролізат казеїну-0,05	390	19,5	
	KH ₂ PO ₄ -0,05;	47,33	2,36	
	K ₂ HPO ₄ -0,05	47,33	2,36	
	MgSO ₄ -0,05;	11	0,00055	
	CaCl ₂ -0.03;	22	0,00066	
	NaCl-0.005	10	0,00005	
	сечовина-0,5	14,58	0,00729	
Вартість 1 л середовища -22,22грн.				
<i>C. glutamicum</i> штТ-3	глюкоза-20	60	0,006	
	(NH ₄) ₂ SO ₄ -20;	30	0,6	
	KH ₂ PO ₄ -1;	47,33	0,047	
	MgSO ₄ *7H ₂ O-1;	11	0,011	
	солодовий екстракт-10;	40	0,4	
	крейда-1;	3,54	0,00354	
Вартість 1 л середовища-1,067грн.				

Закінчення таблиці 2.2

Отже, порівнюючи вартість складу поживних середовищ можна зробити висновок, що продуцент триптофану *E.coli* шт. TRTH0709, не є економічніший за інших продуцентів. Для культивування 1 л середовища *E.coli* шт. TRTH0709, потрібно -16,54грн. Для *Candida utilis* ум.295- 1,22 грн, *B.subtilis* -22,22грн. Для *C.glutamicum* шт.Т-6,5-1,067, є найбільш економічно вигідним, проте, концентрація цільового продукту менша.

Отже, *E.coli* ум. TRTH0709 найменш економічно вигідний продуцент в ціновій політиці поживного середовища (на 1 літр), проте вихід цільового продукту в рази перевищує за інших (понад 7 разів вихід цільової амінокислоти вищий за інших продуцентів на 1 літрі). Тоді, робимо висновок, що доцільно та обґрунтовано обрати *E.coli* ум. TRTH0709 для культивування цільового продукту (див. табл.3.2)

Таблиця 2.3

**Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні
продуцентів триптофану**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища	Концентрація триптофану, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість триптофану утвореного за годину, г/год
<i>E. coli</i> шт. TRTH070 9	16,54	40.2г/л	0,197	40	1,005
<i>C. utilis</i> шт. 295	1,22	6 г/л	0,203	144	0,041
<i>B. subtilis</i> шт. IFBG МК-1	22,22	5,8г/л	0,182	48	0,120
<i>C. glutamicum</i> штТ-3	1,067	4г/л	1,6	168	0,023

Розрахунок складу поживного середовища(г/л):

глюкоза-8;

дріжджовий екстракт-1;

KH_2PO_4 -4 ;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -3,5;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 4,0;

$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 2,5 ;

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.15;

2 мл р-ну мікроелементів (г/л):

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,278;

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0.00002;

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0.20;

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -2.0;

H_3BO_3 -0.25;

ZnCl_2 -0.15

До складу бактеріальної клітини входять такі елементи , до маси сухої речовини : вуглець - 50; кисень - 20; азот - 10-14; водень - 8; фосфор - 3; сірка, калій, натрій-1; кальцій, магній, хлор - 0,5; залізо - 0,2; решта елементів – близько 0,3. Тільки невелика кількість елементів періодичної системи потрібна мікроорганізмам у відносно високих концентраціях. Це десять головних біологічних елементів: вуглець, кисень, водень, азот, сірка, фосфор, калій, магній, кальцій та залізо.

Крім десяти головних біоелементів, мікроорганізмам необхідні мінорні біоелементи, джерелом яких, як правило, є водопровідна вода. Поживні середовища, на яких вирощують мікроорганізм, повинні відповідати таким мінімальним вимогам у них мають бути всі елементи, з яких будується клітина, причому в такій формі, в якій мікроорганізми здатні їх засвоювати[22].

Отже, дане середовище для культивування *E.coli* має всі необхідні елементи для нормально росту клітин.

Концентрація триптофану- 40,2 г/л;

Вихід біомаси- 47 г/л;

Триптофан- $C_{11}H_{12}N_2O_2$;

$Mr(C_{11}H_{12}N_2O_2)$ -204,23г/моль;

Перевірочний розрахунок середовища визначеного складу
Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення Потреба для синтезу триптофану : Як джерело вуглецю для одержання триптофану використовують глюкозу.

204,23 триптофану міститься 132 г вуглецю: $132 \cdot 40,2 / 204,23 = 25,98$ г Карбону. Далі розраховуємо у скільки грам вуглеводів міститься 25,98 г вуглецю. В 25,98 г вуглецю міститься $180 \cdot 25,98 / 72 = 64,95$ г вуглеводів Враховуючи, що при вирощуванні м/о на вуглеводах близько 40 % субстрату окиснюється до CO_2 для одержання енергії, необхідно для конструктивного метаболізму, вміст глюкози у середовищі становитиме $(64,95 \cdot 0,5) + 64,95 = 97,4$ г/л

Потреба для синтезу біомаси:

У біомасі міститься 50% вуглецю, отже вміст вуглецю у 47г біомаси становить $47 \cdot 0,5 = 23,5$ г.

Ця кількість вуглецю міститься у $(23,5 \cdot 180) / 72 = 58,75$ г вуглеводів. Враховуючи 40% втрат субстрату на “холосте окислення”, для одержання 47г/л біомаси у середовище необхідно внести $(58,75 \cdot 0,4) + 58,75 = 82,25$ г/л глюкози.

Отже, загальний вміст глюкози в середовищі, необхідного для синтезу 47 г/л біомаси та 40,2 г/л триптофану

$$82,25 + 97,4 = 179,65 \text{ г/л;}$$

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення
Потреба для синтезу біомаси:

Припустимо, що у біомасі міститься 10% азоту. Таким чином, у 47 г біомаси вміст азоту 4,7 г. У 132 г/моль $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ міститься 28 г азоту, тоді 4,7 г азоту буде міститись у $132 \cdot 4,7 / 28 = 22,157$ г солі.

Для одержання 47г біомаси вміст $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у середовищі повинен становити 22,157 г.

Потреба для синтезу триптофану:

Розраховуємо, скільки Нітрогену (за елементом N) міститься в 40,2г триптофана. Отже, у 203,24 г триптофану міститься 28г Нітрогену, а в 40,2 г $(40,2 \cdot 28) / 204,23 = 5,5$ г Нітрогену.

Розраховуємо, в якій кількості $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ міститься ці кількості азоту. У 132г сульфату амонію міститься 28г азоту, тоді 5,5 азоту буде міститись у $(132 \cdot 5,5) / 28 = 25,92$ г солі.

Розрахунок вмісту фосфору в середовищі.

У біомасі міститься близько 3% фосфору.

Отже, для синтезу 47г/л біомаси вміст фосфору у середовищі повинен становити $47 \cdot 0,03 = 1,41$ г/л. 136 г KH_2PO_4 міститься 31г фосфору, тоді 0,41г фосфору міститься в $(136 \cdot 0,41) / 31 = 1,79$ г

Розрахунок вмісту заліза у середовищі

У біомасі міститься близько 0,2% заліза. Для синтезу 47 г/л біомаси вміст заліза у середовищі повинен становити $47 \cdot 0,002 = 0,094$ г/л. Джерелом заліза

FeSO₄.

Отже, у 132 г FeSO₄ міститься 56г заліза, тоді 0,094г феруму містить $(132 \cdot 0,094) / 56 = 0,255$ г FeSO₄.

Розрахунок інших компонентів середовища

В складі поживного середовища присутній тіамін, який виступає фактором росту. Присутній дріжджовий екстракт, який багатий на нуклеотиди, пептиди, амінокислоти [23].

Отже, характерною ознакою мікробного синтезу є те, що існують різні вимоги до поживних середовищ, використовуваних для одержання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу. Потрібно мати на увазі, що на стадії одержання посівного матеріалу продуцент вирощується здебільше до середини експоненційної фази росту, і ця стадія не передбачає максимальної кількості цільового продукту.

Тому у складі середовищ, використовуваних для одержання інокуляту, концентрація джерел вуглецю і азоту може бути приблизно у два рази нижчою, ніж у складі середовищ для біосинтезу цільового продукту

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

Морфолого-культуральні ознаки

E. coli представлені короткими поліморфними паличками із заокругленими кінцями розміром в середньому: довжина -0,5-1 мкм, і товщиною 0,4-0,6мкм [24]. Спор не утворюють, грамнегативні. Мають перитрихіальне розташування джгутиків (див.рис 2.3.)[25], але зустрічаються нерухомі штами. Деякі штами утворюють капсулу, а деякі – пілі [24].



Рис. 2.2 *Escherichia coli*[25]

Бактерії добре ростуть на простих поживних середовищах: м'ясопептонному бульйоні (МПБ), м'ясопептонному агарі (МПА). На МПБ дають помітний ріст зі значним помутнінням середовища; осад невеликий, сіруватого кольору, легко руйнується (див.рис 2.3)[25]. Утворюють пристінкове кільце, плівки на поверхні бульйону зазвичай відсутня[24].



Рис.2.3 Зовнішній вигляд колоній *Escherichia coli* на середовищі МПБ[25].

На МПА колонії круглі, діаметр колоній 1,2- 2,5 мм, прозорі з сірувато-голубим відтінком, поверхня колоній гладенька, краї – рівні, структура – однорідна, консистенція – пастоподібна, легко емульгують[24]. (див.рис.2.4)



Рис 2.4 Зовнішній вигляд колоній *Escherichia coli* на середовищі МПА[25]

На диференційно-діагностичних середовищах (Ендо, Левіна) (див.рис.2.5) колонії забарвлені в колір індикатора, що входить до складу середовища. На середовищі Ендо колонії кишкової палички малиново-червоного кольору з металевим блиском, на середовищі Левіна - синьо-фіолетові[24].

Сем. Enterobacteriaceae

E. coli



Ендо



Левина



Плоскирева

Рис 2.5 Зовнішній вигляд колоній *Escherichia coli* на диференційно-діагностичних середовищах [25].

Фізіолого-біохімічні ознаки

Кишкові палички добре зберігаються в зовнішньому середовищі. По відношенню до температури – мезофіл, тобто мікроорганізм для якого температурний оптимум в межах 20-42 °С. Оптимальна температура для росту

E.coli є 37°C. Ця бактерія має широкі температурні межі, тобто є евритермним мікроорганізмом [24]

Факультативні анаероби, добре ростуть на простих поживних середовищах при рН 7,2-7,8 і температурі 37°C, але деякі можуть ділитися при температурі 49 °C.

Ріст може стимулюватись аеробним чи анаеробним диханням ,різними окисниками та відновниками, в т.ч окисненням пірувату, форміата ,водню,амінокислот, а також відновленням кисню, нітрата і т.д. Штами виділені кишечника людини і теплокровних тварин, добре розвиваються при температурі 43-45°C, що використовують при вирощуванні посівів. В анаеробних умовах *E.coli* утворює в якості продукту життєдіяльності лактат, сукцинат, етанол, ацетат і вуглекислий газ. Часто при цьому утворюється молекулярний водень ,який заважає утворенню згаданих вище метаболітів, тому *E.coli* часто зустрічається з мікроорганізмами, які споживають водень – наприклад , із метаногенами чи бактеріями , які відновлюють сульфат [24].

У воді і ґрунті вони місяцями залишаються життєздатними. При температурі 60°C гинуть протягом 15 хв; 1% розчин карболової кислоти і 5% розчин хлораміну вбивають їх через 10-15 хв, а розчин сулеми 1: 1000 - через 2 хв. Найкраще росте в середовищах, де значення рН близьке до нейтрального 6,8 - 7,2 *E.coli* не розріджують желатину, згортають молоко, вуглеводи розщеплюють до кислот і газу, ацетоїн не утворюють, утворюють індол, відновлюють нітрати до нітритів. Мають високу ферментативну активність відносно лактози, глюкози й інших цукрів, а також спиртів. Володіють оксидазною активністю[24].

За типом живлення є хемоорганогетеротроф. Тобто як джерело енергії – хімічне, донор електронів – органічна речовина, а як джерело вуглецю використовує органічні сполуки. Щодо розмноження ,то при клітинному діленні , використовує засів безстатевого розмноження, тому що немає ніякої передачі генетичного матеріалу, бактерія робить свою точну копію. Клітини *E.coli* ділиться шляхом перетяжки так як і клітини інших грам негативних бактерій [24].

Популяція мікроорганізмів *E.coli* не є стійкою до антибіотикотерапії. *E.coli* є дуже невибагливою культурою і не потребує додаткових факторів росту [24].

Таксономічний статус біологічного агента

За фенотиповою систематикою – згідно з першим виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій :

Відділ *Gracilicutes* ;

Клас-*Scotobacteria*

порядок —

Enterobacteriales;

родина- *Enterobacteriaceae*;

під- *Escherichia*;

вид *Escherichia coli*.

Відділ *Gracilicutes* [22].

Сюди належать прокаріоти зі складною (грамнегативного типу) будовою клітинної стінки. Стінки складаються із зовнішньої мембрани, тонкого внутрішнього шару пептидоглікану і додаткових інших компонентів зовні чи між цими двома шарами [22].

Граммнегативні клітини сферичної чи овальної форми, у вигляді прямих чи вигнутих паличок, спіралей, нитчасті; деякі з цих форм можуть бути оточені чохлом або капсулою. Розмножуються бінарним поділом, але для деяких груп характерне брунькування і для деяких організмів (*Pleurocapsales*) — множинний поділ. Міксобактерії можуть утворювати плодові тіла та міксоспори. Ендоспор не утворюють. Багато представників — рухливі (рух за допомогою джгутиків чи ковзанням). Серед представників є фототрофи та нефототрофи (як літотрофи, так і гетеротрофи), аероби, анаероби, факультативні анаероби та мікроаерофіли [22]. Відділ поділяється на три класи:

Частина 5. Факультативно анаеробні граммнегативні палички. Типовим родом родини *Enterobacteriaceae* є рід *Escherichia* (типовий вид — *Escherichia coli* — кишкова паличка). Ця бактерія на сьогоднішній день найбільш досліджена з усіх прокаріотів, її можна назвати "відкритою книгою", оскільки вона є основним об'єктом усіх молекулярно-біологічних, генетичних і біохімічних досліджень. Кишкова паличка є умовно патогенною. У кишках хребетних тварин вона є коменсалом (*коменсалізм* — форма симбіозу мікроорганізмів з макроорганізмом,

за якої мікроорганізм живиться за рахунок макроорганізму, не завдаючи йому ні користі, ні шкоди). Але у певних умовах (ослаблення макроорганізму) вона спричиняє захворювання кишок. Патогенні види кишкової палички викликають колієнтерити у людини. Разом з виділеннями з травного каналу *Escherichia coli* потрапляє в навколишнє середовище — воду, ґрунт, харчові продукти. Її вважають показником фекального забруднення середовища [22].

Згідно з філогенетичною класифікацією, то у другому виданні Бергі наведено історію створення, керівництво з використання, домени прокаріотів, класифікацію прокаріотичних організмів концепцію бактеріального видоутворення, філогенетичну основу і таксономічну структуру для систематики прокаріот.

Друге видання складатиметься з 5 томів. Саме Том 2'' The Proteobacteria '' описує даний біологічний агент.

За філогенетичною систематикою-згідно з другим виданням Керівництва Бергі :

домен *Bactria*;
відділ *Proteobacteria*;
клас *Gammaproteobacteria*;
порядок *Enterobacteriales*;
родина *Enterobacteriaceae*;
рід *Escherichia*;
вид *Escherichia coli* [26].

2.3. Отримання генно-модифікованого штаму *Escherichia coli*

Введення гену у вектор

Вектор — це молекула ДНК, яка здатна переносити в клітину чужий ген і забезпечувати там його розмноження (реплікацію). Вектор може реплікуватися або автономно, або після його інтеграції з геномом [1].

Одночасна експресія генів *ppsA* і *tktA* суттєво підвищила продукцію L-триптофану за допомогою незалежної *ppsA* або *tktA*-гіперекспресії [1]. Ген *ppsA* та *tktA* ампліфікували з ДНК *E. coli* TRTH0709 за допомогою ПЛР, потім клонували у плазміді *pSTV28* та *pEML02* у відповідних сайтах рестрикції.

Незалежні вирази генів *ppsA* та *tktA* призвели до збільшення специфічної активності відповідних ферментів на 2,5 та 3,3 рази, відповідно.

Отримані плазмиди були трансформовані в *E. coli* TRTH0709 шляхом трансформації, тим самим виробляючи штам TRTH1011, TRTH1012 та TRTH1013[1].

I, саме TRTH0709 продукував триптофан найбільше- 40,2 г/л[1].

Спосіб трансформування в клітину

Два гени були введені незалежно або разом у плазмиду pSTV28 та плазмиду pSV-709. Ці одержані плазмиди переносили в клітину *E. coli* TRTH0709, за допомогою трансформації, а не кон'югації, адже немає спеціальних кон'югуючих плазмід [1].

В процесі трансформації підвищується проникність клітинної стінки й рекомбінантна плазміда потрапляє всередину[1].

Відбір трансформантів

Клітини збирали на експоненціальній фазі в середовищі шляхом центрифугування . Потім їх промивали та ресуспендували в 5 мм $MgCl_2$ (pH 7,4) для аналізу генів *Tkt* або *Pp*

глюкоза-50 ;

дріжджовий порошок-;

KH_2PO_4 -1 ;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -1,5 ;

$(NH_4)_2SO_4$ - 2;

$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ - 1,5 ;

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.1;

тіамін-0. 5;

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,15 [1].

Ферментація проводилася при 37 ° С при аерації при 1-3 м³ / хв. рН підтримували при 7,0 шляхом додавання водного аміаку. Ферментація була завершена через 40 год. Здійснювали підтвердження мутантів за допомогою ПЛР ампліфікації[1].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Цільова амінокислота є багатофункціональною, яку застосовують люди похилого віку, яка популярна і у спортсменів, і у студентів, а також, як кормова добавка, яку використовують у тваринному господарстві.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), сьогодні приблизно кожна друга доросла людина планети страждає від тих чи інших порушень сну. Сучасна наука виділяє більш ніж 90 варіантів порушень сну, які можуть представляти серйозну загрозу фізичному і психічному здоров'ю людини[27].

Ризик виникнення вказаного розладу зростає серед людей старшого віку, а також студентів. Нині суспільство, а особливо люди, які навчаються звертають увагу на енергетичні напої, до складу яких входить кофеїн, який являється психостимулятором. Рекламні компанії роблять акцент на їх здатність стимулювати центральну нервову систему, а також, на те, що вони не дають заснути. Внаслідок чого виникає в подальшому інсомнія [27]. Метою фармакологічного процесу терапії є підвищення якості та тривалості сну, покращення функціональності протягом дня та медикаментозне лікування.

Переважну кількість ліків, які призначаються для лікування безсонниці, відпускаються за рецептом, включаючи антидепресанти, проте, застосування таких сильнодіючих засобів може призвести до розладів функціонування організму в цілому[27].

L-триптофан- засіб, який відпускається без рецепту та є натуральним, без побічних ефектів, окрім передозировки та його приймання з іншими антидепресантами одночасно. Вагітним жінкам приймання триптофану не рекомендують [28].

					НУХТ БТЕК 04.02.38			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ. 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літера.	Аркуш	Аркушів
Розробив	Багатиренко						32	191
Консульт.						Кафедра БТМ 33		
Керівник.	Тетеріна С.М							
Н. Контр.								
Зав.Кафедр	Пирог Т.П							

На сьогодні велика кількість людей займається спортом, та вживає в свій раціон спеціальне спортивне харчування, яке допомагає нарощувати м'язи.

L- триптофан , використовують як біологічну добавку в спортивному харчуванні (згадувалося вище) входить в раціон багатьох спортсменів та займає важливу роль, так як його дефіцит здатний викликати прискорений процес руйнування м'язових тканин. При планомірному і достатньому надходженні триптофану в організм відзначається активне утворення білкових з'єднань. Це призводить до збільшення м'язової тканини та забезпечує підвищення працездатності і витривалості, а також повноцінне відновлення сил під час нічного відпочинку[2].

Потрібно пам'ятати, що для повноцінного перетворення цієї амінокислоти необхідна наявність в організмі вітамінів B6 і C[2]. Отже, L- триптофан можна використовувати, і як БАД для спортсменів та як седативний засіб для людей, які страждають на розлади сну[28].

L-триптофан, випускається у різних товарних формах : капсули, таблетки та порошки (див. *табл. 3.4*)

Табл. 3.4

Товарні форми "L-Tryptophan"

Фірма- виробник	Товарна форма	Активність триптофану (кількість діючої речовини)
Jarrow Formulas, Китай	Таблетка	500 мг в (1 табл.)
Ajinomoto, Франція	Порошок	200 мг (в 1 г)
Jarrow Formulas, Китай	Капсула	500 мг (в 1 капс.)

Так як, капсула має м'якішу оболонку та зручнішу форму для проковтування надалі будемо описувати саме цю форму.

За даними статистики на 2000 рік, 20 % дорослих людей потребують лікування пов'язане з порушенням сну [29].

На 2012 рік , ті ж 20 % дорослих людей страждають на інсомнію [30].

Отже, можна зробити висновок, що ситуація з роками не покращується.

Аби, розрахувати статистику людей хворих на безсонницю приймаємо частку 20 % людей, від перепису дорослого населення України на 2019 рік.

На 2019 рік перепис населення дорослих людей становить 36239625 осіб [29], а частка 20 % -7247925 осіб, які страждають на інсомнію.

За даними Міністерства України у справах сім'ї молоді та спорту за даними національного опитування українців 21 % людей старше 16 років – спортсмени [31]. Населення старше 16 років становить – 36239625 осіб [31].

Тобто, частка 21 % спортсменів з перепису населення України старше 16 років становить 7610321,25 осіб в Україні припадає на спортсменів.

Отже, орієнтовна статистика категорій, які є потенційними споживачами триптофану:

- ✓ Спортсмени – 7610321,25 осіб.
- ✓ Люди, хворі на інсомнію - 7247925 осіб.

Способи застосування препарату 'L- Tryptophan' та дози в терапії інсомнії:

Рекомендована доза при терапії безсонниці становить по 1 капсулі двічі на день. Одна капсула має 500 мг діючої речовини триптофана [28].

Курс лікування – 4 тижні. За необхідністю його можна повторити через 10-15 днів. Протягом року курс лікування рекомендується повторити 3 рази (див.табл.3.5) [28].

Способи застосування БАД 'L- Tryptophan' для спортсменів:

В 2004 році в Російській Федерації були переглянуті і запропоновані значення рівня потреби в триптофані, вони коливаються від 0,8-1,2 г , тобто , 1 капсулу 2 рази на день.

Курс профілактики – 1 місяць , амінокислота здатна накопичуватися в організмі спортсмена. Тому, якщо не доодержати добову норму сьогодні, то можливо заповнити запаси на наступний день[28].

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в L- триптофані .

Захворювання (профілактика)	Доза препарат у на добу, мг	Тривалість прийому разом із повторним курсом, днів на рік	Кількість препарат у на 1 людину (в г) за курс	Частка очікуваних споживачів триптофан у , осіб	Загальна кількість препарат у на всіх хворих
Люди, які страждають на інсомнію	1000мг (2капсули)	90 днів	90	7247925	652313,2
Спортсмени	1000(2 капсули)	90 днів	90	7610321,25	684928,9
Разом 13372421,1 кг					

3.2Розрахунок потужності виробництва

Триптофан на території України не виробляється, а іноземний товар має високу ціну тому розробка вітчизняної субстанції є перспективним напрямком та є необхідною умовою для впровадження цільових програм імпортозаміщення. Так як, частина людей хворих на інсомнію не приймає взагалі ніяких засобів, або приймає седативні препарати розрекламованих марок , наприклад “Гліцисед”, потреба у вітчизняному препараті “L-Tryptophan” зменшується.

Отже, виходячи із вище сказаного приймемо 10 % населення хворих на інсомнію в Україні, які будуть споживати вітчизняний “L-Tryptophan”(див. *табл.3.6*)

Щодо триптофану, як біологічно активної добавки, то в Україні існує багато інших аналогів спортивного харчування, зокрема протеїн, на який спортсмени звертають увагу в більшості випадків. Новою тенденцією є амінокислоти ВСАА (англ: Branched-Chain Amino Acids – амінокислоти з розгалуженими ланцюжками або БЦАА) – це комбінація з трьох найбільш

важливих для обміну речовин людини незамінних амінокислот. До складу ВСАА входять лейцин, ізолейцин і валін, які наразі, мають великий попит серед українців [32]. Тобто, потреба у вітчизняній БАД “Tryptophan” серед спортсменів, також зменшується (прийmemo частку 10 % від орієнтовної статистики категорій спортсменів) (див.*табл.3.6*)

Таблиця 3.6

Орієнтовна статистика категорій, які є потенційними споживачами вітчизняного ‘L-Tryptophany’.

Лікування (профілактика)	Статистика категорій в Україні на 2019 рік , осіб	Частка (10%)споживачів вітчизняного L- триптофану, осіб
Інсомнія	7247925	724792,5
Спортсмени	7610321,25	761032,1

Іноземними виробниками ‘ L- Tryptophan’ є США- найпотужніша країна-виробник, менше виробляють у Німеччині, Польщі, Білорусії, Росії та Венгрії , Японії, Португалії, розрахуємо частку, яка припадає на Україну (див.табл.3.7)

Таблиця 3.7

Найпопулярніші фірми – виробники ‘L-Tryptophany’

Країна виробник	Фірма-виробник та назва препарату	Література
США	Doctor's Best ‘L-триптофан’	[22].
	NOW Foods (USA) ‘L-триптофан’	[23].
	Source Naturals ‘L-триптофан’	[24].
	Zahler ‘ L-триптофан’	[25].
	Natrol ‘ L-триптофан’	[26].
	Amazing Formulas ‘ L-триптофан’	[27].
	Bluebonnet Nutrition ‘ L-триптофан’	[28].
Венгрія	Scitec Nutrition ‘L-триптофан’	[29].
Польща	OSTROVIT ‘L-триптофан’	[30].

Росія	Эвалор "L-триптофан"	[31].
Германія	Hecht-Pharma GmbH "L-триптофан"	[32].
	Kyberg Vital Aminoplus "L-триптофан"	[33].
Португалія	Prozis "L-триптофан"	[34].
Білорусь	РУП «Белмедпрепараты» "L-триптофан"	[35].
Японія	Jarrow Formulas "L-триптофан"	[36].

Отже, із вище сказаного, можна зробити висновок, що частка імпортих виробників складає 1/15 частину, тоді розрахуємо річну потребу з урахуванням тенденцій ринку України (див. *табл. 3.8*)

Таблиця 3.8

Розрахунок річної потреби амінокислоти з урахуванням тенденцій ринку України

Захворювання (профілактика)	Кількість препарату (в г) на 1 людину	Кількість хворих в Україні на 2019 рік, осіб	Кількість хворих, яка лікуватиметься вітчизняним препаратом (10%), осіб	Загальна кількість Триптофану на рік при охопленні ринку на 1/15 частину, кг
Інсомнія	90	7247925	724792,5	4348,7
Спортсмени	90	7610321,25	761032,1	4566,15
Разом 8915 кг				

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

Для забезпечення амінокислотою хворого населення України, необхідно отримувати 8915 кг амінокислоти триптофану в рік.

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

З даних статті відомо, що в культуральній рідині після концентрування міститься 40,2 г. Така концентрація досягається за $T_{\text{ф}} = 40$ год культивування. Вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{\text{ГП}}$ складає частку 0,95.

Для проведення подальших розрахунків приймемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера

$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 40 + 10 = 50$ год, де $T_{\text{ф}}$ – час культивування (40 год); $T_{\text{по}}$ – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год);

K_1 – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) приймемо $K_1 = 1,2$. Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{\text{св}} = 0,1$.

Приймаємо кількість робочих трудоднів 150 ($T_{\text{рд}}$). При кількості трудоднів рівному 150, кількість продукту на добу ($G_{\text{нтд}}$) становитиме:

Кількість готово продукту зацикл :

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нтд}} T_{\text{цф}} / 24 = 59,4 \cdot 50 / 24 = 124 \text{ кг/цикл.}$$

Кількість ферментацій (циклів) на рік (ціле число):

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} / G_{\text{цк}} = 8\,915 / 124 = 72 \text{ Об'єм КР, що}$$

зливається за одну ферментацію (цикл), м³:

$$V_{\text{кр}} = K_1 G_{\text{цк}} CP_{\text{ГП}} / P_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 124 \cdot 0,94 / 40,2 \cdot 0,9 = 3,5 \text{ м}^3.$$

Вихід продукту з 1 м³ культуральної рідини, л/м³:

$$q_{\text{ац}} = G_{\text{цк}} 1000 / V_{\text{кр}} = 124 \cdot 1000 / 3,5 = 35,4$$

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які будуть становити 10%.

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

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пм}\phi 1} = V_{\phi} - V_{\text{пс}1} = 3,9 - 3,5 = 0,4 .$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{\text{зф}} = 0,65$ його приблизний геометричний об'єм складе:

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{\text{нф}} =$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданого значення, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

4.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{рф}} = 6 \text{ м}^3$.

Найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{нф}} = 6,3 \text{ м}^3$.

Оскільки кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища визначаємо кількість посівного матеріала для інших стадій.

Для одержання 0,4 інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять 10%.

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

$$V_{\text{пс}2} = \frac{V_{\text{пм}\phi 1}}{1 - E_{\phi}} = \frac{0,4 \text{ м}^3}{1 - 0,1} = 0,44 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа1}} = \frac{V_{\text{пс2}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{0,44 \text{ м}^3}{1 + 0,1} = 0,4 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф2}} = V_{\text{пс2}} - V_{\text{пспа1}} = 0,44 - 0,4 = 0,04 \text{ м}^3 \text{ або } 40 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{пс2}} = 0,44 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпа2}} = \frac{V_{\text{пс2}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{440}{0,65} = 677 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{нпа}} = 1,00$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{пс2}}}{V_{\text{нпа}}} = \frac{444}{1000} = 0,44$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 1000 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому обираємо посівний апарат на замовлення 800 л. Тоді

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{444}{800} = 0,56$$

Для одержання $0,04 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять 10%.

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

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{пмф2}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{40}{1 - 0,1} = 44 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа2}} = \frac{44}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{44}{1 + 0,1} = 40 \text{ л}$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф3}} = V_{\text{пс3}} - V_{\text{пспа2}} = 44 - 40 = 4 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{пс3}} = 44 \text{ л}$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпаз}} = \frac{V_{\text{пс3}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{44}{0,65} = 67,7 \text{ л}$$

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

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{пс3}}}{V_{\text{нпа}}} = \frac{44}{100} = 0,44$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 100 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому обираємо посівний апарат на замовлення 80л.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{44}{80} = 0,55$$

Для одержання 4 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплєвиносу через колектор які становлять 10%.

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

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{пмф3}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{4}{1 - 0,1} = 4 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа3}} = \frac{V_{\text{пс4}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{4,4}{1 + 0,1} = 3,95 \text{ л}$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф4}} = V_{\text{пс4}} - V_{\text{пспа3}} = 4 - 3,95 = 0,05 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{пс4}} = 5,5 \text{ л}$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпа4}} = \frac{V_{\text{пс4}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{5,5}{0,65} = 8,46 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{нпа}} = 0,01 \text{ м}^3$ або 10 л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{пс4}}}{V_{\text{нпа}}} = \frac{5,5}{10} = 0,55$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 10 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому обираємо посівний апарат виготовлений на замовлення посівний -8 л.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{4}{8} = 0,5$$

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{\text{пм4}} = 0,4$ л можна одержати культивуванням у колбах. Для цього використовують колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 370$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{\text{пск}} = \frac{V_{\text{кол}}}{1 + X_{\text{кол}}} = \frac{0,37}{1 + 0,1} = 0,34 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, л:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пск}} = 0,37 - 0,34 = 0,03 \text{ л} = 30 \text{ мл}$$

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{340}{340 \times 0,2} = 5$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 5 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу амінокислоти Триптофану у ферментері об'ємом $6,3 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,65 буде проходити у чотири етапи

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

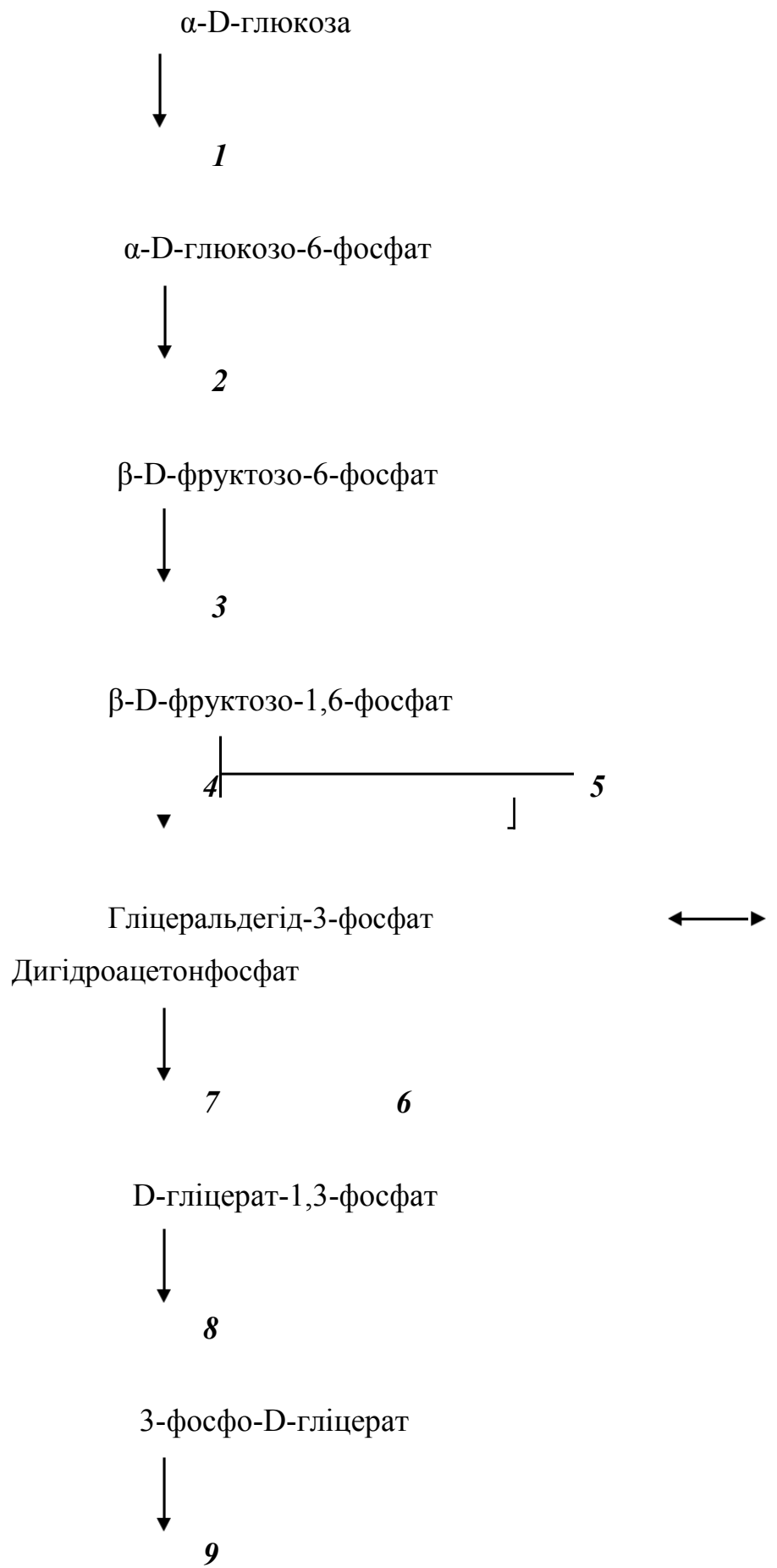
4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Ростовим субстратом у поживному середовищі для біосинтезу триптофану є глюкоза. Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [48], катаболізм глюкози відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз), про що свідчить наявність ключового ферменту 6-фосфофруктокінази (КФ.2.7.1.11). Наводимо схему перетворення даного вуглеводу (рис.4.9).

Глюкоза за участю глюкокінази (КФ 2.7.1.2) перетворюється на α -D-глюкозо-6-фосфат, яка за дії глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на β -D-фруктозо-6-фосфат. 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення у β -D-фруктозо-1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозобісфосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β -D-фруктозо-1,6-фосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроацетонфосфат, який під дією тріозофосфат ізомерази (КФ 5.3.1.1) також перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. Далі під дією гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на D-гліцерат-1,3-фосфат, який у свою чергу під дією фосфогліцерат кінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфо-D-гліцерат. Дія 2,3-біфосфогліцерат-залежної фосфогліцерат мутази (КФ 5.4.2.11) на 3-фосфо-D-гліцерат індукує його перетворення на 2-фосфо-D-гліцерат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфо-D-гліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

Після цього піруват залучається до наступних перетворень, кінцевим продуктом яких є Ацетил-КоА, який надалі йде у цикл трикарбонових кислот [48].

					НУХТ БТЕК 04.02.38			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив.	Багатиренко				Розділ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт							44	191
Керівник	Тетеріна С.М					Кафедра БТМ 45		
Н. Контр.								
	Пирог Т.П							



2-фосфо-D-гліцерат



10

Фосфоенолпіруват



11

Піруват

Рис 4.9, Катаболізм глюкози у *E. coli* BW2952 [48].

Ферменти: **1** – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); **2** – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); **3**– 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); **4** – фруктозобісфосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); **5** – тріозофосфат ізомераза (КФ 5.3.1.1); **6** – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); **7** – гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); **8**–фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); **9** – 2,3-біфосфогліцерат-залежна фосфогліцерат мутаза (КФ 5.4.2.11); **10** – енолаза (КФ 4.2.1.11); **11** – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)[48].

4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

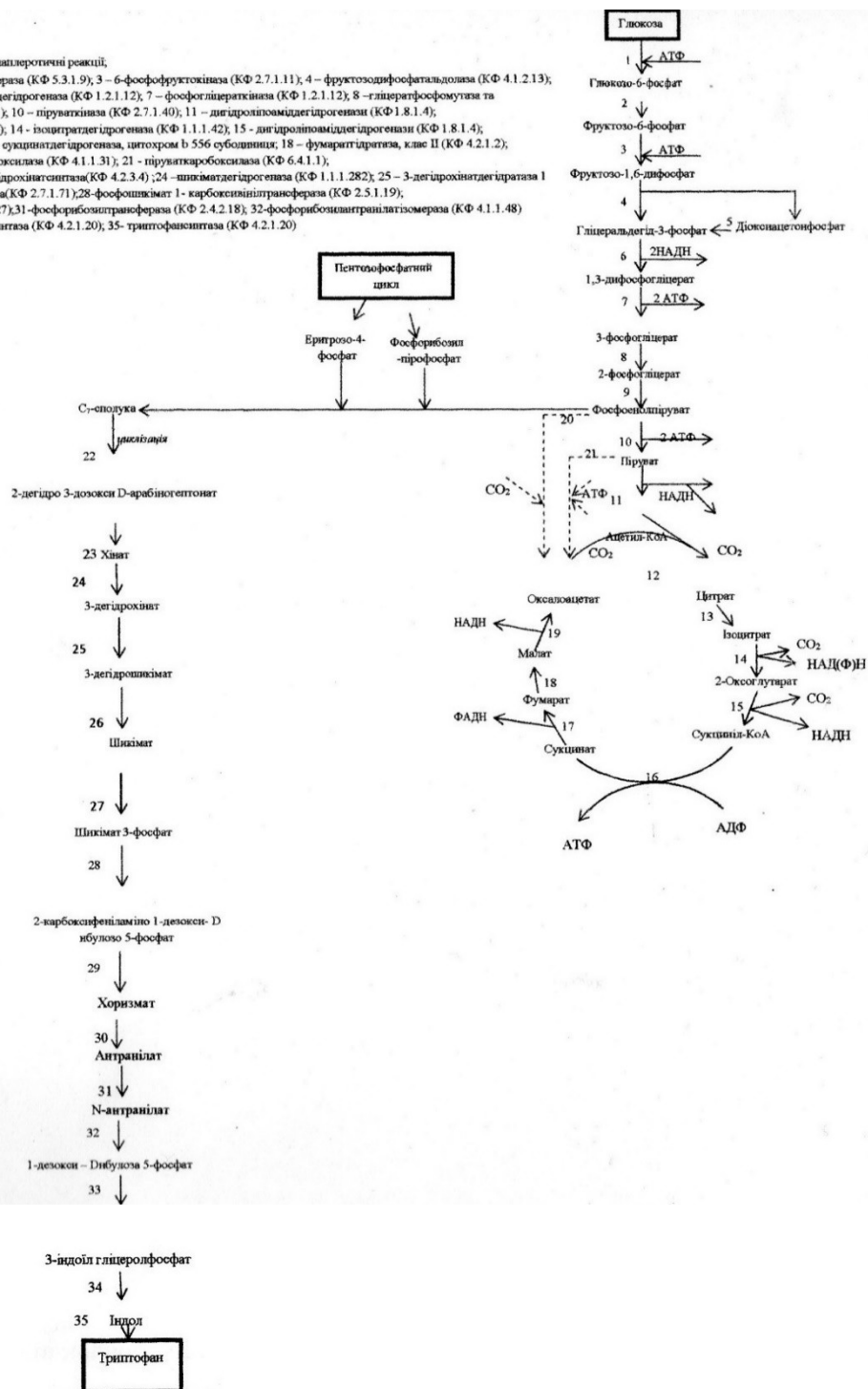
Вихідною сполукою для синтезу триптофану є еритрозо- 4 - фосфат та фосфоенолпіруват. Далі еритрозо- 4 - фосфат та фосфоенолпіруват конденсуються з утворюється С7 сполуки, яка піддається циклізації. Утворюється дегідрохінат – попередник шикімата. Далі утворюється шикімат ,а із шикімату утворюється хоризмат . Загальним проміжним продуктом синтезу ароматичної амінокислоти триптофану є хоризмат. У цій точці біосинтетичний шлях йде за утворенням триптофану через антранілат. Антранілат синтезується із хоризмата ферментом антранілатсинтази (КФ 4.1.3.27). Під дією - фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18) утворюється похідне антранілату N- 5-фосфорибозил антранілової кислоти. Далі під дією фосфорибосилантранілатізомераза (КФ 5.3.1.24) утворюється 1- (2-карбоксифеніламіно) -1-дезоксид-Д-рибулоза 5-фосфат, у свою

чергу, під дією - індол-3-гліцерин-фосфатсинтаза (КФ 4.1.1.48) утворюється індол гліцерол фосфат. Під дією фермента триптофансинтеза (КФ 4.2.1.20) утворюється триптофан[48].

Для поповнення у клітині запасів оксалоацетату як проміжного продукту біосинтезу і попередника у синтезі амінокислоти у даного продуцента функціонують анаплеротичні реакції – карбоксилювання пірувату та фосфоенолпірувату за участі ферментів фосфоенолпіруваткарбоксилази (КФ-4.1.1.31) та піруваткарбоксилази (КФ 6.4.1.1)[48].

Схема біотрансформації глюкози в триттофан (*E. coli*)

- 1) умовні позначення: $\leftarrow$ - основний шлях біосинтезу; $\leftarrow$ - - анаплеротичні реакції;
 2) ферменти: 1 - глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 - глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 - 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 - фруктозо-дифосфаталиаза (КФ 4.1.2.13); 5 - трифосфогліколізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 - гліцераальдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 - фосфогліцераткіназа (КФ 1.2.1.12); 8 - гліцератфосфомутаза та фосфогліцератфосфомутаза (КФ 5.4.2.11); 9 - енoliaза (КФ 4.2.1.11); 10 - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 11 - дигідролізоамідегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 12 - цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 13 - аконітагидратаза (КФ 4.2.1.3); 14 - ізонітратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 15 - дигідролізоамідегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 16 - сукциніл-КоА синтаза, альфа-субодиниця (КФ 6.2.1.5); 17 - сукцинатдегідрогеназа, цитохром b 556 субодиниця; 18 - фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 19 - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 20 - фосфоенопіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31); 21 - піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1); 22 - 3-дезоксін-7-фосфогенулозатсинтаза (КФ 2.5.1.54); 23 - 3-дегідрокінатсинтаза (КФ 4.2.3.4); 24 - шикімадегідрогеназа (КФ 1.1.1.282); 25 - 3-дегідрокінатдегідратаза I (КФ 4.2.1.10); 26 - шикімаат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.25); 27 - шикімакіназа (КФ 2.7.1.71); 28 - фосфощикімаат 1- карбоксимінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19); 29 - хоризматсинтаза (КФ 4.2.3.5); 30 - антранілатсинтаза (КФ 4.1.3.27); 31 - фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18); 32 - фосфорибозилантранілатізомераза (КФ 4.1.1.48); 33 - ацетил-3-гліцеролфосфатсинтаза (КФ 4.1.1.48); 34 - триттофан синтаза (КФ 4.2.1.20); 35 - триттофаніназа (КФ 4.2.1.20)



Ферменти: **1** – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); **2** – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); **3** – 6-фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11); **4** – фруктозодифосфатацьдолаза (КФ 4.1.2.13); **5** – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); **6** – гліцерадьдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); **7** – фосфогліцераткіназа (КФ 1.2.1.12); **8** – гліцератфосфомутаза та фосфогліцератфосфомутаза (КФ 5.4.2.11); **9** – енолаза (КФ 4.2.1.11); **10** – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); **11** – дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); **12** – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); **13** – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); **14** – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); **15** – дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); **16** – сукциніл-КоА синтетаза, альфа-субодиниця (КФ 6.2.1.5); **17** – сукцинатдегідрогеназа, цитохром b 556 субодиниця; **18** – фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); **19** – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); **20** – фосфоенолпіруваткарбоксілаза (КФ 4.1.1.31); **21** – піруваткарбоксілаза (КФ 6.4.1.1); **22** – 3-дезоксид-7-фосфогептулонатсинтаза (КФ 2.5.1.54); **23** – 3-дегідрохінатсинтаза (КФ 4.2.3.4); **24** – шикіатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.282); **25** – 3-дегідрохінатдегідратаза (КФ 4.2.1.10); **26** – шикіатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.25); **27** – шикіаткіназа (КФ 2.7.1.71); **28** – фосфосикіат 1- карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19); **29** – хоризматсинтаза (КФ 4.2.3.5); **30** – антранілатсинтаза (КФ 4.1.3.27); **31** – фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18); **32** – фосфорибозилантранілатізомераза (КФ 4.1.1.48); **33** – індол-3-гліцеролфосфатсинтаза (КФ 4.1.1.48); **34** – триптофан синтаза (КФ 4.2.1.20); **35** – триптофансинтаза (КФ 4.2.1.20)[48].

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Підготовка обладнання і комунікацій складається з таких етапів:

- миття;
- технічний огляд;
- перевірка на герметичність;
- стерилізація.

Миття. Для того аби помити ємнісне обладнання обираємо циркуляційну CIP-мийку 304 AISI (Cleaning in place (Україна). Вибір саме такого обладнання зумовлений таким рядом факторів :

- можливість мити одночасно декілька об'єктів;
- можливість забору води, яка використовується для ополіскування;
- автоматичне підтримання температури, а також концентрації миючого засобу;
- нагрівання води в малому контурі економить час, воду та енергію[49].

Технічний огляд. Після миття та ополіскування обладнання потрібно провести технічний огляд візуально аби виявити неущільнень в комунікаціях та в запірній апаратурі на обладнанні. Для усунення таких проблем проводять підтягування різьбових з'єднань[49].

Перевірка на герметичність. Наступною стадією підготовки обладнання (інокулятора, ферментера) до стерилізації є перевірка на герметичність. Для цього на апараті закривають всю запірну арматуру та подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1\text{--}0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі повітря, а також фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30–60 хв) записуючи в операційний журнал. Якщо ж падіння тиску не перевищує 0.01 МПа, вважається, що апарат герметичний[49].

					НУХТ БТЕК 04.02.38			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Багатиренко				Розділ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт							50	191
Керівник	Тетеріна С.М					Кафедра БТМ 51		
Н. Контр.								
Зав.Кафедр	Пирог Т.П							

В іншому випадку, здійснюють пошук неущільнень на апараті, а також у місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями[49].

В разі, якщо перевірка на герметичність виявила не ущільнення, то використовуємо метод галогенових течієпошукачів.

При галогенному методі течешукування виріб заповнюють хлорвмістним газом (чистим або в суміші з повітрям). Це фреон (хлорон) або CCl_4 , CF_4 . Таким чином, закривають усю запірну апаратуру, апарат нагрівають до 80°C та збільшують тиск до 0,2 МПа. Вихід парів суміші через нещільності фіксується тече шукачем. Метод ґрунтується на явищі різкого підвищення емісії позитивних іонів, з платинового аноду в присутності галогенів. Цей ефект спостерігається і при атмосферному тиску, а також у вакуумі. Після закінчення контролю, пробну речовину відкачують в резервуар[49].

Тривалість перевірки одного апарату цим методом – 0.5–1 год. У разі виявлення деяких неущільнень фіксують це місце, і здійснюють підтягування різьбового з'єднання. Якщо ця операція не дала явного позитивного результату, міняють прокладку і потім операцію повторюють. Процес здійснюють до ліквідації усіх виявлених не ущільнень [49].

Отже, таким чином цей метод є достатньо дієвим при перевірці порушення герметичності за відносно за короткий проміжок часу.

Стерилізація. Для цього застосовують, як правило, термічну стерилізацію за допомогою водяної насиченої пари з тиском $P = 0,28\text{--}0,3$ МПа. Такий процес умовно поділяють на три етапи: нагрів апарата, витримування при температурі стерилізації (сама суто стерилізація) та охолодження [49].

Нагрів апарата. Під час стерилізації даного апарата попередньо в сорочку подають насичену пару і після цього, прогрівають апарат до температури $80\text{--}90^\circ\text{C}$ [49].

Стерилізація. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях, а також підведених до апарата комунікаціях і подають безпосередньо гостру пару в апарат через барботер чи нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря, таким чином, пройде процес видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації

$t_{ст} = 130\text{--}135\text{ }^{\circ}\text{C}$, закривають усю запірну арматуру на апараті, але окрім парової, і витримують заданий час стерилізації. При стерилізації апарата також паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного і відпрацьованого повітря[49].

Охолодження. Закривають усю запірну арматуру, а також арматуру подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Для компенсації падіння тиску (при конденсації пари в апараті -утворення вакууму) в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють при досягненні температури $30\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ і надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005\text{ МПа}$ [49].

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і вибору ферментера

Для біосинтезу триптофану було обрано *Escherichia coli* шт. TRTH0709. По відношенню до температури – мезофіл, тобто той мікроорганізм для якого температурний оптимум в межах $20\text{--}42\text{ }^{\circ}\text{C}$ [26].

Оптимальна температура для росту *E. coli* шт. TRTH0709 є 37°C та $\text{pH}=7,2$. Виходячи з цього, можливий ризик контимінації сторонніми мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами. Це зумовлює необхідність забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, тому буде доцільно, для культивування *E. coli* шт. TRTH0709 використовувати глибинний спосіб, чого ж не можна досягти при поверхневому культивуванні [27].

Асептичність підтримується протягом всього часу культивування. Такі умови забезпечують попередньою стерилізацією обладнання, аераційного повітря та усіх інших компонентів, які потрапляють у ферментер. Також стерилізацію проходять піногасники, проте в даному випадку вони не використовуються, оскільки в середовищі відсутні речовини, що зумовлюють піну. Для запобігання контамінації у ферментері створюється надлишковий тиск за допомогою подачі аераційного повітря.

Розрізняють два основні способи глибинного культивування мікроорганізмів:

-безперервне культивування (дозволяє зафіксувати культуру в експоненційній фазі, за рахунок постійної подачі нового поживного середовища, а також відведення культуральної рідини).

-періодичне культивування (накопичення біомаси або ж необхідного продукту мікробного синтезу відбувається без заміни поживного середовища, і без виведення продуктів метаболізму).

Проте, основна частина синтезу триптофану відбувається в стаціонарній фазі росту, таким чином, для синтезу триптофана є оптимальним культивування у періодичній системі [29].

Ферментаційне обладнання для реалізації культивування біологічного агента повинно відповідати вимогам зазначеним нижче.

Оскільки для культивування необхідні аераційні умови *E.coli* *шт. TRTH0709*, то обов'язковою умовою є подача повітря в поживного середовища.

Отже, для подачі повітря ферментер повинен бути оснащений барботером, через який саме і, забезпечується аерація культуральної рідини.

Для підтримання рН на рівні 7,2 ферментер має бути оснащений рН-датчик та термодатчики, нагрівальні елементи для підтримання температури.

Для забезпечення високого значення тепломасообміну у ферментері повинен бути встановлений пристрій для перемішування.

Оскільки, бактеріальна культура не вибаглива до перемішуючих пристроїв, тоді можна використати доступну лопатеву мішалку, з метою забезпечення інтенсивного перемішування культуральної рідини по всьому об'єму ферментера.

Отже, всім вищезгаданим вимогам відповідає ферментер фірми "Biostat"(див.рис.5.10)[50].



Рис.5.10 Ферментер фірми ‘‘Biostat’’[50].

Даний ферментер обладнаний:

- барботером в нижній його частині, аби забезпечити подачу аераційного повітря;
- обладнаний лопатевою мішалкою для забезпечення ефективних масообмінних процесів;
- нагрівання може проводитись як електрично, так і парою;
- наявні датчики: рН, температури, розчиненого кисню та рівня піни, тож процес культивування проводиться автоматично[50].

5.1.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

E.coli TRTH0709 - факультативний анаероб, проте для отримання триптофану штамом необхідне культивування в аераційних умовах за pO_2 20–30 %. Виходячи з вище згаданого, в технологічній схемі необхідно передбачити стадії підготовки аераційного повітря.

Оскільки втрати аераційного повітря будуть порівняно великі, тому доцільно стадії його підготовки здійснювати в окремих будівлях – компресорних відділеннях.

Підготовка аераційного повітря складається з таких стадій:

- забір атмосферного повітря здійснюють за рахунок вертикальної труби з повітря збірником у найвищій точці $H \sim 13$ м (висота потолків будівлі = 7,2 м,

висота поверху ~ 8 м, таким чином разом з косим дахом будівлі ~ 10 м, відбір повітря повинен проходити на 2-3 м вище найвищої точки) будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;

- очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;

- стиснення повітря в компресорах або ж турбоповітродувках (нагрів повітря відбувається до температури $120-200^{\circ}\text{C}$);

- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси», за якої і конденсується волога повітря (використовують водяні теплообмінники різноманітного типу: кожухотрубні, «труба в трубі»);

- видалення конденсованої вологи та парів мастила, які потрапили з компресора до ресивера (ємність великого об'єму); таким чином, ресивер зменшує пульсацію руху повітря, які можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;

- стабілізація показників (тиск, температура) за допомогою нагрівання до температури $45-50^{\circ}\text{C}$ парою у відповідних теплообмінниках;

- очищення у головних набивних ємнісних фільтрах до ступеня очищення $E=95\%$. Головні фільтри встановлюють біля ферментаційних відділень;

- очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається до індивідуальних фільтрів, які ж встановлені, безпосередньо, на ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E = 99,99\%$ [49].

5.1.3. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів для культивування *E.coli*

Виробництво триптофану, здійснюється упродовж 150 днів (див. розділ 3), саме така кількість робочих днів була вибрана, оскільки наприклад, в інші 180 буде проходити виробництво іншої амінокислоти (треоніну), яку продукує *Escherichia coli*.

Таке виробництво передбачає підготовку даного обладнання: ферментер об'ємом $6,3 \text{ м}^3$, посівні апарати об'ємом 800, 80, 8 л, збірники для підготовки, а

також стерилізацію компонентів поживного середовища, качалки, бокс та лабораторне устаткування.

Слід врахувати, що ферментер на $6,3\text{ м}^3$ та збірник відповідного об'єму – ємнісні обладнання, яке встановлюється на валах і потребує розміщення обслуговуючого майданчика.

Отже, виробництво включатиме наступні цехи: цех виробничого біосинтезу та цех вирощування інокуляту, качалочна кімната, мікробіологічна лабораторія, де і знаходяться холодильники, термостати, бокс, автоклав, сухо жарові шафи, та біохімічна (або ж технологічна) лабораторія, яка оснащена апаратурою для проведення різних видів контролю (рН-метр, хроматограф, ФЕК тощо), ваги для приготування поживних середовищ. Відстань між стінами і апаратами становить 1,0 - 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісними апаратами складає -1 метр.

Загальний об'єм обладнання для виробництва триптофана становить - $13,9\text{ м}^3$.

Для підтримання чистоти в виробничих приміщеннях підлогу необхідно мити кожного дня, тобто 150 разів. Обробка стін, вікон та підлоги, або ж генеральне прибирання здійснюється щомісячно, відповідно 11 раз. Необхідно розрахувати кількість миючих засобів, а для цього розраховуємо приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи, також і площу підлоги виробничого приміщення, площу стін на висоту 2,5 м.

Оптимальна площа підлоги цеху для проведення виробничого біосинтезу становить (враховуючи місце на майданчику обслуговування для вивантаження кришки ферментера та збірника) 49 м^2 ($7 \times 7\text{ м}$), площа стін – $((7 \times 2,5) + (7 \times 2,5)) \times 2 = 70\text{ м}^2$, загальна площа – $42 + 65 = 119\text{ м}^2$.

Загальна площа поверхні обробки миючими засобами наведена в *табл. 5.9*.

Таблиця 5.9

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Пло ща підлоги, м²	Пло ща стін, м²	Зага льна площа, м²
Цех виробничого біосинтезу	49	70	119
Цех вирощування інокуляту	30	55	85
Мікробіологічна лабораторія	30	55	85
Біохімічна (технологічна) лабораторія	35	60	95
Приміщення з качалками	12	40	52
Загальна площа	156	280	436

Кількість виробничих циклів для синтезу амінокислоти триптофану становить 72. Оскільки, миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 73 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді ж, загальний об'єм миття становитиме:

$$13,9 \times 73 = 1000,8 \text{ м}^3$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та(або) дезінфекції за весь період виробництва наведено в *табл. 5.10*.

Таблиця 5.10

Розрахунок загальної площі миття та(або) дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва триптофану

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	13,9	73	1000,8
Підлога	156	330	51480
Стіни, двері, вікна	280	12	3360

Для того, аби обрати миючі та(або) дезінфікувальні засоби, варто врахувати їх вартість, а також витрати на обробку площі всього виробничого приміщення. На 1 м² затрачається біля 100 мл робочого розчину мийного або дезінфікуючого засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Ємнісне обладнання миють автоматичною мийкою СІП-304 AISI, при цьому витрати мийного засобу складають біля 20% від всього об'єму обладнання. Враховуючи це, для миття обладнання необхідно:

$$1000,8 \times 0,2 = 3643,7 \text{ м}^3 \text{ мийного засобу на рік.}$$

Ферментер та збірник на 6,3 м³ тримається на валах, тому для зручності будується майданчик обслуговування, який передбачає місце для знятої кришки ферментера та збірника. Цей майданчик теж потребує миття 150 днів в рік. Обслуговуюча площа складатиме 49 м² та буде внесена до наступних розрахунків, площа миття майданчика в рік складатиме $49 \times 150 = 7350 \text{ м}^2$. Загальна площа для миття підлоги, стін, дверей та вікон складає:

$$51480 + 3360 + 7350 = 62190 \text{ м}^3$$

Вартість концентратів мийних та дезінфікувальних засобів та їх витрати на виробництві наведено в *табл. 5.11*.

Таблиця 5.11

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва триптофану

Назва мийного/ дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн.	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Супераль ДР(гідроксид натрію)	Обладнання	5,0	1000,8	3643,7	38,3	1,9	6923,03
Каустична сода ДР(натрій гідроксид)	Обладнання	2,0	1000,8	3643,7	18,75	0,375	6832,03
Вімол ДР (комплекс ЧАС)	Обладнання	1,0	1000,8	3643,7	19	0,19	3461,56
Лойран-про 12 ДР(етилловий спирт,гідроксид натрію)	Обладнання	0,8	1000,8	3643,7	30	0,24	4372,50
Деозан Деоген ДР(натрію гіпохлориду та натрію гідроксиду)	Стіни, підлога, вікна, двері	3	71010	7101	63	1,89	134208,9
Ексан-про-дез ДР(спирт етиловий)	Стіни, підлога, вікна, двері	6	71010	7101	42	2,52	178945,2
Хлор Ліквід ДР (гіпохлорид натрію)	Стіни, підлога, вікна, двері	7	71010	7101	97	6,79	482157,9
БіоЛонг ДР(бензалконію хлориду)	Стіни, підлога, вікна, двері	10	71010	7101	140	1,4	99414

Примітка. Ціни наведено станом на вересень 2019 р.: <https://prom.ua>

Супераль - рідкої консистенції миючий засіб, який має антибактеріальну дію, сильно-лужний, утворює багато піни, застосовують для миття обладнання, термокамер або коптильників[51].

Каустична сода- універсальний дезінфектант, який має потужний бактерицидний ефект, що заснований на сильних лужних характеристиках. Застосовується для хімічної дезінфекції приміщень, зокрема, для сільськогосподарського призначення, а також для знезараження інвентарю. У вигляді 2-3% -го гарячого (70 ° C) розчину вбиває велику кількість інфекцій, спровокованих бактеріями і вірусами. При поєднанні з 5-10% -м хлоридом натрію дезінфікуючий вплив підвищується[51].

Вімол - це негорючий, нетоксичний дезінфікуючий засіб, поверхнево-активна речовина. Лужні і нейтральні солі забезпечують високу миючу дію препарату. Розчин стабільний і при зберіганні не розкладається. Наявність в складі пом'якшеної води дозволяє використовувати розчин препарату в районах з підвищеною жорсткістю води [52].

Лойран-про 12 - миючий засіб лужної природи з антимікробною дією і достатньо зниженим піноутворенням, призначений для видалення білкових і жирових забруднень з технологічного обладнання, на підприємствах харчової промисловості, громадського харчування, в комунальному господарстві[51].

Ексан-про-дез- пінний очисник слабколужної природи з антимікробною дією для ручного миття, або ж за допомогою піногенератора забруднених водостійких поверхонь устаткування і приміщень в різних галузях, зокрема харчової промисловості (м'ясо-молочної, кондитерської, хлібопекарської, рибоконсервної і т.д.)[51].

Засіб дозволено Міністерством охорони здоров'я для застосування за призначенням в дитячих установах[51].

Хлор Ліквід- універсальний рідкий концентрований засіб на основі гіпохлориту натрію, а також комплексу допоміжних функціональних компонентів, має широку сферу застосування (дезінфекція, очищення, стерилізація) [51].

БіоЛонг-засіб призначений для проведення дезінфекції (в тому числі, поєднаної з передстерилізаційною очисткою) на об'єктах, які підлягають санітарному нагляду: медичних, лікувально-профілактичних та оздоровчих закладах; косметологічних та перукарських салонах; дитячих та учбових закладах; закладах сфери обслуговування, громадського харчування, торгівлі на ринках; автомобільному, залізничному, авіаційному та громадському транспорті; в громадських установах, готелях; в осередку інфекційних захворювань; для дезінфекції лабораторного обладнання, медичного, стоматологічного та перукарського інструменту, предметів догляду за хворими, посуду, медичного та оздоровчого обладнання, предметів побутового використання, вікон, меблів, ліжок, взуття та одягу, миття всіх поверхонь, які є джерелом вірусної, грибкової та бактеріальної інфекції [53].

Отже, проаналізувавши *таблицю 4.7.*, для миття обладнання було б доцільно, використати миючий засіб «Вімол», а для миття стін, підлоги, вікон та дверей – «БіоЛонг», оскільки враховуючи концентрацію даних розчинів, та їх вартість за один літр (кілограм), витрати на їх придбання для всього періоду виробництва становлять найменше. Кожні 3 місяці засоби необхідно змінювати, аби унеможливити утворення резистентних штамів мікроорганізмів.

«Вімол» - це поверхнево-активна речовина, яка має дезінфікувальний ефект. Застосовується проти грампозитивних та грамнегативних вегетативних бактерій, грибів, ліпофільних вірусів. Важливим аспектом є те, що розчин при зберіганні не розкладається. Наявність в складі пом'якшувачів води дозволяє використовувати розчин препарату в районах, де підвищена жорсткість води. Використовується для миття обладнання, а також тари та трубопроводів на підприємствах [52].

Зберігають в упаковках в закритих сухих провітрюваних приміщеннях при температурі від - 10 до 40 °C, відносної вологості повітря не більше 85%, та захищають від дії сонячних променів.

«БіоЛонг» -засіб дезінфікувальний з мийною властивістю. Ефективний відносно до грамнегативних та грампозитивних бактерій (в тому ж числі мікробактерій туберкульозу), полівірусів, пліснявих грибів, а також грибів роду

Candida, дерматофітів, має спороцидну дію. Зберігати в сухому місці при температурі від +5°C до +25°C, окремо від харчових продуктів, і в недоступних для дітей місцях. При температурі нижче +5° можлива поява осаду, який не буде впливати на дезінфікуючі та стерилізуючі властивості. Термін придатності: 36 місяців [53].

Враховуючи саме такий вибір засобів, рекомендовано заміну їх через 3 місяці. Для миття підлоги, стін, дверей, а також вікон доцільно вибрати мийно-дезінфікувальний засіб з пролонгованою дією, оскільки, в такому випадку, ми забезпечуємо подовження дії реактиву, що і призводить до зменшення витрат дезінфікувальних засобів. Такі засоби володіють перевагами: широкий спектр антимікробної активності, низька токсичність та пролонгована дія і безпечність, стабільність робочих розчинів. Зважаючи на дані переваги, обираємо для миття поверхонь виробництва розчин «Гембару». Ефективна концентрація даного миючого засобу становить 0,1 г/л. Для заміни «Вімолу» можна використовувати більш простий та традиційний для біотехнологічних виробництв засіб – каустичну соду[38].

Для забезпечення належної чистоти повітря у виробничих приміщеннях було б доречно застосувати стельові бактерицидні лампи, які вмикають на 1,5–2 год після проведення генерального прибирання (проводиться раз на тиждень), в попередньо звільнених від персоналу приміщеннях [49].

Обґрунтування стадій культивування

Для виробничого біосинтезу *E.coli* використовується середовище наступного складу (г/л):

Глюкозу -8 г;

Дріжджовий порошок -1 г;

KH₂PO₄ -4 г;

MgSO₄ · 7H₂O -3,5 г;

(NH₄)₂SO₄ - 4 г;

FeSO₄ · 7H₂O - 0,15 г;

C₆H₅O₇Na₃ · 2H₂O - 2,5 г;

Суміш мікроелементів (0,278 г / л $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 г / л ZnCl_2 , 0,02 мг / л $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,20 г / л $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,25 г / л H_3BO_3) [1].

Для забезпечення ефективного процесу підготовки поживних середовищ для посівних апаратів 8л, 80л, 800л та виробничого ферментера 6,3м³ основні та фосфорні солі стерилізуємо разом, аби унеможливити утворення осада(нерозчинних фосфатів), тоді доцільно буде довести значення рН до 4-4,5 6%-им розчином HCl .

Проте, оскільки для вирощування *E.coli* рН повинно бути на нейтральному рівні (рН = 7,2), тоді перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище стабілізують стерильним 6% розчином NaOH .

Також, доцільним буде приготування додаткового розчину мікроелементів, об'ємом 1л на потреби чотирьох стадій вирощування посівного матеріалу, але ж так як наважки занадто малі, то для зважування використовуємо високоточні лабораторні ваги окремо. Даний запасний розчин готуємо в колбі об'ємом 3 л, такий об'єм доцільно простерилізувати в автоклаві (спільне приготування на 4 стадії). Готовий стерильний розчин буде зберігатися в лабораторії, і необхідна кількість буде додаватися на відповідному етапі в композицію солей вже перед стерилізацією. Для приготування поживного середовища для виробничого культивування у ферментері 6,3 м³ вносими мікроелементи в композицію солей. Оскільки, в такому випадку маса наважки є достатньою для точного зважування.

Для культивування у колбах та збірниках використовують середовище з вмістом у ньому 50 г/л глюкози, на етапі ферментації- вміст глюкози 8 г/л.

Підживлення середовища проводять лише на етапі біосинтезу, вже безпосередньо у ферментері.

Готуємо розчин глюкози для підживлення культури, і використовуємо такий розчин після 14 години культивування .

Останню порцію підживлюючого розчину доречно вносити за 8 годин до закінчення культивування.

Вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування штаму, умовно поділимо його на такі композиції:

Композиція А

Глюкоза, дріжджовий автолізат, тіамін (режим стерилізації 112 °С, 30хв.)

Композиція В

KH_2PO_4 (режим стерилізації 131°С, 40хв.)

Композиція С

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації 131°С, 40хв)

Компоненти *композиції А* термолабільні та потребують м'якого режиму стерилізації.

Сіль *композиції В* стерилізують окремо, тому що, це фосфатна сіль, і її не стерилізують разом із сульфатною аби запобігти утворення осаду.

Окремо готують допоміжний розчин мікроелементів (в автоклаві при 131°С, 40хв) об'ємом 1л (з розрахунком для інших 3 стадій підготовки посівного матеріалу).

Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 8,80,800 л

Оскільки, об'єми поживних середовищ занадто великі для стерилізації в автоклаві, в такому випадку, їх треба стерилізувати, безпосередньо, в посівному апараті. Перед кожним посівним апаратом буде розміщено збірник для приготування композиції, який буде мати відповідний об'єм.

Композиція А

Глюкоза, дріжджовий автолізат, тіамін (режим стерилізації 112 °С, 30хв.)

Композиція В

KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Стерилізація *композиції В* проводиться в апараті , тому що умови стерилізації є жорсткіші ніж *композиції А*. Солі розводять в збірнику, додають також необхідний об'єм запасного розчину мікроелементів, після чого подають в посівний апарат, де і проводиться стерилізація.

Виробниче культивування в ферментері на 6,3 м³

Композиція А

Глюкоза, дріжджовий автолізат, тіамін (режим стерилізації 112 °C, 30хв.)

Композиція В

KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Для виділення та очистки триптофану з культуральної рідини застосовують такі етапи:

- 1) Відділення клітинної біомаси від культуральної рідини (центрифугування);
- 2) Очищення і концентрування розчинів, які містять вихідну амінокислоту;
- 3) Висушування

5.3. Обґрунтування способу відділення клітинної біомаси від культуральної рідини

Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання.

Локалізація цільового продукту

Згідно патенту[4], накопичення цільової L-амінокислоти здійснюється поза клітиною. Клітини видаляються із культуральної рідини методом центрифугування, в ході чого і отримуємо супернатант, який в подальшому піддається методам очищення з відділенням цільового продукту[9].

Обґрунтування: *E. coli* TRTH0709 – надпродуцент триптофану і синтезує 40,2 г/л цільового продукту[8], таким чином така кількість амінокислоти не може накопичуватись в середині клітини, максимальне накопичення цільового продукту ендометаболіта – 10 г/л. Згідно першоджерела [4], описані подальші операції саме з супернатантом, що спростовує факт, того що триптофан накопичується в середині, а також відсутній етап дезінтграції клітин, отже, цільовий продукт – екзометаболіт.

Обґрунтування способу відокремлення біомаси:

Існують такі методи відокремлення біомаси від культуральної рідини: сепарування та центрифугування; фільтрація, а також осадження за допомогою флокулянтів; дистиляція; сублімація; осадження шляхом змін розчинності

речовини; кристалізація; сорбція; екстракція ; ультрафільтрація на мембранних фільтрах тощо.

Наприклад, флотація, осадження, кристалізація або ж сорбція чи екстракція – є неефективними методами відділення біомаси так як, ці методи є економічно недоцільними, що в свою чергу є не вигідним для промислового виробництва, потребують додаткових реактивів та технологічного обладнання.

Фільтрація, ультрафільтрація, застосування вакуум- фільтрів є неможливим, без попередньої обробки культуральної рідини, а також закупорювання фільтрів, має негативний вплив на технологічний процес.

Сепарування – застосовують для розділення суспензій зі значною або ж середньою концентрацією твердої фази, і в'язких суспензій чи емульсій[49].

Центрифугування – примусове осадження часток (або речовин) за рахунок, того що, збільшується швидкість відцентрових сил. Центрифугування дає ж змогу відділяти з культуральної рідини біомасу бактерій. Даний спосіб використовується як у фармацевтичній, мікробіологічній, хімічній так і в харчовій промисловості[49].

Центрифугування проходить з найменшими витратами. Центрифуги є більш автоматизованими та легше миються. Процес центрифугування забезпечує розділення і таким чином, отримання максимально чистих рідин.

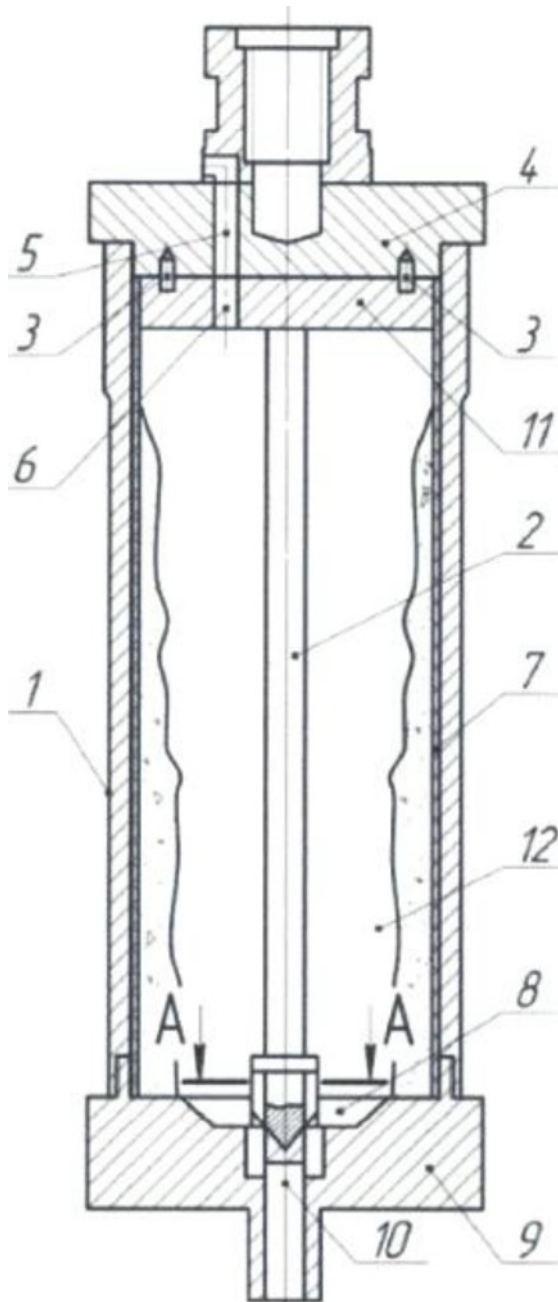
Якщо ж розділяти центрифуги за призначенням, то можна виділити фільтруючі та осаджуючі центрифуги. Фільтруючі центрифуги (центрифуга фільтрувальна періодичної дії з ручним вивантаженням осаду, центрифуга фільтрувальна з гравітаційним вивантаженням осаду, тощо) оснащуються барабанами, які покриті зсередини, як правило, тканиною або ж іншою фільтруючою перегородкою. Даний тип центрифуг використовується для розділення суспензій та має зернисту або ж тверду кристалічну фазу [49].

Осаджуючі центрифуги також оснащені суцільним барабаном. Даний тип центрифуг найчастіше використовується безпосередньо для поділу середньо і дрібнозернистих суспензій, що важко фільтруються, коли допустимо високий вміст рідкої фази в отриманому осаді, і коли таким чином використання фільтруючих поверхонь просто неможливо[49].

Так як, кількість біомаси при розрахунку становить 565 кг, а кількість культуральної рідини- 124 м³ буде доцільно використати центрифугу з гравітаційним вивантаженням осаду[3]. Принцип дії якої полягає у тому, що осад під час роботи саморозвантажної центрифуги вивантажується під дією власної ваги. В результаті чого отримуємо супернатант.

Опис центрифуги з гравітаційним вивантаженням осаду.

[3].



Фіг. 1

Рис.5.11 Принцип роботи саморозвантажної центрифуги у розрізі [3].

Принцип роботи саморозвантажної центрифуги

Саморозвантажна центрифуга містить вал 2, має верхню і нижню кришки, засіб подачі суспензії з трубкою живлення і з отворами (Рис. 5.11), розташованими в нижній частині ротора 1, засіб для відведення рідини у вигляді каналу 5, виконаного у верхній кришці 4.

Всередині ротора розташований поршень 11, який і має фіксатори 3 і отвір 6 для переходу рідини вже до верхньої частини. На внутрішній поверхні стінки ротора розташоване, так зване антифрикційне покриття 7 [3].

Вхідна рідина по каналам 10 і 8 потрапляє всередину ротора до камери розділення 12. Під дією поля відцентрових сил, ці тверді частинки, що містяться в рідині, осаджуються безпосередньо, на внутрішній поверхні стінки ротора 1, яка має антифрикційне покриття 7, а освітлена рідина відводиться спочатку через отвір 6 поршня 11, а потім вже і, через отвір верхньої кришки 5.

Після зупинки роботи ротора центрифуги, осад вивантажується під дією сил власної ваги, який опускається в нижню частину. Для передачі зусилля використовується шток 2, який і центрується у нижній кришці [3].

Технічна характеристика :

Частота обертання вала барабана-12000 об/хв.

Продуктивність – 40 м³/хв.

Потужність електродвигуна, 1,1 кВт.

Габарити, ШхГхВ, мм — 615х940х1550 [3].

Так як, дана цільова амінокислота передбачається застосовуватись для виробництва БАД, у формі порошку, тоді кінцевий продукт має бути максимально очищений від зайвих домішок. Для цього здійснюємо фільтрування на ультрафільтраційній установці. Нижче наведено різні типи фільтраційних установок (див. *табл. 5.12*)

Порівняльна характеристика фільтраційних установок

Апарат	Технічні характеристики	Переваги	Недоліки
Нутч-фільтр “Р”[54].	Діаметр пор-8-15мкм. Поверхня фільтрації-8-16м ² . Фільтруючий елемент-перхлорвініл	Зберігає герметичність та асептику; Простий в конструкції та компактний; Обладнений зовнішньою сорочкою, що дозволяє здійснювати фільтрацію при різних температурних режимах.	Великі габарити; Ручне вивантаження осаду;
Друк-фільтр ДСЕВ 0,2-11-12-01[55].	Діаметр пор-10-15-мкм. Поверхня фільтрації-20 м ² ;	Висока продуктивність	Габарити;
Вакуум фільтр Дискового типу[56].	Фільтрування здійснюється під вакуумом. Площа фільтруючої поверхні-80 м ²	Безперервне обертання барабана Дозволяє і фільтрувати, і сушити і вивантажувати осад.	Незначна рушійна сила
Ультрафільтраційна установка “Nagema”[57].	Середній діаметр пор: 0,001-0,1 мкм Мембрани виготовлені з полісульфона/полівінілідіну.	Простота конструкції, економічна вигідна, має високий ступінь очистки. А саме, очистка від патогенні мікроорганізми: бактерії (E-coli, Salmonella, Campylobacter Coli та ін.), найпростіші (Giardia intestinalis, Cryptosporidium), яйця глистів і грибки; природні органічні речовини, що викликають кольоровість води — гумінові та фульво-кислоти; колоїдні частинки глини, окисненого заліза, водоростей.	Низька швидкість процесу

Отже, обираємо ультрафільтраційну установку, яка має найголовнішу перевагу-високий ступінь очистки з діаметром пор $= 0,001$ мкм , задля звільнення білкових молекул, які мають більшу молекулярну масу порівняно з триптофаном, а також одночасної концентрації.

Згідно першоджерела, наступною стадією очищення цільової амінокислоти є іонообмінна сорбція.

Іонообмінна сорбція- найбільш ефективний та надійний метод очищення амінокислот. Сорбент замість поглинених іонів, навпаки, посилає в розчин іони того ж знака. Обмін іонів між сорбентом та розчином відбувається в еквівалентних відносинах.

В свою чергу сорбент повинен відповідати ряду вимог: повинен володіти поглинаючою здатністю, а також володіти вибірковістю, в даному випадку до триптофану в суміші, яку очищаємо. Сорбент повинен не розчинятися в суміші, а також володіти механічною міцністю, безперечно, бути економічно доцільним; мати достатній ступінь дисперсності, аби забезпечити необхідну швидкість сорбції.

Згідно патенту[4] сорбція L-триптофану здійснюється через колонку з макропористим сорбентом (аніонітом ІА-1Р ГОСТ 20301-74), здатний до реакцій іонного обміну завдяки наявності спеціальних функціональних груп, а саме аміногрупи різного ступеня заміщення: $-NH_2^+$, $=NH^+$, в свою чергу триптофан є катіоном при значенні рН-2,2 [4], який і утримується іонообмінною смолою колонки і при елююванні градієнта з підвищенням рН змиваються з неї згідно ізоелектричної точки молекул. Діапазон оптимального значення рН з елюента до 7,0 який відповідає всім вимогам названим вище.

В якості рухомої фази згідно патенту використовуємо 0,1М розчину NaOH, який виключає необхідність регенерації сорбенту, так як виділення амінокислот протікає з одночасним переходом іоніта в OH-форму. Для десорбції амінокислоти з твердого носія згідно патенту застосовуємо 0,2 н HCl . [4].

Після закінчення сорбції колонку з сорбентом промивають водою[4].

В разі наявності забарвлених домішок у вихідному розчині елюція триптофану слід проводити водою при кімнатній температурі з одночасною

подачею триптофанвмісного елюата на колонку з сульфокатіоном (КУ-2-8) в Н-формі [4].

Іонообмінна смола КУ-2-8 - ГОСТ 20298-74 [58]. Є монофункціональним сильнокислотним катіонітом полімералізаційного типу, яка має в якості функціональної групи сульфогрупу $-\text{SO}_3$ і фосфорну групу $-\text{PO}_3$, в свою чергу триптофан при рН 7,0 є аніонітом, та утримується іонообмінною смолою. Двозарядний катіон триптофану селективно сорбується на катіонообміннику, при цьому іони кальцію, калію, натрію, амонію витісняються триптофаном в рівноважний розчин, а іоніт насичується амінокислотою.

Смола даного типу відрізняється хорошою осмотичної стабільністю, високою хімічною стійкістю до дії лугів, кислот, окислювачів; не розчиняється у воді і органічних розчинниках. Випускається у вигляді зерен від світло-жовтого до темно-коричневого кольору. Катіоніт характеризується великою кількістю хімічних і фізичних властивостей. Двозарядний катіон триптофану селективно сорбується на катіонообміннику, при цьому іони кальцію, калію, натрію, амонію витісняються триптофаном в рівноважний розчин, а іоніт насичується амінокислотою[58].

Основні хімічні властивості катіоніта КУ-2-4: хімічна стійкість, кислотність, обмінна ємність, питома витрата реагентів і промивною води при заданій глибині видалення з води іонів, термічна стійкість, застосовується в фармацевтичній промисловості [4]. З фази катіоніта триптофан елююється розчином аміаку (рН 11), тому що в цих умовах відбувається перезарядка триптофану і перехід його в аніонну форму, що призводить до швидкого витіснення з сорбенту амінокислоти.

Елюцію триптофана здійснюють промиванням 3,0% розчином аміака [4].

Такий спосіб елюювання здійснюється для того, аби запобігти кристалізацію сорбованого триптофану безпосередньо в колонці. [4].

Наступною стадією процесу очищення цільової амінокислоти триптофану є кристалізація.

Згідно патенту[4], кристалізація цільової амінокислоти здійснюється із аміачного елюата за рахунок льодяної оцтової кислоти у приймачі фракцій

іонообмінної колонки. Проводимо підкислення льодяною кислотою до pH-3,5 та проводимо послідовне охолодження до 0-5 °С. Після чого утворюється кристалічна суспензія, яку передаємо на етап відділення.

Переваги кристалізації перед іншими методами очищення амінокислот, а саме таких як сублімація, перегонка :простота використання та експлуатації [59].

Наступною стадією очищення цільової амінокислоти є розділення кристалічної суспензії, а також очищення кристалів від домішок та речовин в яких заходила амінокислота. На виході отримуємо- кристали, які можна буде піддавати висушуванню.

Розділення кристалічної суспензії доцільно здійснити за допомогою ультрафільтрації з діаметром пор -0,001 мкм, переваги якої були наведені вище. На виході отримуємо кристали триптофану. Кристали триптофану піддаються промиванню охолодженим 60 % етанолом та передаються на етап вакуум-сушіння[4].

Сушіння цільового продукту (див. табл.5.13)

Кристали подають на етап висушування- процес видалення вологи.

Кінцевий продукт виділення та очищення- порошкоподібна субстанція.

Таблиця 5.13

Порівняльна характеристика деяких сушильних установок

Апарат	Технічні характеристики	Переваги	Недоліки
Вакуум сушка [60].	Максимальна температура висушування: 200 °С; Продуктивність -100 кг/год; Час висушування-до 20 годин.	Висока продуктивність та швидкість сушіння	Неможливо провести безперервний процес
Розпилююча сушарка[61].	Продуктивність: до 190 кг/год; Час висушування: до 20 годин.	М'які процеси сушіння. Інтенсифікування процесу випарювання.	Габарити

Ліофільна сушка[62].	Продуктивність: до 180 кг/год; Час висушування: 24-48 год; Максимальне завантаження продукту: до 20кг;	Відсутня небезпека окиснення нестабільних речовин.	Тривалий процес висушування; Великі енергозатрати; Висока ціна;
----------------------	--	--	---

Отже, сушіння триптофану варто здійснювати за допомогою сушильної вакуум установки, так як економічно доцільно використовувати даний типу сушарки, а також метод вакуумного сушіння дозволяє отримувати сухі препарати, безпосередньо без втрати їх кількісної, а також якісної цілісності, саме таке сушіння є найпрогресивнішим методом зневоднення біологічних препаратів.

Згідно патенту [4], при висушуванні кристалів триптофану застосовують вакуум сушку. Вакуум сушіння здійснюється при температурі 60 °C [4].

Сушарка споряджена системою «миття і стерилізації на місці», а також стерилізацію можна проводити як парою, так і H_2O_2 , і системами автоматичного коркування флаконів з висушеним продуктом.

Наступним етапом є дробіння висушеного триптофану молотковою дробаркою (див.рис.5.12), аби унеможливити злипання кристалічного порошку.

Подрібнення матеріалу здійснюється при ударах частин матеріалу, що відкидаються молотками. Досягнувши певного розміру, частини матеріалу проходять через сито. Для виготовлення молотків використовуються зносостікі сталі[5].

Ступінь подрібнення характеризується розміром отворів сита в даному випадку $d=1,5\text{мм}$. До переваг молоткових дробарок відноситься: простота і компактність конструкції, надійність, безперервність роботи, велика продуктивність, невисокі питомі енерговитрати[5].

Сфера застосування фармацевтична, харчова та біотехнологічна промисловість. Застосовують для крихких матеріалів.

Щокові дробарки- для дроблення твердих матеріалів, проте прості за конструкцією та малогабаритні[63].

Валкові дробарки з зубчатими валками- призначені для крупного і середнього дроблення м'яких і крихких порід (вугілля, антрацитів і сланців) при необхідності одержати грудковий дроблений продукт із невеликим вмістом дріб'язку[63].

Дробарки ударної дії- використовуються для крупного, середнього і дрібного дроблення матеріалів не тільки низької і середньої, але й підвищеної міцності[63].

Отже, проаналізувавши вище сказане можна зробити висновок, що доцільно використати молоткову дробарку.

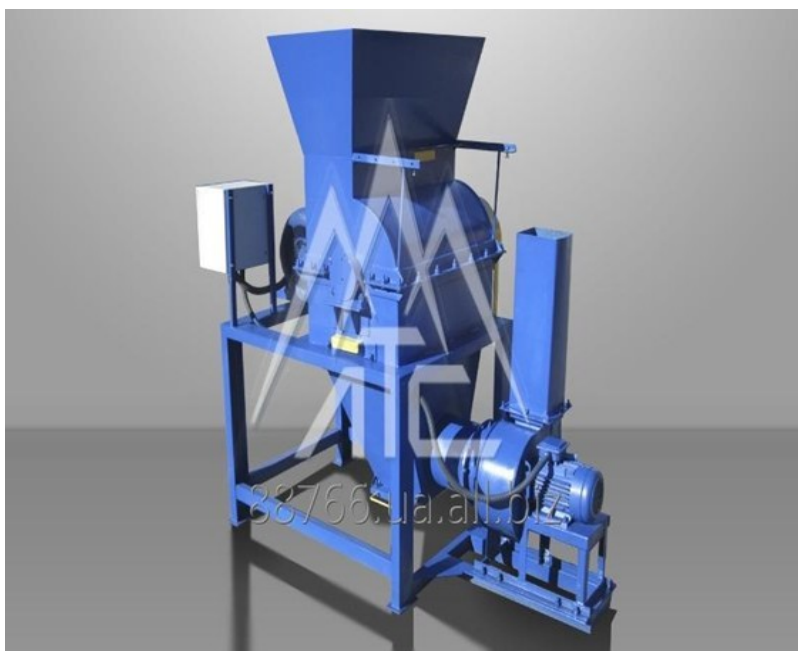


Рис. 5.12 Молоткова дробарка [5].

Наступним етапом є фасування, пакування та відвантаження готової субстанції. Пакування здійснюється, безпосередньо за допомогою пакувальної машина фірми “ПакТеч” серії “Мастадонт“. Для сипучих речовин в наш час повсюдно застосовуються фасувально-пакувальні машини. Їх продуктивність досягає приблизно 4т / год. Засувка вагового бункера відкривається і закривається за допомогою пневмоциліндра. Стрічка конвеєра нідерландського виробництва – харчова і має реборди з поліуретану. Сама ж фасувально-

пакувальна машина пересувна. Вона працює від мережі при 220 В, або ж від компресора при тиску 4-8 бар [64].

Обґрунтування упаковочного матеріалу: триптофан упаковують у водонепроникну упаковку з алюмінієвою фольгою, для унеможливлено потрапляння води до порошку триптофану і утворення недопустимих комків. Пакування буде проводитись у фольговані мішки об'ємом 5 кг, після чого мішки будуть збиратися у картонні коробки по чотири штуки.

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

1. Приготування розчину 0,1 М NaOH (гідроксиду натрія)[4].

До іонообмінної колонки в якості елюента (рухомої фази) подають 0,1М розчину NaOH для виключає необхідність регенерації сорбенту.

2.Після іонообмінної сорбції на аніоніті (ИА-1Р) використовуваному в Н⁺ формі та відокремлення на колонці домішок різної природи, здійснюємо десорбцію амінокислоти триптофану з даного аніоніту за допомогою 0,2 М HCl [4].

2.Приготування 1,5-3,0% розчин аміака, який використовується для елюювання амінокислоти триптофану з катіоніта (КУ-2-4).

Даний спосіб дозволяє дозволяє уникнути кристалізацію десорбованого триптофана і здійснити її у приймачі фракції елюата, і таким чином не потребуючи багатократного випарювання елюата[4].

3.Приготування льодяної оцтової кислоти для здійснення кристалізації триптофану у приймачі фракціях колонки з концентрацією 7 г/л, так як при охолодженні 0-15⁰С вона переходить в кристалічний стан[4].

4. Підготування охолодженого 70% етанолу для промивання випавших кристалів триптофану в ході кристалізації[4].

РОЗДІЛ 6. ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ

Продуктовий розрахунок, матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу, розрахунок технологічного обладнання для виробничого біосинтезу амінокислоти триптофану *E.colium*.TRTH0709

За розрахунками у розділі ТЕО річна потреба становить 8915 кг, продуктивність продуцента *E.coli*TRTH0709 становить 40,2 г/л. Таку кількість необхідно виготовити за $T_{рд} = 150$ трудоднів.

Максимальна концентрація цільового продукту при культивуванні накопичується у продуцента в кількості 40,2 г/л на середовищі наступного складу(г/л):

C_1 - Глюкоза 8
 C_2 - Дріжджовий екстракт 1,0
 C_3 - K_2HPO_4 4,0
 C_4 - $MgSO_4 \times 7H_2O$ 3,5
 C_5 - $(NH_4)_2SO_4$ 4.0
 C_6 - $C_6H_5O_7Na_3$ 2,5
 C_7 - $FeSO_4 \times 7H_2O$ 0,15
 C_8 – Розчин мікроелементів (г/л):
 $FeCl_3$ 0,278
 $NaMoO_4 \times 2H_2O$ 0,00002
 $MnSO_4 \times H_2O$ 2,0
 $ZnClO$ 15
 H_3BO_3 0,25
Всього $C_{\Sigma n} = 25,83$ г/л.

					НУХТ БТЕК 04.02.38				
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата					
Розробив	БагатиренкоД				Розділ 6. ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО		Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт								80	191
Керівник	Тетеріна С.М						Кафедра БТМ 77		
Н. Контр.									
	Пирог Т.П								

Для вирощування посівного матеріалу використовують середовище наступного складу (г/л):

C_1 - Глюкоза 50

C_2 - Дріжджовий екстракт 5,0

C_3 - K_2HPO_4 1,0

C_4 - $MgSO_4 \times 7H_2O$ 1,5

C_5 - $(NH_4)_2SO_4$ 2,0

C_6 - $C_6H_5O_7Na_3$ 1,5

C_7 - $FeSO_4 \times 7H_2O$ 0,001

C_8 - Тіамін 0.05

C_9 - Розчин мікроелементів (г/л):

$FeCl_3$ 0,278

$NaMoO_4 \times 2H_2O$ 0,00002

$MnSO_4 \times H_2O$ 2,0

$ZnClO$ 15

H_3BO_3 0,25

Всього $C_{\Sigma n} = 63,73$ г/л.

Відповідно до нормативно-технічної документації вміст сухих речовин в готовому продукті СРгп має складати 0,9-0,95%.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні показники:

- час роботи ферментера $T_{\text{цф}} = 50$ год, що включає в себе допоміжні стадії тривалістю 10 годин та 40 годин ферментації.

- $K_1 = 1,1$ – коефіцієнт запасу часу, що враховує можливість нестерильних операцій;

- Сумарні втрати продукту при виробництві $E_{\text{св}} = 0,10$;

- Коефіцієнт заповнення ферментера $K_{\phi}=0,6$
- Коефіцієнт заповнення посівного апарата $K_{\text{пш}} = 0,6$;
- Коефіцієнт заповнення колб $K_{\text{кол}} = 0,2$;
- Коефіцієнт заповнення збірника $K_{\text{зб}} = 0,8$;
- Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат по стадіям виділення готового продукту) $E_{\text{св}} = 0,10$;
- Концентрація посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка $X_{\text{вф}} - (0,05-0,1)$;
- Концентрація посівного матеріалу для посівних апаратів, частка $X_{\text{па}} - (0,02-0,1)$;
- Концентрація посівного матеріалу для інокуляторів, частка $X_{\text{ін}} - (0,02-0,1)$;
- Концентрація посівного матеріалу для качалочних колб, частка $X_{\text{кол}} - (0,02-0,1)$;
- Втрати посівного матеріал при його культивуванні в посівних апаратах, частка $E_{\text{па}} - (0,1- 0,2)$;
- Втрати посівного матеріал при його культивуванні в інокуляторах, частка $E_{\text{ін}} - (0,1- 0,2)$;
- Втрати посівного матеріал при його культивуванні в колбах, частка $E_{\text{кол}} - (0,01- 0,02)$;

6.1. Розрахунок кількості виробничих циклів.

Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

/ Кількість продукту на добу, в кг/добу;

$$G_{\text{нтд}} = G_{\text{нт}}/T_{\text{рд}} = 8915/150 = 59,4 \text{ кг/добу.}$$

/ Кількість триптофану за цикл, в кг/цикл;

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нтд}}T_{\text{цф}}/24 = 59,4 \cdot 50/24 = 124 \text{ кг/цикл.}$$

/ Кількість ферментацій (циклів) на рік (ціле число):

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нт}}/ G_{\text{цк}} = 8\,915/124 = 72$$

/ Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл), м3:

$$V_{кр} = K1G_{цк}C_{Ргп}/P_{кр} (1-E_{св}) = 1,1 \cdot 124 \cdot 0,94 / 40,2 \cdot 0,9 = 3,5 \text{ м}^3.$$

/ Вихід продукту з 1 м³ культуральної рідини, л/м³:

$$q_{ац} = G_{цк}1000/V_{кр} = 124 \cdot 1000 / 3,5 = 35,4$$

6.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

6.2.1. Приготування та стерилізація поживного середовищ для виробничого біосинтезу

Кількість поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) в ферментері до культивування становить:

$$V_{\phi} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{3,5}{1 - 0,1} = 3,9 \text{ м}^3$$

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = \frac{V_{\phi}}{1 + X_{\phi}} = \frac{3,9}{1 + 0,1} = 3,5 \text{ м}^3$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмф1} = V_{\phi} - V_{пс1} = 3,9 - 3,5 = 0,4 \text{ м}^3 = 400 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{зф} = 0,65$ його приблизний геометричний об'єм складе:

$$V_{гф} = \frac{V_{\phi}}{K_{зф}} = \frac{3,9}{0,65} = 6 \text{ м}^3$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{нф} = 6,3 \text{ м}^3$.

$$K_3 = 3,9 / 6,3 = 0,62.$$

6.2.2 Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$, складають: $G_{\text{ф}} = V_{\text{пс}} \times C_{\text{ф}} = 3,5 \times 25,83 = 90,4 \text{ кг}$

$$\text{Глюкоза} - G_1 = G_{\text{ф}} \times C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 8 / 25,83 = 28$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_2 = G_{\text{ф}} \times C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 1 / 25,83 = 3,5$$

$$K_2HPO_4 - G_3 = G_{\text{ф}} \times C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 4 / 25,83 = 13,9$$

$$MgSO_4 \cdot 7H_2O - G_4 = G_{\text{ф}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 3,5 / 25,83 = 12,2$$

$$(NH_4)_2SO_4 - G_5 = G_{\text{ф}} \times C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 4 / 25,83 = 13,9$$

$$C_6H_5O_7Na_3 - G_6 = G_{\text{ф}} \times C_6 / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 2,5 / 25,83 = 8,7$$

$$FeSO_4 \cdot 7H_2O - G_7 = G_{\text{ф}} \times C_7 / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 0,15 / 25,83 = 0,5$$

$$FeCl_3 - G_8 = G_{\text{ф}} \times C_8 / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 0,278 / 25,83 = 0,97$$

$$NaMoO_4 \cdot 2H_2O - G_9 = G_{\text{ф}} \times C_9 / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 0,00002 / 25,83 = 0,00007$$

$$MnSO_4 \cdot H_2O - G_{10} = G_{\text{ф}} \times C_{10} / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 2 / 25,83 = 6,9$$

$$ZnCl - G_{11} = G_{\text{ф}} \times C_{11} / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 0,15 / 25,83 = 0,5$$

$$H_3BO_3 - G_{12} = G_{\text{ф}} \times C_{12} / C_{\Sigma\text{ф}} = 90,4 \times 0,25 / 25,83 = 0,87$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Кількість води визначають за наступною формулою

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пс}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{дод.гл}} - V_{\text{мікроелем}} \times (V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}}),$$

де $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування середовища,

$V_{\text{дод.гл}}$ – об'єм води для приготування глюкози для додаткового підживлення

$V_{\text{мікроелем}}$ – об'єм води для приготування розчину мікроелементів, а $V_{\text{пс}} \times K_{\text{кон}}$ – загальна кількість утвореного конденсату.

В залежності від способу стерилізації та використовуваного обладнання величина $K_{\text{кон}}$ може складати:

$K_{\text{кон}} = 0$ при стерилізації в колбах на качалці;

У разі стерилізації компонентів поживного середовища у реакторі-змішувачі або у ферментері $K_{\text{кон}} = 0,1 - 0,15$;

При стерилізації компонентів в УБС $K_{\text{кон}} = 0,2$.

Якщо об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{\text{псф}} = 3,9 \text{ м}^3$, тоді приймаємо рішення, що стерелізуємо у реакторі змішувачі.

Тоді кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{фк}} = V_{\text{пс}} \cdot K_{\text{кон}} = 3,5 \times 0,1 = 0,35 \text{ м}^3 = 350 \text{ л.}$$

Під час біосинтезу триптофану необхідно досягти 50 г/л концентрації глюкози.

Таку кількість вуглецю вносити відразу недоцільно, бо це спричинятиме подовження лаг-фази та появу катаболітної репресії. Після 50 год культивування вносять підживлювальний розчин у вигляді 40 % розчину. Розрахунок підживлення наведено нижче;

Розрахунок глюкозного підживлення

Вихідні дані:

Об'єм поживного середовища без посівного матеріалу $V_{\text{пс}} = 3,5 \text{ м}^3$

Коефіцієнт заповнення $K_z = 0,6$

Кінцева концентрація джерела вуглецю $C_k = 50 \text{ г/л (кг/м}^3\text{)}$

Початкова концентрація джерела вуглецю $C_p = 40 \text{ г/л (кг/м}^3\text{)}$

Концентрація розчину підживлення $C_{\text{ж}} = 400 \text{ г/л (кг/м}^3\text{)}$

Кількість етапів підживлення $n = 2$

/ Розрахунок початкової маси джерела вуглецю

$$m_p = V_p \cdot C_p = 3,5 \cdot 40 = 140 \text{ кг}$$

/ Розрахунок сумарної кінцевої маси джерела вуглецю

$$m_k = V_p \cdot C_k = 3,5 \cdot 50 = 175 \text{ кг}$$

/ Розрахунок сумарної маси джерела вуглецю в підживленні

$$m_{\text{ж.сум.}} = m_k - m_p = 175 - 140 = 35 \text{ кг}$$

/ Розрахунок сумарного об'єму розчину підживлення

$$V_{\text{ж.сум.}} = m_{\text{ж.сум.}} / C_{\text{ж}} = 35 / 400 = 0,0875 \text{ м}^3 = 87,5 \text{ л}$$

/ Розрахунок одноразового об'єму розчину підживлення

$$V_{\text{ж}} = V_{\text{ж.сум.}} / n = 0,0875 / 2 = 0,04375 \text{ м}^3 = 43,75 \text{ л}$$

/ Розрахунок початкового об'єму культуральної рідини у ферментері

$$V_{p.k.} = V_p - V_{ж} = 3,5 - 0,043 = 3,45 \text{ м}^3$$

Загальна кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{вф} = V_{пс} - G_{ф} - V_{фк} - V_{зпідм} = 3500 - 90,4 - 350 - 87,5 = 2972,1$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів поживного середовища приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1 кг.

2972,1 л води необхідно розподілити між двома композиціями: термолабільними дріжджовим екстрактом та глюкозою (композиція А) та солями (композиція Б).

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 741.25 л.

Композиція А: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза } V_{1в} = V_{вф} (C_1 / C_{ф}) = 741.25(8/25,83) = 229.57 \text{ л}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт } V_{2в} = V_{вф} (C_2 / C_{ф}) = 741.25(1/25,83) = 28.69 \text{ л}$$

Отже, для приготування композиції А використаємо 258.26 л води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить, л:

$$V_{в} = 2965.1 - 741.25 = 2223.85 \text{ л}$$

Композиція Б: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$KH_2PO_4 V_{3в} = V_{3в} (C_3 / C_{п}) = 2230,1 (4/25,83) = 343.98 \text{ л}$$

$$MgSO_4 \cdot 7H_2O V_{4в} = V_{в} (C_4 / C_{п}) = 2230.85 (3.5/25,83) = 301.3 \text{ л}$$

$$FeSO_4 \cdot 7H_2O V_{5в} = V_{5в} (C_5 / C_{п}) = 2230.85 (0.15/25,83) = 12.9 \text{ л}$$

$$C_6H_5O_7Na_3 V_{6в} = V_{6в} (C_6 / C_{п}) = 2230.85 (2,5/25,83) = 215.23 \text{ л}$$

$$(NH_4)_2SO_4 V_{7в} = V_{7в} (C_7 / C_{п}) = 2230.85 (2,5/25,83) = 215.2 \text{ л}$$

$$FeCl_3 V_{8в} = V_{8в} (C_8 / C_{п}) = 2230.85 (0,278/25,83) = 23.9 \text{ л}$$

$$NaMoO_4 \times 2H_2O = V_{9в} (C_9 / C_{п}) = 2230.85 (0,00002/25,83) = 0.0017 \text{ л}$$

$$ZnCl = V_{10в} (C_8 / C_{п}) = 2230.85 (0,15/25,83) = 12.9 \text{ л}$$

$$H_3BO_3 = V_{11в} (C_6 / C_{п}) = 2230.85 (0,25/25,83) = 21.5 \text{ л}$$

$$MnSO_4 \cdot H_2O = V_{B12} (C_6/C_{\Pi}) = 2230.85 (2/25.83) = 172.1 \text{ л}$$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

$$\text{Композиція А} \quad V_{AB} = 741.25$$

$$\text{Композиція Б} \quad V_{BB} = 2230$$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

$$\begin{array}{l} \text{Композиція А} \\ \text{я А} \end{array} \quad - \quad V_{1к} = V_k (V_{AB} - V_B) = 350 \times (741.25 / 2965.1) = 87.5$$

$$\begin{array}{l} \text{Композиція Б} \\ \text{я Б} \end{array} \quad - \quad V_{2к} = V_k (V_{BB} - V_B) = 350 \times (2223.85 / 2965.1) = 262.5$$

Таблиця 6.14.

Композиції для стерилізації поживного середовища в ферментері

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,5 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	8	28	А	772,75
Дріжджовий екстракт	1	3.5		
Вода		741.25		
Конденсат		87,5		87,5
K ₂ HPO ₄	4	14	В	2282,8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	0,5		
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	14		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.5	12.25		
C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	2.5	8,8		
ZnCl ₂	0.15	0,5		
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.00002	0.00007		

H3BO3	0.25	0,9		
FeCl3	0.278	1		
MnSO4*H2O	2	7		
Вода		2230.1		
Конденсат		263		263
		87.5	Підж.р-н глюкози	87.5
Разом:		3500		3500

Окремо будуть готуватися титрувальні розчини в розрахунку 2 мл на 1 л середовища, отже $(3.5 \cdot 2) = 7$ л

6.2.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 400 л.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{1 - E_{\text{па}}} = \frac{400}{1 - 0,1} = 444 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{444}{1 + 0,1} = 404 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарата:

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 444 - 404 = 40 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення посівного апарата $K_{\text{зпа}} = 0,65$ його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{444}{0,65} = 683 \text{ л}$$

Обираємо серед стандартних ферментерів найближчий за об'ємом – 1000 л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{444}{1000} = 0,44$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 1000 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому обираємо апарат на замовлення - 800 л. Тоді

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{444}{800} = 0,56$$

6.2.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в інокуляторі геометричним об'ємом 400л.

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера:

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $G_{\text{ін}} = V_{\text{псін}} \times C_{\text{ф}} = 0.404 \times 63,73 = 25,7$ кг, в тому числі:

$$\text{Глюкоза} - G_1 = G_{\text{ін}} \cdot C_1 / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 50 / 63,73 = 20,1 \text{ кг};$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_2 = G_{\text{ін}} \cdot C_2 / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 5 / 63,73 = 2,01 \text{ кг};$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 - G_3 = G_{\text{ін}} \cdot C_3 / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 1 / 63,73 = 0,4 \text{ кг};$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\text{ін}} \cdot C_4 / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 1,5 / 63,73 = 0,6 \text{ кг};$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - G_5 = G_{\text{ін}} \cdot C_5 / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 2 / 63,73 = 0,8 \text{ кг};$$

$$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 - G_6 = G_{\text{ін}} \cdot C_6 / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 1,5 / 63,73 = 0,6 \text{ кг}$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_7 = G_{\text{ін}} \cdot C_7 / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 0,001 / 63,73 = 0,0004 \text{ кг};$$

$$\text{Tiamin} = G_{\text{ін}} \cdot C_8 / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 0,05 / 63,73 = 0,02 \text{ кг};$$

$$\text{FeCl}_3 = G_{\text{ін}} \cdot C_9 / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 0,278 / 63,73 = 0,112 \text{ кг};$$

$$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = G_{\text{ін}} \cdot C_{10} / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 0,00002 / 63,73 = 0,000008 \text{ кг};$$

$$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - G_{\text{ін}} \cdot C_{11} / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 2,0 / 63,73 = 0,8 \text{ кг};$$

$$\text{ZnCL} - G_{\text{ін}} \cdot C_{12} / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 0,15 / 63,73 = 0,06 \text{ кг};$$

$$\text{H}_3\text{BO}_3 - G_{\text{ін}} \cdot C_{13} / C_{\text{ф}} = 25,7 \cdot 0,25 / 63,73 = 0,1 \text{ кг};$$

$$\text{Визначаємо кількість конденсату } V_{\text{інк}} = V_{\text{псін}} K_{\text{кон}} = 404 \times 0,1 = 40,4 \text{ л}$$

$$\text{Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде } V_{\text{вф}} = V_{\text{псін}} - G_{\text{ін}} - V_{\text{інк}} = 404 - 25,7 - 40,4 = 338 \text{ л.}$$

Дану кількість води необхідно розподілити між двома композиціями: термолабільним дріжджовим екстрактом та глюкозою, тіаміном (композиція А) та солями (композиція Б).

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 84,25 л.

Композиція А: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза } V_{1\text{в}} = V_{\text{вф}} (C_1 / C_{\text{ф}}) = 84,25(50/63,73) = 66,09 \text{ л}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт } V_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2 / C_{\text{ф}}) = 84,25(5/63,73) = 6,6 \text{ л}$$

$$\text{Тіамін } V_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3 / C_{\text{ф}}) = 84,25(0,05/63,73) = 0,06 \text{ л}$$

Отже, для приготування композиції А використаємо 84,25 води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить, л:

$$V_{\text{в}} = 338 - 84,25 = 253,75 \text{ л}$$

Композиція Б: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 - V_{4\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4 / C_{\text{п}}) = 253,75(1/63,73) = 3,9 \text{ л}$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - V_{5\text{в}} = V_{\text{в}} (C_5 / C_{\text{п}}) = 253,75(1,5/63,73) = 5,9 \text{ л}$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - V_{6\text{в}} = V_{\text{в}} (C_6 / C_{\text{п}}) = 253,75(2/63,73) = 7,9 \text{ л}$$

$$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 - V_{7\text{в}} = V_{\text{в}} (C_7 / C_{\text{п}}) = 253,75(1,5/63,73) = 5,9 \text{ л}$$

$$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - V_{8\text{в}} = V_{\text{в}} (C_8 / C_{\text{п}}) = 253,75(0,001/63,73) = 0,004 \text{ л}$$

$$\text{FeCl}_3 - V_{9\text{в}} = V_{\text{в}} (C_9 / C_{\text{п}}) = 253,75(0,278/63,73) = 1,1 \text{ л}$$

$$\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} - V_{10\text{в}} = V_{\text{в}} (C_{10} / C_{\text{п}}) = 253,75(0,00002/63,73) = 0,00008 \text{ л}$$

$$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O} - V_{11\text{в}} = V_{\text{в}} (C_{11} / C_{\text{п}}) = 253,75(2/63,73) = 7,9 \text{ л}$$

$$\text{ZnCl} - V_{12\text{В}} - V_{\text{В}} (C_{12}/C_{\text{П}}) = 253,75(0,15/63,73) = 0,6\text{л}$$

$$\text{H}_3\text{BO}_3 V_{13\text{В}} = V_{13\text{В}} (C_{13}/C_{\text{П}}) = 253,75(0,25/63,73) = 1\text{л}$$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

$$\text{Композиція А} \quad - \quad V_{\text{АВ}} = 84,25$$

$$\text{Композиція Б} \quad - \quad V_{\text{БВ}} = 253,75$$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

$$\begin{aligned} \text{Композиція А} \quad - \quad V_{1\text{К}} &= V_{\text{К}} (V_{\text{АВ}} / V_{\text{В}}) = 40,4 \times \\ &\quad (84,25/338) = 10,05 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Композиція Б} \quad - \quad V_{2\text{К}} &= V_{\text{К}} (V_{\text{БВ}} / V_{\text{В}}) = 40,4 \times \\ &\quad (253,75 / 338) = 30,25 \end{aligned}$$

Таблиця 6.15.

Композиції для стерилізації поживного середовища в інокуляторі

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 404 середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	50	20,2	А	106,44
Дріжджовий екстракт	5	2,02		
Тіамін	0,05	0,02		
Вода		84,2		
Конденсат	10,7	10,05		10,04
K_2HPO_4	1	0,4	В	257,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	0,6		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	0,8		
$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$	1,5	0,6		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	0,0004		
FeCl_3	0,278	0,1		

NaMoO ₄ ×2H ₂ O	0,00002	0,000008		
MnSO ₄ ×H ₂ O	2	0,8		
ZnCl	0,15	0,06		
H ₃ BO ₃	0,25	0,1		
Вода		253,75		
Конденсат		30,25		30,25
Разом:		404		404

6.2.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 40 л.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмпа}}}{1 - E_i} = \frac{40}{1 - 0,1} = 44 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{44}{1 + 0,1} = 40 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарата:

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 44 - 40 = 4 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення посівного апарата $K_{\text{зпа}} = 0,65$ його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{44}{0,65} = 67,7 \text{ л}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{44}{100} = 0,44$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 100 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати цей посівний апарат. Тому обираємо 2 посівних апарати на замовлення - 80 л .

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{44}{80} = 0,55$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псп}} \text{ складаються:}$

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $G_{\text{ін}} = V_{\text{псін}} \times C_{\text{ф}} = 0,004 \times 63,73 = 2.5 \text{ кг, в тому числі:}$

$$\text{Глюкоза } G_1 = G_{\text{ін}} \cdot C_1 / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 50 / 63,73 = 1.9 \text{ кг;}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт } G_2 = G_{\text{ін}} \cdot C_2 / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 5 / 63,73 = 0.1 \text{ кг;}$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \text{ } G_3 = G_{\text{ін}} \cdot C_3 / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 1 / 63,73 = 0.03 \text{ кг;}$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\text{ін}} \cdot C_5 / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 1.5 / 63,73 = 0.05 \text{ кг}$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - G_5 = G_{\text{ін}} \cdot C_5 / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 2 / 63,73 = 0.7 \text{ кг;}$$

$$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 - G_6 = G_{\text{ін}} \cdot C_6 / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 1.5 / 63,73 = 0.5 \text{ кг}$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_{\text{ін}} \cdot C_7 / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 0,001 / 63,73 = 3,9 \text{ кг;}$$

$$\text{Тіамін} - G_{\text{ін}} \cdot C_8 / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 0,05 / 63,73 = 0,001 \text{ кг;}$$

$$\text{FeCl}_3 - G_{\text{ін}} \cdot C_9 / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 0,278 / 63,73 = 0,01 \text{ кг;}$$

$$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - G_{\text{ін}} \cdot C_{10} / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 0,00002 / 63,73 = 7,8 \text{ кг;}$$

$$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - G_{\text{ін}} \cdot C_{11} / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 2,0 / 63,73 = 0,07 \text{ кг;}$$

$$\text{ZnCL} - G_{\text{ін}} \cdot C_{12} / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 0,15 / 63,73 = 0,005 \text{ кг;}$$

$$\text{H}_3\text{BO}_3 - G_{\text{ін}} \cdot C_{13} / C_{\text{ф}} = 2.5 \cdot 0,25 / 63,73 = 0,009 \text{ кг;}$$

$$\text{Визначаємо кількість конденсату } V_{\text{інк}} = V_{\text{псін}} \cdot K_{\text{кон}} = 40 \cdot 0,1 = 4 \text{ л}$$

Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псін}} - G_{\text{ін}} - V_{\text{інк}} = 40 - 2.5 - 4 = 33,5 \text{ л.}$$

Дану кількість води необхідно розподілити між двома композиціями: термолабільним дріжджовим екстрактом та глюкозою, тіаміном (композиція А) та солями (композиція Б).

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 8,37 л.

Композиція А: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза } V_{1В} = V_{ВФ} (C_1/C_{Ф}) = 8,37 (50/63,73) = 6,6\text{л}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт } V_{2В} = V_{В} (C_2/C_{Ф}) = 8,37(5/63,73) = 0,65\text{л}$$

$$\text{Тіамін } V_{3В} = V_{В} (C_2/C_{Ф}) = 8,37(0,05/63,73) = 0,006\text{л}$$

Отже, для приготування композиції А використаємо 8,37 води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить, л:

$$V_{В} = 33,5 - 8,37 = 25,13 \text{ л}$$

Композиція Б: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 - V_{3В} = V_{В} (C_3/C_{П}) = 25,13 (1/63,73) = 0,4\text{л}$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - V_{4В} = V_{В} (C_4/C_{П}) = 25,13 (1,5/63,73) = 0,6\text{л}$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - V_{В} (C_5/C_{П}) = 25,13 (2/63,73) = 0,8\text{л}$$

$$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 - V_{В} (C_6/C_{П}) = 25,13 (2/63,73) = 0,8$$

$$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - V_{В} (C_7/C_{П}) = 25,13 (0,001/63,73) = 0,0004$$

$$\text{FeCl}_3 - V_{В} (C_8/C_{П}) = 25,13 (0,278/63,73) = 0,1$$

$$\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} - V_{В} (C_9/C_{П}) = 25,13(0,00002/63,73) = 0,000007$$

$$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O} - V_{В} (C_{10}/C_{П}) = 25,13(2/63,73) = 0,8$$

$$\text{ZnCL} - V_{В} (C_{11}/C_{П}) = 25,13(0,15/63,73) = 0,06$$

$$\text{H}_3\text{BO}_3 V_{В} (C_{12}/C_{П}) = 25,13(0,25/63,73) = 0,1$$

Отже, для приготування композиції В використаємо 25,13 л води, стерилізація буде проходити в інокуляторі.

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

$$\text{Композиція А} \quad V_{\text{АВ}} = 8,37$$

$$\text{Композиція Б} \quad V_{\text{БВ}} = 25,13$$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

$$\text{Композиції} \quad - \quad V_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (V_{\text{АВ}} \quad V_{\text{В}}) = 4 \times (8,37/33,5) = 1$$

я А

$$\text{Композиції} \quad - \quad V_{2\text{к}} = V_{\text{к}} (V_{\text{БВ}} \quad V_{\text{В}}) = 4 \times (25,13 \quad 33,5) = 3$$

я Б

Таблиця 6.16.

Композиції для стерилізації поживного середовища в інокуляторі

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 40л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	50	2	А	10,57
Дріжджовий екстракт	5	0,2		
Тіамін	0,05	0,002		
Вода		8,37		
Конденсат		1		1
K_2HPO_4	1	0.04	В	25,47
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	0.06		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	0,08		
$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$	1,5	0,06		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	0,00004		
FeCl_3	0,278	0,01		
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,00002	0,0000008		
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2	0,08		

ZnCL	0,15	0,006		
H ₃ BO ₃	0,25	0,01		
Вода	4,7	25,13		
Конденсат	3	3		3
Разом:	40			40

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_i = \frac{V_{\text{пмі}}}{1 - E_i} = \frac{4,0}{1 - 0,1} = 4 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{псі}} = \frac{V_i}{1 + X_i} = \frac{4}{1 + 0,1} = 3,64 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву інокулятора:

$$V_{\text{пмі}} = V_i - V_{\text{псі}} = 4 - 3,64 = 0,36 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення інокулятора $K_{\text{зі}} = 0,65$ його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_i}{K_{\text{зі}}} = \frac{4}{0,65} = 6,15 \text{ л}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_i}{V_{\text{гі}}} = \frac{4}{10} = 0,4$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 10 л. Але уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький, щоб обрати посівний апарат на замовлення- 8 л.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{4}{8} = 0,5$$

6.2.6 Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псі}}$ складають:

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища

$$G_{\text{ін}} = V_{\text{псі}} \cdot C_{\text{ф}} = 3,64 \times 63,73 = 231,9 \text{ г (0.231 кг)}, \text{ в тому числі:}$$

$$\text{Глюкоза} - G_1 = G_{\text{ін}} \cdot C_1 / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 50 / 63,73 = 181,9 \text{ г;}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_2 = G_{\text{ін}} \cdot C_2 / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 5 / 63,73 = 18,2 \text{ г;}$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 - G_3 = G_{\text{ін}} \cdot C_3 / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 1 / 63,73 = 3,6 \text{ г;}$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\text{ін}} \cdot C_4 / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 1,5 / 63,73 = 5,5 \text{ г;}$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - G_5 = G_{\text{ін}} \cdot C_5 / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 2 / 63,73 = 7,2 \text{ г;}$$

$$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 - G_6 = G_{\text{ін}} \cdot C_6 / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 1,5 / 63,73 = 5,5 \text{ г;}$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_7 = G_{\text{ін}} \cdot C_7 / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 0,001 / 63,73 = 0,003 \text{ г;}$$

$$\text{Тіамін} - G_8 = G_{\text{ін}} \cdot C_8 / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 0,05 / 63,73 = 0,2 \text{ г;}$$

$$\text{FeCl}_3 - G_9 = G_{\text{ін}} \cdot C_9 / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 0,278 / 63,73 = 1,01 \text{ г;}$$

$$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = G_{\text{ін}} \cdot C_{10} / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 0,00002 / 63,73 = 0,00007 \text{ г;}$$

$$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - G_{11} = G_{\text{ін}} \cdot C_{11} / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 2,0 / 63,73 = 7,3 \text{ г;}$$

$$\text{ZnCL} - G_{12} = G_{\text{ін}} \cdot C_{12} / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 0,15 / 63,73 = 0,5 \text{ г;}$$

$$\text{H}_3\text{BO}_3 - G_{13} = G_{\text{ін}} \cdot C_{13} / C_{\text{ф}} = 231,9 \cdot 0,25 / 63,73 = 1 \text{ г;}$$

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в інокуляторі гострою парою, $K_{\text{кон}} = 0,1$. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС у інокуляторі, з урахуванням того, що на композицію А взято 1,5 л води, становитиме:

$$V_{\text{кі}} = V_{\text{псі}} \times K_{\text{кон}} = (3,64 - 0,64) \times 0,1 = 0,3 \text{ л}$$

Загальна кількість води, яка необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища композиції Б:

$$V_B = V_{\text{пспа}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{кі}} = 3 - 0,231 - 0,3 = 2,46 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1 кг.

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 0,64 л.

3.2.7 Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

Композиція А: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза } V_{1B} = V_{\text{вф}} (C_1/C_{\text{ф}}) = 640(50/63,73) = 502.11$$

$$\text{Дріжджовий екстракт } V_{2B} = V_B (C_2/C_{\text{ф}}) = 640(5/63,73) = 50.2$$

$$\text{Тіамін } V_{3B} = V_B (C_3/C_{\text{ф}}) = 640(0,05/63,73) = 0,5$$

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить 2,46 л.

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

Композиція Б: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 V_{4B} = V_B (C_4/C_{\text{П}}) = 2460(1/63,73) = 38.6$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } V_{5B} = V_B (C_5/C_{\text{П}}) = 2460 (1,5/63,73) = 57.9$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = V_B (C_6/C_{\text{П}}) = 2460(2/63,73) = 77.2$$

$$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot V_B (C_7/C_{\text{П}}) = 2460(1,5/63,73) = 57.9$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot V_B (C_8/C_{\text{П}}) = 2460 (0,001/63,73) = 0.03$$

$$\text{FeCl}_3 \cdot V_B (C_9/C_{\text{П}}) = 2460 (0,278/63,73) = 10.7$$

$$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot V_B (C_{10}/C_{\text{П}}) = 2460 (0,00002/63,73) = 0.0007$$

$$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot V_B (C_{11}/C_{\text{П}}) = 2460 (2/63,73) = 77.2$$

$$\text{ZnCl}-V_{\text{B}} (C_{12}/C_{\text{П}}) = 2460(0,15/63,73) = 5.7$$

$$\text{H}_3\text{BO}_3-V_{\text{B}} (C_{13}/C_{\text{П}}) = 2460 (0,25/63,73) = 9.6$$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

$$\text{Композиція А} \quad V_{\text{АВ}} = 0,64$$

$$\text{Композиція Б} \quad V_{\text{БВ}} = 2,46$$

Таблиця 6.17.

Композиції для стерилізації поживного середовища в інокуляторі

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3640мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	50	182	А	840,5
Дріжджовий екстракт	5	18,2		
Тіамін	0,05	0,2		
Вода		640		
KH_2PO_4	1	4	Б	2499,01
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	6		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	7,3		
$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$	1,5	6		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	0,004		
FeCl_3	0,278	1,01		
$\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,00002	0,00007		
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	2	7,3		

ZnCl	0,15	1		
H ₃ BO ₃	0,25	1		
Вода		2460		
Конденсат		300		300
Разом:		3640		3640

6.2.7 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{кол}} = \frac{V_{\text{пмі}}}{1 - E_{\text{кол}}} = \frac{0,36}{1 - 0,02} = 0,37 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у колбах становитиме:

$$V_{\text{пск}} = \frac{V_{\text{кол}}}{1 + X_{\text{кол}}} = \frac{0,37}{1 + 0,1} = 0,34 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву колб:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пск}} = 0,37 - 0,34 = 0,03 \text{ л} = 30 \text{ мл}$$

3.2.8 Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пск}}$ складають:

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища

$$G_{\text{ін}} = V_{\text{пск}} \cdot C_{\text{ф}} = 0,34 \times 63,73 = 21,6 \text{ г, в тому числі:}$$

$$\text{Глюкоза} - G_1 = G_{\text{ін}} \cdot C_1 / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 50 / 63,73 = 21,5 \text{ г;}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт} - G_2 = G_{\text{ін}} \cdot C_2 / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 5 / 63,73 = 2,2 \text{ г;}$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 - G_3 = G_{\text{ін}} \cdot C_3 / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 1 / 63,73 = 0,4 \text{ г;}$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\text{ін}} \cdot C_4 / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 1,5 / 63,73 = 0,6 \text{ г;}$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - G_5 = G_{\text{ін}} \cdot C_5 / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 2 / 63,73 = 0,7 \text{ г;}$$

$$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 - G_6 = G_{\text{ін}} \cdot C_5 / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 1,5 / 63,73 = 0,5 \text{ г}$$

$$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_{\text{ін}} \cdot C_7 / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 0,001 / 63,73 = 0,0003 \text{ г};$$

$$\text{Тіамін} - G_{\text{ін}} \cdot C_8 / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 0,05 / 63,73 = 0,02 \text{ г};$$

$$\text{FeCl}_3 - G_{\text{ін}} \cdot C_9 / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 0,278 / 63,73 = 0,1 \text{ г};$$

$$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - G_{\text{ін}} \cdot C_{10} / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 0,00002 / 63,73 = 0,000007 \text{ г};$$

$$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - G_{\text{ін}} \cdot C_{11} / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 2,0 / 63,73 = 0,7 \text{ г};$$

$$\text{ZnCL} - G_{\text{ін}} \cdot C_{12} / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 0,15 / 63,73 = 0,05 \text{ г};$$

$$\text{H}_3\text{BO}_3 - G_{\text{ін}} \cdot C_3 / C_{\text{ф}} = 21,6 \cdot 0,25 / 63,73 = 0,08 \text{ г};$$

Враховуючи малу кількість компонентів, їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві, при цьому конденсат не утворюється.

Загальна кількість води, необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища, становитиме:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{кол}} - G_{\text{заг}} = 340 - 21,6 = 318,4 \text{ мл}$$

6.2.9. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, мл:

Композиція А: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза } V_{1\text{в}} = V_{\text{вф}} (C_1 / C_{\text{ф}}) = 318,4 (50 / 63,73) = 249,8 \text{ мл}$$

$$\text{Дріжджовий екстракт } V_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2 / C_{\text{ф}}) = 318,4 (5 / 63,73) = 24,9 \text{ мл}$$

$$\text{Тіамін } V_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3 / C_{\text{ф}}) = 318,4 (0,05 / 63,73) = 0,24 \text{ мл}$$

Композиція Б: Розраховуємо кількість води для розчинення

ПОКОМПОНЕНТНО, Л:

$$K_2HPO_4 V_{3B} = V_B (C_3/C_{II}) = 318,4(1/63,73) = 5 \text{ мл}$$

$$MgSO_4 \cdot 7H_2O V_{5B} = V_B (C_5/C_{II}) = 318,4(1,5/63,73) = 7,5 \text{ мл}$$

$$(NH_4)_2SO_4 = V_B (C_5/C_{II}) = 318,4 (2/63,73) = 1 \text{ мл}$$

$$C_6H_5O_7Na_3 V_B (C_5/C_{II}) = 318,4 (1,5/63,73) = 7,5 \text{ мл}$$

$$FeSO_4 \times 7H_2O V_B (C_5/C_{II}) = 318,4 (0,001/63,73) = 0,005 \text{ мл}$$

$$FeCl_3 V_B (C_5/C_{II}) = 318,4 (0,278/63,73) = 1,4 \text{ мл}$$

$$NaMoO_4 \times 2H_2O V_B (C_5/C_{II}) = 318,4 (0,00002/63,73) = 0,0001 \text{ мл}$$

$$MnSO_4 \times H_2O V_B (C_5/C_{II}) = 318,4 (2/63,73) = 10 \text{ мл}$$

$$ZnCl V_B (C_5/C_{II}) = 318,4 (0,15/63,73) = 0,7 \text{ мл}$$

$$H_3BO_3 V_B (C_5/C_{II}) = 318,4 (0,25/63,73) = 1,3 \text{ мл}$$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, мл:

$$\text{Композиція А} \quad - \quad V_{AB} = 249,8 + 24,9 + 0,24 = 274,9$$

$$\text{Композиція Б} \quad - \quad V_{BB} = 5 + 7,5 + 1 + 7,5 + 0,005 + 1,4 + 0,0001 + 10 + 0,7 + 1,3 = 34,4$$

Таблиця 6.18.

Композиції для стерилізації поживного середовища в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 340мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	50	17	А	294
Дріжджовий екстракт	5	2		
Тіамін	0,05	0,017		

Вода		275		
K ₂ HPO ₄	1	0,34	В	40,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	1		
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	1		
C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	1,5	1		
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	0,0003		
FeCL ₃	0,278	0,1		
NaMoO ₄ ×2H ₂ O	0,00002	0,000007		
MnSO ₄ ×H ₂ O	2	1		
ZnCl	0,15	0,1		
H ₃ BO ₃	0,25	1		
Вода		34,4		
Разом:		340		340

6.3. Розрахунок матеріального балансу.

Матеріальний баланс на один цикл виробництва.

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
<i>I</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл, кг)			
1.1.	Глюкоза	17		

1.2.	Дріжджовий екстракт	2		
1.3.	Тіамін	0,02		
1.4.	KH_2PO_4	0,34		
1.5	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1		
1.6.	ZnCl	0,1		
1.7.	H_3BO_3	1		
1.6.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1		
1.7.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1		
1.8.	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$	1		
1.9.	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,0003		
1.10.	$\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,00000007		
2.11.	FeCl_3	0,1		
2.12.	Вода	309,4		
2.13.	Всього:	340	Всього:	340
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (мл)			
2.1.	Нестерильне ПС		Стерильне ПС	
2.2	Всього:	340	Всього:	340
3.	ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ 400(мл)			
3.1.	Стерильне ПС	340	Посівний матеріал	360
3.2.	Посівний матеріал	30		
3.3	Втрати (частка)	0,02		7,4
3.4	Всього:	370	Всього:	370

4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (8л)			
4.1.	Глюкоза	182		
4.2.	Дріжджовий екстракт	18,2		
4.3.	Тіамін	0,2		
4.3.	K ₂ HPO ₄	4		
4.4.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	6		
4.5.	(NH ₄) ₂ SO ₄	7,3		
4.6.	C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	6		
4.7.	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0.004		
4.8.	NaMoO ₄ ×2H ₂ O	0.00007		
4.9	FeCl	1,01		
4.10.	H ₃ BO ₃	1		
4.11.	ZnCl	1		
4.12.	MnSO ₄ ×H ₂ O	7,3		
4.13.	Вода	2460		
4.14.	Всього:	3340	Всього:	3340
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА(8 л)			
5.1.	Нестерильне ПС	3340	Стерильне ПС	3640
5.2.	Конденсат	300	(втрат немає)	0,0
5.3	Всього:	3640	Всього:	3640
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ (8 л)			
6.1.	Стерильне ПС	3,64	Посівний	4,0

			матеріал	
6.3.	Посівний матеріал з колб на качалках	0,36		
6.4.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	0,4
6.5	Всього:	4.4	Всього:	4.4
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ (80 л)			
7.1.	Глюкоза	2	Нестерильне ПС	37
7.2.	Дріжджовий екстракт	0,2		
7.3.	Тіамін	0,002		
7.4.	K ₂ HPO ₄	0,04		
7.5.	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,06		
7.6.	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,08		
7.7.	C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	0,06		
7.8.	FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,00004		
7.9.	FeCl	0,01		
7.10.	H ₃ BO ₃	0,01		
7.11.	NaMoO ₄ × 2H ₂ O	0,0000008		
7.12.	MnSO ₄ × H ₂ O	0,08		
7.13.	ZnCl	0.006		
7.14.	Вода	33,5		
	Всього	36		36
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ (80 л)			

8.1.	Нестерильне ПС	36	Стерильне ПС	40
8.2.	Конденсат	4	(втрат немає)	0,0
8.3	Всього:	40		40
9.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ (80 л)			
9.1.	Стерильне ПС	40	Посівний матеріал	40
9.2.	Посівний матеріал інокулятора	4		
9.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	4
9.4	Всього:	44	Всього:	44

ПРОДОВЖЕННЯ ТАБЛИЦІ

з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
	2	3	4	5
10.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ (800л)			
10.1.	Глюкоза	20,2	Нестерильне ПС	363,6
10.2.	Дріжджовий екстракт	2,02		

0,3	Тіамін	0,02		
0.4.	K_2HPO_4	0,4		
0.5.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6		
0.6.	$(NH_4)_2SO_4$	0,8		
0.7.	$C_6H_5O_7Na_3$	0,6		
0.8.	$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,000 4		
0.9.	$FeCl_3$	0,1		
10.11.	$NaMoO_4 \times 2H_2O$	0,000 008		
0.12	$MnSO_4 \times H_2O$	0,8		
0.13	H_3BO_3	0,1		
0.14	$ZnCl$	0.06		
0.15	Вода	337,95		
10.6	Всього:	363,6		363,6
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 800 л			

2.1.	Нестерил ьне ПС	363,05	Стер ильне ПС	404
2.2	Конденса т	40	(втра т немає)	0,0
	Всього:	404	Всього: го:	404
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 800 л			
3.1.	Стерильн е ПС	404	Посів ний матеріал	400
3.2.	Посівний матеріал	40		
3.3	Втрати(частика)	0,1	Втра ти (кількість)	44
	Всього:	444	Всього: го:	444
4	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (кг, л)			
4.1	Глюкоза	28	Нестерильне ПС	3150
4.2	Дріжджо вий екстракт	3,5		
4.3	K ₂ HPO ₄	14		
4.4	FeSO ₄ ×7 H ₂ O	0.5		
	(NH ₄) ₂ SO	14		

4.5	4			
4.6	MgSO ₄ 7H ₂ O	12.25		
4.7	C ₆ H ₅ O ₇ N а ₃	8.8		
4.8	ZnCl ₃	0.5		
4.9	NaMoO ₄ × 2H ₂ O	0.000 07		
4.10	H ₃ BO ₃	0.9		
4.11	FeCl ₃	1		
4.12	MnSO ₄ ×H ₂ O	7		
4.13	Підж.р-н глюк.	87,5		
4.14	Вода	2972. 1		
	Всього:	3150	Всього:	3150
5	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (л)			
5.1	Нестерил ьне ПС	3150	Стерильне ПС	3500
5.2	Конденса т	350	(втрат немає)	
	Всього:	3500	Всього:	3500
6	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ (л)			
	Стерильн	3500	Культуральн	3510

6.1	е поживне середовище		а рідина	
6.2	Посівний матеріал 3 посівного апарата	400		
6.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	390
	Всього:	3900	Всього:	3900

Оскільки кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу ($3,5\text{ м}^3$) співпадає із кількістю культуральної рідини, визначеної відповідно у п. 1.4 розрахунку партій продукту (3510 л), вважаємо, що матеріальний баланс зроблено вірно.

Розрахунок технологічного обладнання

6.4. Розрахунок кількості виробничих ферментерів

4.1.1 Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_3 = 0,65$:

$$V_{\text{гф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{K_{3\text{ф}}} = \frac{3,9}{0,65} = 6 \text{ м}^3$$

4.1.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{\text{нф}} = 6,3 \text{ м}^3$.

4.1.3. Кількість виробничих ферментерів при заданому K_3 :

$$N_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{фг}}}{V_{\text{фт}}} = \frac{6}{6,3} = 0,95 = 1$$

4.1.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка, $K_{3\text{ф}}$

$$K_{3\text{ф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{V_{\text{фт}}} \times N_{\text{фт}} = \frac{3,9}{6,3} \times 1 = 0,62$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки ферментерів – 1 + 1 запасний.

6.5. Розрахунок кількості посівних апаратів

4.2.1. Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_3 = 0,65$:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{па}}} = \frac{444}{0,65} = 683,07 \text{ л}$$

4.2.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{\text{нпа}} = 1000 \text{ л}$.

4.2.3. Кількість посівних апаратів при заданому K_3 :

$$N_{\text{па}} = \frac{V_{\text{гпа}}}{V_{\text{нпа}}} = \frac{683,07}{1000} = 0,7$$

4.2.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення посівного апарату:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{нпа}} N_{\text{па}}} = \frac{444}{1000 \times 1} = 0,44$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчим є за об'ємом 1000л. Уточнений коефіцієнт заповнення низький, щоб обрати цей посівний апарат, тому обираємо посівний апарат на замовлення – 800л.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{нпа}} N_{\text{па}}} = \frac{444}{800 \times 1} = 0,55$$

6.6. Розрахунок кількості інокуляторів

4.3.1. Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $K_3 = 0,65$:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{і}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{44}{0,65} = 67,7 \text{ л}$$

4.3.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{\text{ні}} = 100 \text{ л}$.

4.3.3. Кількість інокуляторів при заданому K_3 :

$$N_{\text{і}} = \frac{V_{\text{гі}}}{V_{\text{ні}}} = \frac{67,7}{100} = 0,67$$

4.3.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення інокулятора:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{і}}}{V_{\text{ні}} N_{\text{і}}} = \frac{44}{100 \times 1} = 0,44$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом- 100 л. Уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький , щоб обрати цей посівний апарат, тому обираємо посівних апарата на замовлення - 80л.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_i}{V_{\text{ні}} N_i} = \frac{44}{80 \times 1} = 0,55$$

6.7. Розрахунок кількості інокуляторів

4.4.1. Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $K_3 = 0,6$:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_i}{K_{\text{зпа}}} = \frac{4}{0,65} = 6,2 \text{ л}$$

4.4.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{\text{ні}} = 10$ л.

4.4.3. Кількість інокуляторів при заданому K_3 :

$$N_i = \frac{V_{\text{гп}}}{V_{\text{ні}}} = \frac{6,2}{10} = 0,62$$

4.4.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення інокулятора:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_i}{V_{\text{ні}} N_i} = \frac{4}{10 \times 1} = 0,4$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом- 10 л. Уточнений коефіцієнт заповнення занадто низький , щоб обрати цей посівний апарат , тому обираємо посівних апарата на замовлення – 8л.

6.8. Розрахунок кількості качалочних колб

4.5.1. Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}} = 0,2$:

$$V_{\text{гколб}} = \frac{V_{\text{колб}}}{K_{\text{зколб}}} = \frac{0,75}{0,2} = 3,6 \text{ л}$$

4.5.2. Об'єм 1 качалочної колби - 0,75 л

4.5.3. Кількість качалочних колб при заданому коефіцієнті заповнення $K_{\text{колб}} = 0,2$:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмк}} / V_{\text{колб}} K_{\text{зколб}} = 0,39 / 0,75 \times 0,2 = 2,6 = 3 \text{ колб}$$

6.9. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 6.3 м³.

4.6.1. Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції

А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{Ar} = \frac{V_A}{K_{36}} = \frac{860,25}{0,8} = 1075,3 \text{ м}^3$$

4.6.2. Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{np} = 1,25 \text{ м}^3$.

4.6.3. Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{Ap} = \frac{V_{Ar}}{V_{np}} = \frac{1075,3}{1250} = 0,86 - \text{приймаємо } 1$$

4.6.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = \frac{V_A}{V_{np} N_{Ap}} = \frac{860,25}{1250 \times 1} = 0,7$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,6 – 0,75), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

4.6.5 *Уточнюючий розрахунок реактора для приготування та стерилізації підживлюючого розчину глюкози.*

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації підживлюючого розчину глюкози.

$$K_{36} = 0,8$$

$V_{Apa} = V_A / K_{36} = 87,5 / 0,8 = 109,3 \text{ л}$ - обираємо реактор хімічний емальований місткістю 160 л

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить :

$$N_p = V_{Apa} / V_{рст} = 87,5 / 160 = 0,5 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо

коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа} / (V_{рст} \times N_p) = 109,3 / 160 \times 1 = 0,7$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

4.6.6 Підбираємо геометричний об'єм збірника для приготування HCl та NaOH на стадії виробничого біосинтезу.

Необхідна кількість 6 % HCl – 7.8 л , готуємо 8 л.

$V_{Апа} = V_A / K_{зб} = 7,8 / 0,8 = 9,75$ л, обираємо реактор хімічний емальований місткістю 10 л

Кількість

реакторів при заданому $K_{зб}$ становить :

$$N_p = V_{Апа} / V_{рст} = 9,75 / 10 = 0,97 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо

коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа} / (V_{рст} \times N_p) = 9,75 / 10 \times 1 = 0,97$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 2 + 1 запасний.

Необхідна кількість 6 % NaOH на стадії виробничого біосинтезу.

Необхідна кількість 6 % NaOH – 7.8 л , готуємо 8 л.

$V_{Апа} = V_A / K_{зб} = 7,8 / 0,8 = 9,75$ л, обираємо реактор хімічний емальований місткістю 10 л

Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить :

$$N_p = V_{Апа} / V_{рст} = 9,75 / 10 = 0,97 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа} / (V_{рст} \times N_p) = 9,75 / 10 \times 1 = 0,97$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 2 + 1 запасний.

4.6.7. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 800 л

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{36}} = \frac{116,48}{0,8} = 145,6 \text{ л}$$

Вибираємо з найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}} = 0,16 \text{ м}^3$.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Аг}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{145,6}{160} = 0,9 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3p} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}} = \frac{116,48}{160 \times 1} = 0,73$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,6 – 0,75), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

4.6.8 Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 80 л

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{36}} = \frac{11,57}{0,8} = 14,5 \text{ л}$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 16 л.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Аг}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{14,5}{16} = 0,98 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = \frac{V_A}{V_{нр} N_{Ар}} = \frac{11,57}{16 \times 1} = 0,7$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

4.6.9 Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 8 л

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_6 = 0,8$:

$$V_{Ар} = \frac{V_A}{K_{зб}} = \frac{1,48}{0,8} = 1,85 \text{ л}$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 2 л.

Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_{Ар} = \frac{V_{Ар}}{V_{нр}} = \frac{1,85}{2} = 0,92 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = \frac{V_A}{V_{нр} N_{Ар}} = \frac{1,48}{2 \times 1} = 0,74$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображена на апаратурній схемі (в графічній частині), наведена в *таблиці 7.19*.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.38</i>			
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Багатиренко				Розділ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт							121	191
Керівник	Тетеріна С.М					Кафедра БТМ 115		
Н. Контр.								
Зав.Кафедр	Пирог Т.П							

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу триптофану

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Д1,Д5,Д9,Д20,Д27,Д32,Д39,Д43,Д48,Д50,Д54,Д59	Дозатор об'ємно-ваговий	12	Технічні ваги для дозування компонентів середовищ та для приготування мийно-дезинфікуючого засобу«Вімолу». Продуктивність: 1000 кг доз/ год. Похибка-1%. Виробник: «Хімтест» (Україна). ¹
М2,М6,М10,М21,М28,М33,М40,М44,М49,М51,М55,М60	Мірник	12	Габаритні розміри мм, не більше 400х680 Основна похибка при 20 °С,% 0.02 Маса, не більше, кг 9 Виробник Росія 'Еталон'' ²
Р3	Реактор-змішувач для проготування мийно-дезинфікуючого засобу	1	Реактор-змішувач об'ємом 3 м ³ , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, матеріал- сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
Н4,Н8,	Насос відцентровий	6	Насос Debem MB 100,

H13,H2 5,H36,H 47			ВИГОТОВЛЕНИЙ із високоякісної сталі. З продуктивністю 90,0 м³/год. Потужність електродвигуна-120кВт. Максимальна подача а насоса на висоту- 10 м. Виробник: «Debem» (Україна)⁴
P7	Реактор-змішувач для приготування розчину соляної кислоти	1	Збірник об'ємом 15 л, оснащений перемішувальним пристроєм, матеріал сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
Ф11,Ф2 2,Ф26,Ф 30,Ф34, Ф37,Ф4 1,Ф45,Ф 48,Ф52, Ф56,Ф6 1,Ф64	Індивідуальний фільтр стерильного повітря	13	Фільтр повітряний фірми Ultradepth ІІР-SRF. Фільтруючий матеріал: боросилікат. Діапазон температури від - 20 до 200 °С;ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %. Виробник: «Donaldson» (США).⁷
P12	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину NaOH	1	Реактор-змішувач об'ємом 15 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, сталь AISI 316.

			Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ПЗ14	Пристрій забірний	1	Містить корпус, транспортуючий трубопровід, магістраль подачі повітря. Повітрозбірник А1И-019.000-01.Оснащений металевою сіткою для видалення забруднення. Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент». ³
Ф15	Фільтр попередній	1	Робочий тиск- 16 (12 бар) Продуктивність -75 до 3600 Нм ³ / год Приєднання- 1/4 " до 3 "³
К16	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск- 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина). ³
Т17	Теплообмінник-охолоджувач	1	Повітренагрівач каналний водяний фірми SystemairVBR. Максимальний робочий тиск :1,6 МПа, при температурі води -100 ° С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁶

P18	Ресивер-вологовідділювач	1	Ресивер типу Р 270.600. Об'єм -270 л, робочий тиск -1,0 МПа. Виробник «ДНТ-Прайм Група компаній, ООО» (Росія). ²
T19	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач каналний, водяний фірми Systemair VBR. Максимальний робочий тиск- 1,6 МПа, при температурі води- 100 ° С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁶
Ф20	Фільтр головний	1	Фільтр (P)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча стальна сітка, швидкість фільтрування якого– 0,025 м/с, Е = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁷
P23	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції Б (2 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, матеріал-сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
P24	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А (2 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, матеріал- сталь AISI 316.

			Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ФР27	Ферментер (інокулятор) (8л)	1	Ферментер об'ємом 8 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, сталь AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) ³
Р31	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А (16 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 40 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
Р35	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції Б (5 л)	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою (1000 об/хв), матеріал -сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ФР38	Ферментер (інокулятор) (80л)	1	Ферментер об'ємом 80 л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, матеріал- сталь AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) ³
Р42	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 400л, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
Р46	Реактор-змішувач для попереднього розчинення	1	Реактор-змішувач об'ємом 200 л, оснащений сорочкою

	композиції Б		та лопатевою мішалкою, сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ФР49	Ферментер (інокулятор) (800л)	1	Ферментер об'ємом 800 л. Оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, матеріал-сталь AISI 316. Виробник: «Biostat»(Росія) ³
P53	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач , оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
P57	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції Б	1	Реактор-змішувач , оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
H58,H63,H66	Насос відцентровий	3	Насос Debem MB 100, виготовлений із високоякісної сталі. З продуктивністю -124,0 м ³ /год. Максимальна подача насоса на висоту- 10 м. Виробник: «Debem» (Україна) ⁴
P62	Реактор-змішувач для приготування та	1	Реактор-змішувач для приготування

	стерилізації підживлюючого розчину глюкози		підживлюючого розчину глюкози, оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, сталь AISI 316. Виробник: «BioTechno Group»(Росія) ³
ФР65	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 6300л, Діаметр-3,6м, висота- 12,96м. Оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником і перемішуючим пристроєм (3000 об/хв), матеріал сталь AISI 316L. Виробник: «BIOSTAT» (Росія). ³
366	Збірник	1	Збірник для зберігання мийно-дезінфікуючих розчинів «BioTechno Group» (Росія). Матеріал сталь нержавіюча AIS, оснащений перемішуючим пристроєм(450 об/хв). ³
Н67,Н7 8,Н80	Насос відцентровий	3	Насос Debem MB 100, виготовлений із високоякісної сталі. З продуктивністю -90,0 м3/год. Потужність електродвигуна – 120кВт.

			Максимальна подача насоса на висоту- 10 м. Виробник: «Debem» (Україна) ⁴
368	Збірник	1	Збірник для зберігання культуральної рідини після стадії ферментації «BioTechno Group» (Росія). Матеріал сталь нержавіюча AIS, оснащений перемішуючим пристроєм(3000 об/хв). ³
H69,H71,H72,H74	Насос відцентровий	4	Насос Debem MB 100, виготовлений із високоякісної сталі. З продуктивністю -124 м3/год. Потужність електродвигуна – 160кВт. Максимальна подача насоса на висоту- 10 м. Виробник: «Debem» (Україна) ⁴
Ц70	Саморозвантажна центрифуга	1	Центрифуга фірми «Laska» (Австрія) із самовивантаженням осаду, потужність електродвигуна, 1,1 кВт. Габарити, ШхГхВ, мм — 615х940х1550, швидкість обертання 12000 об/хв.

			Потужність: 40м ³ /хв. ³
373	Збірник	1	Збірник для зберігання супернатанту «BioTechno Group» (Росія). Матеріал сталь нержавіюча AIS, оснащений перемішуючим пристроєм. ³
УУ75,У У81	Ультрафільтраційна установка	2	Фільтрувальний елемент являє собою пучок порожнистих волокон виготовлених з гідрофільного матеріалу PVDF з номінальним розміром пор 0,001 мкм. Зовнішній діаметр волокон - 1,0 мм.
T76,T82 ,T84,T8 6	Транспортер стрічковий	4	Транспортер стрічковий, який дозволений на виробництвах харчових та біотехнологічних. Продуктивність – до 10 т/год. Довжина вивантаження-до 8 м. Виробник:’’ЕвроМаш’’ Україна. ³
ІК77,ІК 79	Колонна для іонообмінної сорбції.	2	Колонка для іонообмінної сорбції серії SF з макропористим сорбентом (аніонітом ІА-1Р)[14]. Колонка для іонообмінної

			сорбції з сорбентом (катіонітом КУ-2-4). Корпус колонки виконаний із зовнішньої оплеткой сталі з внутрішнім полімерним покриттям. Фірма-виробник Dow CHEMICAL, Rhom & Haas, Purolite.³
BC83	Вакуум сушка	1	Вакуум сушарка Juvenal, нерж. сталь SS304; рубашка: нерж. сталь SS304; ізоляція: нерж. сталь SS304, термометр: 0-150° C, вакуумметр: 0,098 МПа вакуумний насос: потужність: 1,1 кВт, ємність конденсатора: 1000кг⁴
Д85	Дробарка молоткова	1	Дробарка молоткова ДМ-60 Потужність -250 кВт Діаметр сита- 1,5 мм. Виконана з харчової нержавіючої сталі. Насипна щільність 0,2-0,8 кг/дм³ при вологості до 15 %. Виробник Швейцарія "Buhler"[5].

ФМ87	Пакувальна машина	1	Фасувально-пакувальна машина фірми “ПакТеч” серії “Мастадонт“, що дозволяє пакувати в тари від 2 до 50 кг, продуктивність 500 уп/год. ⁸
------	-------------------	---	--

*Примітка використання літ.джерела:

1- https://chemtest.com.ua/ua/vesovoe_oborudovanie-ua ;

2-<https://newfilter.com> ;

3 - <https://biostat.ru/> ;

4- www.debem.com.ua ;

5 - <https://prom.ua/Reaktory.html>;

6 - <http://www.dalgakiran.com.ua>;

7 - <http://www.emea.donaldson.com> ;

8 - <https://resiver.all.biz/resiver-r-270600-270-litrov-10-bar-g3418704>;

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу триптофану включає наступні допоміжні роботи (підготовку персоналу; приготування миючих та дезінфікуючих розчинів; підготовку виробничих приміщень; обладнання та комунікацій; аераційного повітря; підготовку і стерилізацію поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез амінокислоти триптофану, зберігання культуральної рідини, відділення біомаси, очищення цільової амінокислоти, сушіння амінокислоти).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва забезпечує, безпосередньо, якість та асептичність виробництва, безпеку праці, а також охорону здоров'я. Дана стадія виконується за вимогами нормативно – технічної документації, в якій і, описуються правила виробництва та контроль якості технологічного процесу.

ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфікуювальних засобів

ДР1.1.1 Підготовка робочого розчину для миття обладнання.

Робочий розчин дезінфікуючого засобу «Вімол» концентрацією 1 % готують в збірнику (РЗ). В реактор 4 м³ через об'ємно-ваговий, надходить 33 кг засобу, який потім змішується з питною водою 2,9 м³. Реактор оснащений сорочкою, що забезпечує підігрівання робочого розчину до оптимальної температури миття – 70-80 °С. Після 10 хвилинного перемішування отримаємо готовий підігрітий розчини для миття обладнання. що використовується на стадії ДР 1.2.1, ДР 1.2.2 та ДР 1.3.1. За допомогою СІП-мойки миючий розчин розподіляється до відповідного технологічного обладнання, яке використовується при виробництві цільової амінокислоти.

ДР 1.1.2. Підготовка робочого розчину для миття приміщення.

ДР1.1.2.1. Приготування робочого розчину «БіоЛонг» 8% для щоденного прибирання.

					НУХТ БТЕК 04.02.38			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив.	Багатиренко				Розділ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт							134	191
Керівник	Тетеріна С.М					Кафедра БТМ 127		
Н. Контр.	.							
Зав.Кафедр	Пирог Т.П							

Для приготування «БіоЛонг» 8% розчину у переносній ємності, об'ємом 15 л додають 0,8 л концентрата та додають 9,2 л водопровідної води та перемішують. Зміна ємності відбуваються кожні 30 м³ приміщення.

ДР 1.1.2.2. Приготування робочого розчину «БіоЛонг» 15% для генерального прибирання

Для приготування робочого розчину «БіоЛонг» 15% у переносній ємності, об'ємом 15 л додають 1,5 л концентрата після чого додають 8,5 л водопровідної води і перемішують. Зміна переносної ємності буде відбуваються кожні 30 м³ приміщення.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

На підприємстві з метою дотримання чистоти проводять щоденне та генеральне прибирання (1 раз на місяць) приміщень.

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Для щоденного прибирання виробничих приміщень підприємства використовуємо воду, а також миючі засоби. При проведенні вологого прибирання виробничих приміщень користуються 8 %-им розчином «БіоЛонг» (від ДР 1.1.2).

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання приміщень

При генеральному прибиранні виробничого приміщення застосовуємо 15%-ий розчин «БіоЛонг» (від ДР 1.1.3). Прибирання проводиться один раз на місяць. Миють двері, вікна, підлогу, контейнери для відходів, обробляють поверхні лабораторних приміщень: столи, підлогу, стіни і т.д.

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання

ДР 1.3.1. Миття та ополіскування ферментаційного обладнання

Миття обладнання здійснюється автоматизовано, за допомогою СІП-мийки, при цьому використовуємо мийний засіб в об'ємі 20% від геометричного об'єму обладнання. Обробку проводять 15-20 хвилин, після чого вже відпрацьований розчин подають на відновлення або зливають (ЗВ 20.2). Після обробки обладнання промивається питною водою, і таким же чином, відпрацьована вода йде на переробку.

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Після миття та ополіскування обладнання проводиться візуальний технічний огляд аби перевірити виявлення неущільнень в комунікаціях та в запірній апаратурі на обладнанні. Для усунення таких неущільнень, проводять підтягування різьбових з'єднань

ДР 1.3.3. Перевірка обладнання на герметичність

Перевірку на герметичність проводять створюючи в апараті тиск $P = 0,1 - 0,2$ МПа, таким чином перекривають вентиль подачі повітря та фіксують покази манометра на кришці самого апарату, а також час витримки (30–60 хв) в операційному журналі. Якщо ж падіння тиску не перевищує 0.01 МПа, тоді вважаємо, що апарат герметичний. В іншому ж випадку, здійснюють пошук неущільнень на апараті, і у місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями.

ДР 1.3.4. Стерилізація ферментаційного та післяферментаційного обладнання

Стерилізацію здійснюють гострою парою, безпосередньо, в апарат через барботер і нижній спуск, попередньо перед цим, відкривши вентиль виходу вже відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації в межах $t_{ст} = 130 - 135$ °С закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і потім витримують заданий час стерилізації. При стерилізації апарата, також паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

ДР 1.4 Підготовка персоналу

ДР 1.4.1 Навчання персоналу

Весь персонал, включно з тими людьми, які займаються складанням і технічним обслуговуванням, має проходити систематичне навчання, щодо правильного виробництва продукції в асептичних умовах, гігієни і основ мікробіології. Персонал, який працює на біотехнологічному виробництві, повинен проходити навчання аби кваліфіковано виконати свої обов'язки. Інструктаж проводиться 1 раз на рік.

ДР 1.4.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу

Персонал має бути одягнений у чистий робочий одяг, попраний та поправаний перед роботою, волосся повинно бути чисте та зв'язане. Персонал повинен мати чисті шапки, які будуть запобігати потрапляння сторонньої мікрофлори до технологічного процесу. Для миття рук, персонал використовує туалетне або господарське мило, для дезінфекції – 76% етиловий спирт.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

При визначенні місця забору атмосферного повітря, необхідно враховувати існуючі і можливі джерела газоподібних забруднень (автотранспорт; газоподібні; промислові викиди та інші фактори).

Враховуючи висоту будівлі підприємства, близько 13 м, забір атмосферного повітря відбуватиметься вже на висоті близько 2–4 м над будівлею, тобто 15 м. Забір здійснюється, безпосередньо, повітрозбірником (ПЗ – 14).

ДР 2.2. Грубе очищення повітря від пилу та часточок

На цій стадії з повітря видаляється ж основна маса великих механічних часточок, а також пилу. Для цього використовують фільтри грубої очистки (Ф15) Ступінь очищення, яких - 80 %.

ДР 2.3. Стиснення повітря

За допомогою турбокомпресора (К16) повітря стискають до 0,35–0,5 МПа, при цьому ж повітря нагрівається до 120–200 °С.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Щоб запобігти випаданню вологи в крапле-вловлювачі, для цього повітря «переохолоджують» до 25°C в теплообміннику. Далі у ресивері (Р-18) відбувається стабілізація вологості повітря $W = 60 \%$.

ДР 2.5. Стабілізація термодинамічних показників

Надалі, повітря підігрівають у теплообміннику (Т19) для забезпечення надійної роботи фільтрів в температурних межах 45-50°C. При таких температурах, також не відбувається конденсація пари на волокнах фільтра.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Очищення у головних ємнісних набивних фільтрах (Ф20) до ступеня очищення $E=95\%$. Головні фільтри ж, зазвичай, встановлюють поблизу ферментаційних відділень;

ДР 2.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (або колектори) подаємо до індивідуальних фільтрів, встановлених, безпосередньо, на ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення ($E=99,99\%$).

ДР 3. Підготовка титрувальних агентів

ДР 3.1 Підготовка титрувальних агентів для одержання посівного матеріалу.

Кількість титрантів (6 %-го розчину HCl та 6%-го $NaOH$), які необхідно приготувати становить 2 мл на 1 л середовища. Так як їх кількість на етапі підготовки середовищ для отримання посівного матеріалу об'ємом 8, 80 та 800 л є не великою, то доцільно буде об'єднати стадії приготування цих розчинів.

ДР 3.1.1. Приготування розчину 6% HCl

У колбу об'ємом 2 л вносять 746,8 мл питної води і 149,2 мл 36% соляної кислоти, перемішують та отримують 896 мл 6% соляної кислоти.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація розчину 6% $NaOH$

На технічних вагах у відтарованому хімічному стакані зважують 149,2 г їдкого натру, засипають у колбу об'ємом 2 л та додають 746,8 мл питної води отримують 896 мл 6% їдкого натру. Перемішують та стерилізують у автоклаві при температурі 131 °C протягом 30 хвилин.

ДР 3.2 Підготовка титрувальних агентів для біосинтезу.

ДР 3.2.1. Приготування 6% розчину HCl .

У реактор (Р7) об'ємом 15 л через об'ємно-ваговий дозатор вносять 5834 мл питної води і 1166 мл 36% соляної кислоти, перемішують та отримують 7000 мл 6% соляної кислоти.

ДР 3.2.2. Приготування розчину 6% NaOH

На технічних вагах зважують 1166 г їдкого натру, засипають у реактор об'ємом 15 л, через об'ємно-ваговий дозатор додають 5834 мл питної води отримуючи 7000 мл 6% їдкого натру. Перемішують та стерелізують пропусканням гострої пари при температурі 131 °С протягом 30 хвилин.

ДР 4. Приготування підживлюючого розчину глюкози.

ДР 4.1 Приготування та стерилізація підживлюючого розчину.

Готують розчин глюкози для підживлення культури після 14 години культивування. Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор (Р62) подають 35.5кг глюкози, до глюкози через об'ємно-ваговий дозатор додають 52 л води та поступово підігрівають суміш подаванням глухої пари у рубашку збірника при постійному перемішуванні для збільшення розчиненості глюкози. Стерилізацію проводять в збірнику при $t=112^{\circ}\text{C}$ та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР5. Приготування та стерилізація запасного розчину солі для накопичення інокуляту в колбах на качалці.

ДР 5.1 На технічні ваги ставимо хімічний мірний посуд, таруємо, засипаємо 1 г $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, додаємо 999 мл водопровідної води переносимо розчин у колбу об'ємом 2 л закриваємо колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 131°C та тиску 0,5 атм протягом 40 хв.

ДР 6. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів.

ДР 6.1. Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів для накопичення інокуляту

Використовується 2 мл розчину мікроелементів на 1 л поживного середовища, , кількість розчину мікроелементів становитиме - 1л. Стерилізація розчину мікроелементів буде проходити у колбі в автоклаві при температурі 131 °С протягом 30 хвилин.

Отже, на 1 л запасного розчину мікроелементів:

FeCl_3 -0,278г, $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -0,00002-г, на $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ - 2г, ZnCl -0,15г, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,001г таруємо та додаємо H_3BO_3 -0,25г, додаємо 997 мл водопровідної води, перемішуємо. Далі переносимо розчин мікроелементів разом із солями у мірну колбу об'ємом 3 л, закриваємо колбу ватно – марлевою пробкою і відправляємо на стерилізацію у автоклав при температурі 131°C та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

Запасний розчин (розрахований для 4-х стадій) зберігається в лабораторії.

ДР 7. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 7.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках)

На першій стадії необхідно приготувати 340 мл поживного середовища. Оскільки об'єм розчину мікроелементів невеликий та солі композиції В, на даній стадії ми опускаємо їх для розрахунку об'ємів композицій. Вміст компонентів для приготування 270 мл середовища наведено в *табл. 8.20*.

Табл. 8.20

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 340мл середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 340мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	50	17	А	294
Дріжджовий екстракт	5	2		
Тіамін	0,05	0,017		
Вода	217			
Розчин солі	0,34		В	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,5	1,14	С	

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4	1,36		
$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$	2,5	0,85		
Вода	2,5	100		
Розчин мікроелементів	0,34		D	0,34
Разом	340			340

ДР 7.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічні ваги ставимо мірний посуд, таруємо і зважуємо 17 г глюкози, таруємо і зважуємо ще 2 г дріжджового екстракту. Таруємо та зважуємо вже на аналітичних вагах 0,017 г тіаміну. Далі заливаємо 217 мл водопровідної води і ретельно перемішуємо суміш, щоб утворилася однорідна суспензія. Переносимо у мірну колбу об'ємом 1 л, закриваємо колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізуємо в автоклаві при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 7.1.2. Приготування і стерилізація композиції С

На технічних вагах у відтарованому хімічному посуді зважуємо $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -1 г, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ -1г, наважки вносять у колби об'ємом 250 мл додаємо 100 мл водопровідної води, проводимо стерилізацію в автоклаві закриваючи колби ватно-марлевою пробкою, стерилізуємо при 131°C упродовж 40 хв.

ДР 7.2. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 8 л(див.табл.5.21)

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно 4 л поживного середовища. Зазначимо, що 10% (0,4 л) припадає на посівний матеріал, а також 10% - це конденсат, що утворюється під час стерилізації середовища в посівному апараті. Враховуючи, що вміст розчину мікроелементів незначний, то їх не враховуватимемо при складанні об'ємів композицій.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3640мл середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3640 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	50	182	А	840,5
Дріжджовий екстракт	5	18,2		
Тіамін	0,05	0,2		
Вода		640		
KH_2PO_4	1	4	В	3123
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	6		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	7,3		
$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$	1,5	6		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	0,004		
Вода		2800		
Конденсат		300		
Розчин мікроелементів		0,4	С	0,4
Разом:		4 л		4 л

ДР 7.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічні ваги ставимо мірний посуд, таруємо і зважуємо 182 г глюкози, таруємо і сипемо ще 18,2 г дріжджового екстракту, у попередньо відтарованому стакані зважуємо 0,2 г тіаміну. Далі заливаємо 640 мл водопровідної води і ретельно перемішуємо суміш, щоб утворилася однорідна суспензія. Переносимо у реактор (Р24) об'ємом 2 л, і стерилізуємо в автоклаві при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР7.2.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах відтаровуємо хімічний мірний посуд та зважуємо 4 г KH_2PO_4 , таруємо та сипемо $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -6 г, відтаровуємо та сипемо $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 7,3г, таруємо та додаємо $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ -6г додаємо 2800 мл водопровідної води.

Солі розводять в збірнику, далі для змішування переносять у реактор (Р33) додають необхідний заздалегідь приготовлений запасний розчин мікроелементів (0,4 мл розчину) (від ДР. 6.1.) підкислюються 6%-вим розчином HCl (від ДР 3.1.1) до рН 4,0 – 4,5, де відбувається стерилізація гострою парою при температурі 131°C та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

ДР 7.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 80л (див.табл.8.22)

Табл.8.22

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 40л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 40л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	50	2	А	10,57
Дріжджовий екстракт	5	0,2		
Тіамін	0,05	0,02		
Вода		8,37		
Конденсат		1		1
K_2HPO_4	1	0.04	В	25,47
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	0.06		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	0,08		
$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$	1,5	0,06		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	0,00004		
FeCl_3	0,278	0,01		

NaMoO ₄ ×2H ₂ O	0,00002	0,00008		
MnSO ₄ ×H ₂ O	2	0,08		
ZnCL	0,15	0,06		
H ₃ BO ₃	0,25	0,01		
Вода	4,7	25,13		
Конденсат	3	3		3
Разом:	40			40

ДР 7.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор(Р 31) вносять 2 кг глюкози, 0,2 кг дріжджового екстракту, 0,02 кг тіаміну. Далі заливаємо через об'ємно-ваговий дозатор 8,37 л водопровідної води і вмикаємо перемішувальний пристрій для кращого розчинення, стерилізація у збірнику при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 7.3.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважуємо 0,04 кг КН₂РO₄, таруємо та сипемо MgSO₄·7H₂O -0,06 кг, відтаровуємо та сипемо (NH₄)₂SO₄ – 0,08кг, таруємо та додаємо С₆Н₅О₇Na₃-0,06кг, попередньо на аналітичних вагах зваживши FeSO₄×7H₂O -0,00004кг, таруємо та зважуємо FeCl₃-0,01 кг, попередньо зваживши на аналітичних вагах NaMoO₄×2H₂O -0,00008кг, таруємо та сипемо MnSO₄ ×H₂O -0,08 кг, таруємо та зважуємо ZnCl-0,06кг, таруємо та зважуємо Н₃ВO₃-0,25кг, солі переносять в збірник потім через мірник заливаємо 25,13 л, переносимо у реактор(Р35) і вмикають перемішувальний пристрій для кращого розчинення солей, розчин солей попередньо підкислюють 6%-й розчином соляної кислоти (від ДР3.1.1), після чого відбувається стерилізація компоненті гострою парою при температурі 131°C та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

ДР 7.4. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 800л (див.табл.8.23)

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 404л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 404 середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	50	20,2	А	106,44
Дріжджовий екстракт	5	2,02		
Тіамін	0,05	0,02		
Вода		84,2		
Конденсат	10,7	10,05		10,04
K_2HPO_4	1	0,4	В	257,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5	0,6		
$(NH_4)_2SO_4$	2	0,8		
$C_6H_5O_7Na_3$	1,5	0,6		
$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,001	0,0004		
$FeCl_3$	0,278	0,1		
$NaMoO_4 \times 2H_2O$	0,00002	0,00008		
$MnSO_4 \times H_2O$	2	0,8		
$ZnCl$	0,15	0,06		
H_3BO_3	0,25	0,1		
Вода		253,75		
Конденсат		30,25		30,25
Разом:		404		404

ДР 7.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор(Р42) подаємо 20,2 кг глюкози, 5,9 кг дріжджового екстракту, 0,02 кг тіаміну. Далі заливаємо через об'ємно-

ваговий дозатор 84,2л водопровідної води і вмикають перемішувальний пристрій. Стерилізуємо у збірнику при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 7.4.2. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор (Р45) подаємо 0,4 кг KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,6 кг, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,8кг , додаємо $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ -0,6кг , додаємо $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,0004кг попередньо зваживши на аналітичних вагах , FeCl_3 -0,1 кг , попередньо зваживши на аналітичних вагах $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -,000008кг, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ -0,8 кг, ZnCl -0,06кг, додаємо H_3BO_3 -0,1кг, потім через мірник заливаємо 253,73 л води і вмикають перемішувальний пристрій для кращого розчинення солей, розчин солей попередньо підкислюють 6%-й розчином соляної кислоти (від ДР3.1.1), після чого відбувається стерилізація компоненті гострою парою при температурі 131°C та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

Після чого відбувається стерилізація компонентів гострою парою при температурі 131°C та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

ДР 6.5. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6300л (див.табл.8.24)

Табл.8.24

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3500л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,5 м ³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	8	28	А	772,75
Дріжджовий екстракт	1	3.5		
Вода		741.25		
Конденсат		87,5		87,5
K_2HPO_4	4	14	В	2282,8
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15	0,5		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4	14		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.5	12.25		

$C_6H_5O_7Na_3$	2.5	8,8		
$ZnCl_3$	0.15	0,5		
$NaMoO_4 \times 2H_2O$	0.00002	0.00007		
H_3BO_3	0.25	0,9		
$FeCl_3$	0.278	1		
$MnSO_4 \cdot H_2O$	2	7		
Вода		2223.85		
Конденсат		262.5		262,5
		7 л	Розчин мікроелементів	7
		87.5	Підж.р-н глюкози	87.5
Разом:		3500		3500

ДР 7.5.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно- ваговий дозатор у реактор(Р53) подають 28 кг, 3,5кг дріжджового екстракту. Далі заливаємо 741,25 л водопровідної води ,вмикаємо перемішувальний пристрій. Стерилізуємо гострою парою при температурі 112°C та тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 7.5.2. Приготування і стерилізація композиції В

Через об'ємно – ваговий дозатор у реактор подають 14 кг KH_2PO_4 , 12,25кг $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$ – 14кг , $C_6H_5O_7Na_3$ -8,8кг, $FeSO_4 \times 7H_2O$ -0,5кг, $FeCl_3$ -1 кг , $NaMoO_4 \times 2H_2O$ -,00007кг, $MnSO_4 \times H_2O$ -7кг, $ZnCl$ -0,5кг, H_3BO_3 -0,9кг потім через об'ємно-ваговий дозатор заливаємо 2223,85 л , переносимо у реактор (Р57) вмикають перемішувальний пристрій для кращого розчинення солей, розчин солей попередньо підкислюють 6%-й розчином соляної кислоти (від ДР 3.1.3), після чого відбувається стерилізація компоненті гострою парою при температурі 131°C та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

Вміст з реактора подають у ферментер стерилізація компонентів гострою парою при температурі 131°C та надлишковому тиску 1,5 атм упродовж 40хв.

ДР 8 Підготовка 0,1М NaOH

ДР 8.1 Підготовка гідроксиду натрія для виключає необхідність регенерації сорбенту.

Для приготування 1000 мл 0,1 М розчину NaOH необхідно 4 г лугу. Так як густина даного лугу становить 2,13 г/см³, то для приготування 1000 мл 0,1 М розчину NaOH необхідно в колбу об'ємом 2 л внести 1,87 мл 0,1 М NaOH після чого внести воду об'ємом 998 мл, після чого змішати.

ДР 9. Приготування 0,2 М HCl із концентрованої 38 % кислоти.

ДР 9.1 Приготування 0,2 М HCl для десорбції амінокислоти з твердого носія іонообмінної колонки.

Для 1000 мл 0,2 М HCl необхідно приготувати 3,65 г соляної кислоти. Враховуючи, що в 100 г концентрованої HCl містить 38,32 г цієї кислоти, знайдемо в якому об'ємі знаходиться - 9,5 г кислоти. Так як густина даної кислоти -1,190 г/см³, то для приготування 1000 мл 0,2 М розчину HCl необхідно в колбу об'ємом 3 л внести 8 мл 0,2 М розчину та додати 992 мл питної води, після чого змішати.

ДР 10 Підготовка 3% розчину аміака

ДР 10.1 Підготовка 3 % розчину аміака для здійснення елюювання триптофана з катіоніту.

Для приготування 1000мл 3 % розчину аміака, необхідно в мірну колбу об'ємом 2л внести 0,12 л концентровано 25 % аміака, після чого додати 880 мл питної води, ретельно перемішати.

ДР 11. Підготовка концентрованої 96 % льодяної оцтової кислоти.

ДР 11.1 Підготовка льодяної оцтової кислоти для підкислення елюата.

Для здійснення кристалізації триптофану, необхідна концентрація льодяної оцтової кислоти 7 г/л, тоді для підкислення елюата необхідно підготувати 0,281 л охолодженої льодяної оцтової кислоти.

ТП 12. Підготовка посівного матеріалу

ТП 12.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *E. coli* шт. TRTH0709 зберігають у пробірках при $t=4^{\circ}\text{C}$. зі скошеним агаром (МПА). Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи за колекційною культурою проходять строго в асептичних умовах.

ТП 12.2. Одержання і вирощування робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з агаризованим середовищем, розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі із МПА в асептичних умовах, вирощують у термостаті при температурі 37°C , 24 години.

ТП 12.3. Вирощування культури в колбах на качалці

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л вносять в асептичних умовах композицію А (від ДР 7.1.1), композицію Б (від ДР 7.1.2), композицію С (від ДР 7.1.3). Перемішують і розливають в стерильні качалочні колби. У пробірку з робочою культурою *E.coli*, вирощену на м'ясо-пептонному агарі, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру) піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з поживним середовищем.

Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалці (200 об/хв) при $t = 30^{\circ}\text{C}$ упродовж 48 год. Значення рН = 7,0.

ТП 12.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 8 л

У попередньо простерилізований реактор, вносять через об'ємно-ваговий дозатор композицію А (від ДР 7.2.1), композиції Б (від ДР 7.2.2) і вмикають перемішуючий пристрій і перемішують упродовж 5 хв. Після перемішування через засівну колбу вносять інокулят (від ТП 8.3).

Вирощування посівного матеріалу проходить при 24°C упродовж 48 год. Під час культивування, кожні 8 годин відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 12.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 80 л

У інокулятор, що містить стерильну композицію В (ДР 7.3.1) подають стерильну композицію А (від ДР 7.3.2). Після чого поживне середовище підлужнюють стерильним розчином гідроксиду натрію (від ДР 3.1.2) до

оптимального значення рН 7,0. За допомогою труби перетискування у інокулятор подається посівний матеріал із ферментера 1 (ТП 8.4).

У кожух ферментера(ФР71) подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода. У ферментер подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 37 °С, тривалість – 24 год. Швидкість перемішування становить 200 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 800 л.

ТП 12.6 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 800л.

У реактор, що містить композицію А (ДР 7.4.1) через патрубков відкривши вентиль подають композицію В (від ДР 7.4.2). Після чого підлучнюють (розчином лугу від ДР 3.1.2) до оптимального значення рН (7,0). За допомогою труби перетискання у інокулятор подається посівний матеріал (ТП 8.5).

У кожух інокулятора подається гаряча та холодна вода, а також виводиться оборотна вода. У збірник подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 37°С, тривалість – 24 год. Швидкість перемішування становить 200 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор (ФР71) об'ємом 6300 л.

ТП 13. Біосинтез

ТП 13.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 6300 л

У ферментер (ФР65), зі стерильною композицією В подається по трубопроводах з збірника стерильна композиція А (від ДР 6.5.1.). Після чого поживне середовище підлучнюють стерильним розчином гідроксиду натрію (від ДР 3.1.4) до оптимального значення рН 7,0. За допомогою труби перетискування у інокулятор подається посівний матеріал із ферментера 1 (ТП 12.6). Вмикають перемішувальний пристрій та подачу аеруючого повітря (1-3 м³) при 3000 об/хв. Біосинтез проводять при t = 37 °С, що досягається за допомогою теплообмінного кожуха, протягом 40 год. В середовище додають стерильний підживлюючий

розчин глюкози (від ДР 4.1) починаючи з 15 години, остання порція підживлюючого розчину подається за 8 годин до завершення етапу біосинтезу. Біосинтез здійснюють при температурі 37°C впродовж 40 год. Культивування ведуть до досягнення максимального накопичення цільового продукту 40,2 г/л.

ТП 14. Відділення культуральної рідини від біомаси

Після ферментації культуральна рідина з ферментера подається у збірник (31), де і зберігається до початку виділення кінцевого продукту.

ТП 14.1 Центрифугування

Зі збірника (368) культуральна рідина насосом (Н69) подається до центрифуги с гравітаційним вивантаженням осаду (Ц70) при швидкості обертання 12000 об/хв, відділяємо біомасу протягом 20-25 хв.

Біомасу за допомогою механізму розвантаження викидають у приймач, та передають до ЗВ 21.3 (знешкодження твердих відходів). Супернатант подається до збірника (373) для подальшого очищення триптофану.

ТП 15. Очищення супернатанту

Зі збірника (373) супернатант подається насосом (Н74) до ультрафільтраційної установки (УУ75).

ТП 15.1 Ультрафільтрація

За допомогою насоса (Н74) супернатант перекачується на ультрафільтраційну установку (УУ75), з діаметром пор 0,001 мкм для очищення від сторонніх домішок, білкових молекул, мінеральних солей, тощо. Фільтрат направляють до (ЗВ 21.3) знешкодження рідких відходів). Відфільтрований триптофан подається до збірника за допомогою насоса 3 для подальшого очищення цільової амінокислоти.

ТП 15.2 Іонообмінна сорбція

Відфільтрований триптофан із збірника подається до іонообмінної колонки (ІК77), за допомогою транспортера (Н76) яка містить макропористий сорбентом аніоніт ІА-1Р, за допомогою якого відбувається очищення триптофану. Вилучення триптофану з твердого носія проводимо водою при кімнатній температурі, а також додатково здійснюємо десорбцію за допомогою 0.2 н HCl.

До іонообмінної колонки в якості елюента (рухомої фази) подають 0,1М розчину NaOH для виключає необхідність регенерації сорбенту. Вилучення триптофану з твердого носія проводимо водою при кімнатній температурі, а також додатково здійснюємо десорбцію за допомогою 0,2 н HCl. Після чого триптофан вмісний елюат від (ІК77) подається на колонку за допомогою насоса (Н78) із сульфаткатіоном КУ-2-8 (ІК79). Елюцію триптофана з катіоніта проводять 3 % розчином аміака при температурі 50 °С.

ТП 16. Кристалізація

У приймачі фракції здійснюється кристалізація триптофана за рахунок подачі льодяної оцтової кислоти (підкислення) з концентрацією 7 г/л. Температурний оптимум на даному етапі становить- 0-5⁰С . Після чого утворена кристалічна суспензія із приймача фракцій іонообмінної колони(ІК) насосом подається на етап ультрафільтрації до ультрафільтраційної установки УФ. з діаметром пор 0,001 мкм для очищення від сторонніх речовин, які були використані при елюції. Фільтрат направляють до ЗВ (знешкодження рідких відходів). Відфільтрований триптофан подається до кристалізатора охолоджуючого типу за допомогою насоса З для подальшого очищення цільової амінокислоти.

ТП 17 Ультрафільтрація триптофану

Від (ІК79) кристалічна суспензія подається до ультрафільтраційної установки (УУ61) з діаметром пор 0,001 мкм для очищення від сторонніх речовин, які були використані при елюції, а також оцтової кислоти. Фільтрат направляють до ЗВ (21.1 знешкодження рідких відходів). Кристали триптофана промиваються етанолом та за допомогою транспортера(Т62) подають до вакуум сушки.

ТП 18 Сушіння триптофану

Після ультрафільтрації від (УУ71) кристали триптофану через транспортер (Т72) подають до вакуумної сушки (ВС73).

ТП 18.1 Отримання порошкоподібного триптофану.

Вакуумне сушіння здійснюється в сушарці Juvenal з потужністю вакуумного насоса 1,1 кВт та ємністю конденсатора 1000кг (BC73), за допомогою якої буде видалятися волога з кристалів при температурі 60 °С протягом 4 годин . Сушка працює під стисненим повітрям від ДР 2.3

ТП 19 Дробіння

Із сушарки (BC73) сухий триптофан через транспортер(Т74) подають до молоткової дробарки(Д75), діаметр сита $d=1.5$ мм.

ПМВ 20. Пакування, маркування та відвантаження

З молоткової дробарки (Д75) через транспортер(Т76) порошок триптофану передається до пакувальної машини “Мастадонт” (ФМ 77).

ПМВ 20.1 Пакування в первинну упаковку

Після сушіння порошок триптофану подають до пакувальної машини (ПМ77) серії “Мастадонт”, куди також подаються крафтові мішки та поліетиленові пакети з фольговою оболонкою. Фасувальна машина містить автоматичний дозатор, за допомогою якого можна регулювати, яка кількість порошку буде фасуватись у мішки. Машина даного типу може фасувати та пакувати сипучі речовини у дози (порції) від 2-х до 50-ти кг. Пакування буде проводитись у фольговані мішки об’ємом 5 кг, після чого мішки будуть збиратися у картонні коробки по чотири штуки.

ПМВ 20.2 Маркування

Після пакування субстанції триптофану на первинну упаковку наносять маркування . Надалі картонні коробки (як було описано вище) передають на склад в зону карантину.

ЗВ 21. Знешкодження відходів

Відпрацьовані робочі розчини мийних та мийно-дезінфікуючих засобів, воду та аераційне повітря знешкоджують.

ЗВ 21.1. Знешкодження газоподібних відходів

Очищення викидів з ферментерів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодження газів, зниженням вологості вологовідбійниках з подальшим нагрівання, щоб уникнути попадання крапельної вологи і змочування фільтрів.

Під час очищення повітря, що входить в вентиляційну систему, використовують різноманітні фільтри з волокнистих матеріалів.

Очищене повітря викидається через трубу розсіювання .

ЗВ 21.2. Знешкодження рідких відходів

Для знешкодження рідких відходів доречно використовувати метод активного мулу. Для його реалізації потрібно створити систему неглибоких біологічних ставків, в яких іде змішування стічних вод з мулом, який утворився при попередньому окисленні стічних вод. В активному мулі багато таких мікроорганізмів, які ж і, завершують знешкодження стоку.

ЗВ 21.3. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи, а саме відфільтровану біомасу термічно інактивують.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж культивування періодично відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного, технологічного контролю на кожній стадії технологічного процесу. Визначають концентрацію цільового продукту; вмісту джерела вуглецю (глюкоза) і азоту(амінний); ідентифікацію та вологість цільового продукту, а також кількість цільової амінокислоти в готовому продукті.

9.1. Мікробіологічний контроль.

Мікробіологічний контроль здійснюється, безпосередньо, розсівом на чашки Петрі з агаризованим середовищем та аналізується за допомогою світлової мікроскопії.

При виявленні під час мікроскопіювання сторонніх мікроорганізмів культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром для виявлення дріжджів і грибів.

Критерієм чистоти культури є однорідність виростих колоній та відсутність колоній інших мікроорганізмів. Посіви інкубують 48 годин при температурі 37°C на середовищах. На щільних поживних середовищах (рис.9.13) колонії середнього розміру (2-4 мм), круглі, злегка опуклі, каламутні, з гладкою, блискучою поверхнею [1].

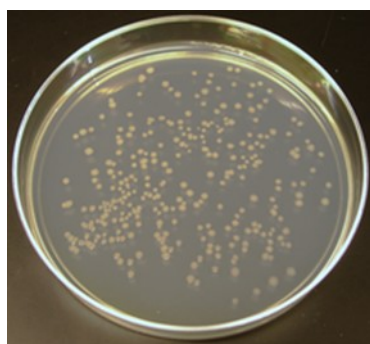


Рис. 9.13. Колонії *E.coli* на твердому поживному середовищі[36].

					НУХТ БТЕК 04.02.38			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив.	Багатиренко				Розділ 9. КОНТРОЛЬ 9.2 Мікроскопіювання ВИРОБНИЦТВА	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт							155	191
Керівник	Тетеріна С.М					Кафедра БТМ 148		
Н. Контр.								
Зав.	Пирог Т.П							

Для цього ж використовують препарат «роздавлена крапля». Для приготування препаратів за методом роздавленої краплі застосовують наступні етапи:

На поверхню чистого сухого предметного скла наносять краплю води, фізіологічного розчину або культуральної рідини, після чого скляною паличкою або ж бактеріологічною петлею в краплю вносять невеличку кількість досліджуваної культури і обережно розподіляють в рідині для отримання однорідної суспензії. При роботі з культурою тканин на предметне скло наносять краплю суспензії клітин в культуральній рідині. Приготовлену краплю в ході накривають покривним склом, але уникаючи утворення бульбашок повітря. Якщо частина рідини виступає за краї покривного скла, тоді ж надлишок середовища можна поглинути вузькою смужкою фільтрувального паперу[1].

При розгляданні колоній *E.coli* під мікроскопом можна побачити короткі поліморфні палички із заокругленими кінцями розміром в середньому: довжина - 0,5-1 мкм, і товщиною 0,4-0,6мкм. Мають перитрихіальне розташування джгутиків (див.рис 9.14.)[1].



Рис 9.14. *E.coli* під мікроскопом [42].

Під мікроскопом не повинна спостерігатися наявність сторонньої мікрофлори.

9.3. Визначення концентрації біомаси.

Концентрацію біомаси визначають непрямим методом за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за

допомогою калібрувального графіка. Визначення оптичної густини за допомогою значення OD660 з використанням 721 спектрофотометру [1].

9.4. Концентрація цільового продукту .

Визначення триптофану проводять наступним чином:

Для кількісного визначення триптофану відбираємо 1 мл проби із культуральної рідини та центрифугуємо протягом 10 хв при 12,790*г. Супернатант використовували для кількісного визначення накопичення цільової амінокислоти. Після чого супернатант передавали на систему HPLC, яка обладнана хроматографічною колонкою Aminex HPX-87H (300 мм × 7,8 мм; 9 мкм) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), температура якої підтримувалась при 50⁰С. Рухома фаза складається з 5 мм H₂SO₄ зі швидкістю потоку 0,5 мл/ хв. Тверда нерухома фаза складається із вугілля[1].

Усі метаболіти були виявлені детектором масиву фотодіодом при довжині хвилі 210 нм.

Накопичений L-триптофан кількісно визначався за допомогою ВЕРХ системи Agilent1100. Агілентну колону C18 з оберненою фазою (150 мм × 4,6 мм; 3,5 мкм) використовували з рухомою фазою 0,030% KН₂РO₄ і метанолу у співвідношенні 90:10 зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв при 39⁰С, при довжина хвилі 278 нм. Після чого розраховуємо середню площу піків. [1].

5.5. Концентрація вуглецевого компоненту глюкози

Визначення глюкози проводять наступним чином.

Для кількісного визначення глюкози, 1 мл проби із культуральної рідини центрифугували протягом 10 хв при 3000об/хв. Глюкозу визначали за допомогою лактонного біосенсора молочної кислоти SBA-40 C[1].

Суть методу полягає в тому, що після іммобілізації глюкозооксидази у складі мембрани з невеликим розміром пор і її розміщення на поверхні робочого електрода система починає функціонувати як біосенсор для визначення глюкози. Під дією ензиму глюкозооксидази глюкоза окиснюється з утворенням пероксиду водню та D-глюконолактону[1].

Глюконолактон спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон. Це, у свою чергу, спричинює зміну

провідності, яку можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача.

Протони, що утворюються в результаті цієї самої реакції, можна реєструвати також за допомогою потенціометричного перетворювача. У разі амперометричного визначення утворених у процесі глюкозооксидазної реакції пероксид водню відновлюється на аноді, що приводить до збільшення сили струму. Струм, який виникає під час вимірювання, пропорційний концентрації глюкози в зразку[1].

9.5 Концентрація амінного азоту

Метод формольного титрування

Суть методу полягає в тому, що аміногрупи амінокислот блокуються формальдегідом, а вільні ж карбоксильні групи, що залишилися- титрують лугом. За кількістю витраченого на титрування даного лугу визначають кількість COOH-груп. Число карбоксильних груп в амінокислотах в середньому приймають рівним числу аміногруп (що цілком справедливо для моноамінокислот, для діамінокислот вводяться відповідні поправки в методику титрування).

Для визначення амінного азоту до 1 мл супернатанту культуральної рідини отриманого під час центрифугування 10хв (3000об/хв) додають воду до загального об'єму 10 мл. При необхідності ж розчин нейтралізують потенціометрично до Рн В межф- 7,0, шляхом додавання 0,1 М розчину натрію гідроксиду або ж 0,1 М розчину соляної кислоти.

Після вже закінчення нейтралізації додають 2 мл розчину формальдегіду 35%, який попередньо нейтралізований в день аналізу 10% розчином натрію гідроксиду до рН 7,0, а також перемішують і титрують 0,1 М розчином натрію гідроксиду до значення рН 9, 1, що, і не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або ж до появи слабо рожевого забарвлення (індикатор - 1% розчин фенолфталеїну). Паралельно проводять контрольний дослід (паралельно титрують дистильовану воду).

1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає- 1,4 мг амінного азоту [65].

Мікробіологічна чистота для готового продукту триптофану відповідно до вимог ДФУ, 2.6.12, 2.6.13 : Критерії прийнятності мікробіологічної чистоти для неводних лікарських засобів для орального застосування (ДФУ, 5.1.4): - загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) ≤ 103 КУО/г; - загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) ≤ 102 КУО/г; - Відсутність *Escherichia coli* в 1 г[18].

Кількісне визначення триптофану в готовому продукті (ноотропні таблетки) . Кількісне визначення. Випробування проведено відповідно до вимог ДФУ, 2.2.29 за методикою, яку наведено нижче. Випробування проведено відповідно до вимог ДФУ, 2.2.29 за методикою, яку наведено нижче. При аналізі було використано умови хроматографування та аналітичне обладнання.

Приготування випробовуваного розчину. Близько 450 мг (точна наважка) розтертих таблеток поміщають в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 15,0 мл дистильованої води, збовтують протягом 15 хв, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 5,0 мл фільтрату. Розчин застосовують свіжоприготованим[18].

Приготування розчину порівняння. Розчин порівняння 1. 200 мг (точна наважка) L-триптофану розчиняють в 10 мл води в мірній колбі на 25 мл і доводять водою до мітки. Хроматографують випробовуваний розчин та розчин порівняння не менше трьох разів та розраховують середню площу піків . Дослідження проводили з використанням модульної системи для ВЕРХ (BISCHOFF Analysentechnik GmbH, Німеччина) зі спектрофото-метричним детектором Lambda 1010. 7 Для проведення кількісного визначення діючих речовин методом ВЕРХ, використовували: • Колонка Prontosil Eurobond C 18 розміром 250 × 4,6 мм, з діаметром часток 5 мкм чи аналогічну, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»; • Елюент: 10 % метанолу - 90% фосфатного буферу, що містить 0,68 г/л дигідрофосфату калія та фосфатну кислоту (рН 3). • Швидкість рухомої фази: 1 мл / хв; • Довжина хвилі детектору 220 нм; • Об'єм введеної проби: 10 мкл; •

Температура термостату колонки: + 25 °С; . Таким чином встановлюємо, що в досліджених серіях вміст L-триптофану становить від 198,10 мг до 202,08 мг, що відповідає вимогам ДФУ (регламентація вмісту L-триптофану - 200 мг $\pm$ 5%)[18].

Ідентифікація триптофану.

Для ідентифікації амінокислот використовують спеціальні прилади – аналізатори. Для ідентифікації самого триптофану буде використаний амінокислотний аналізатор “ААА-400” в основі роботи якого, закладений принцип рідинної іонообмінної хроматографії. Даний прилад дає нам змогу ідентифікувати до 200 амінокислот, як вільних так і, зв’язаних. Для початку ж аналізу, необхідно, внести досліджуваний зразок в спеціальну лунку, тоді прилад почне автоматично аналізувати, а також видасть графік (рис.9.15.), вже по якому і можна буде визначити амінокислоту [66]. На хроматограмі випробовуваного розчину, отриманій при кількісному визначенні, час утримування основного піку L-триптофану має співпадати з часом утримування піку L-триптофану на хроматограмі розчину порівняння 1 (ДФУ, 2.2.29).

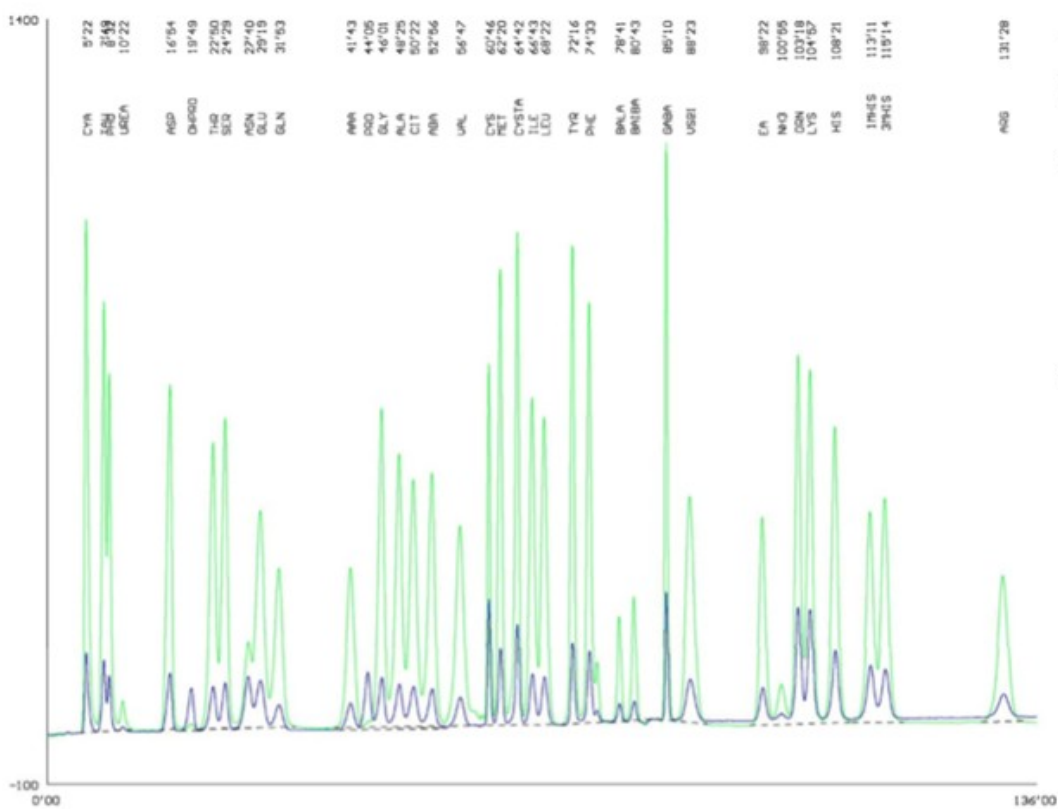


Рис.9.15. Графік аналізатора амінокислот

Визначення вологості триптофану.

Контроль вологості кінцевого продукту буде проводитися за допомогою аналізатора вологості “OHAUS MB25” даний сучасний прилад, який дасть змогу швидко, а головне точно визначити вміст води в цільовій амінокислоті. Принцип роботи: досліджуваний зразок зважують, після чого нагрівають до зазначеної температури за спеціально розробленими методиками і режимами, після чого його знову ж зважують і визначають різницю, яка дорівнює втраті води [67].

Таке дослідження дозволяє нам виявити та визначити масову частку вільної води та зв'язаної води. Аналізатор води OHAUS MB 25 розроблений на основі передових технологій відокремлення води від загальної маси досліджуваного матеріалу, а також проведення аналітичного контролю втрати маси після дії на неї теплового випромінювання [67].

Пристрій MB 25 американської компанії OHAUS вважають класичним вимірювальним приладом з відносною точністю контролю 0,05%. Робочий діапазон температури сушіння лежить в межах 50...160 °C, а дискретність зміни такої температури складає - 5 °C. Максимальна вага зразка, який досліджують- 110 г [67].

Особливості OHAUS MB 25:

- * Зручний рідкокристалічний дисплей для виводу інформації про дану вологість; температуру зразка, а також його масу в режимі он-лайн.

- *Наявність портативного принтера SF40A.

- *Точність контролю маси зразка, який досліджується- до 5мг.

- *Легкість, а також простота очищення вологоміра вже після закінчення вимірювальних робіт.

- *Отриманий результат досліджень відповідає вимогам GLP/GMP [67].

Таблиця 9.25

Карта постадійного контролю біосинтезу триптофану шляхом культивування
E.coli

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1 Приготування робочого розчину «Вімолу»	Концентрація засобу Вімолу	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=1%
Кх 1.1.2 Приготування робочого розчину БіоЛонгу	Концентрація БіоЛонгу	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=8%
Км 1.2.1 Щоденне прибирання виробничих приміщень	Підлога, обладнання. Чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Відсутність бруду та пилу
Км 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень	Підлога, стіни, вікна, двері, обладнання. Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Відсутність бруду та пилу, КУО <500/см ²
Кт 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання	Концентрація мийного розчину, час миття, температура, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час операції	C=2%, t=45°C, τ=1 год, чисте обладнання
Кт 1.3.2 Технічний огляд	Міцність з'єднань	Перевірка на міцність з'єднань	Перед перевіркою на герметичність	Відсутність послаблення між частинами на обладнанні
Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Герметичність обладнання, час перевірки	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно протягом перевірки	P=0,1-0,2 МПа, τ=30-60 хв
Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання	Температура стерилізації, тиск під час стерилізації, тривалість	Технічний манометр, годинник	Тиск визначається протягом стерилізації	t=110°C, P=0,2 МПа, τ=30-60 хв
Кт 2.1 Забір повітря	Висота забору повітря	Висота труби забору	Протягом всього циклу виробництва	H=13 м

1	2	3	4	5
Кт 2.2 Попереднє грубе очищення	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	E=75%, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Повітря після компресорування	P=0,4 МПа, t=250°C
Кт 2.4 Охолодження повітря і видалення вологи	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	t=18-19°C, W=60%
Кт 2.5 Підігрів повітря	Підігрите повітря, температура	Термометр технічний	Після нагріву повітря	t=30-35°C
Кт 2.6 Очищення повітря на головному фільтрі	Очищене повітря, перепади тисків, ступінь очищення повітря на виході з фільтра	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	E=95%, тиск згідно паспорту
Кт 2.7 Очищення повітря на індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах	E=99,999%
Кх, 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 Приготування 6% розчину HCl	Концентрація HCl,	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=6%
Кх, Кт, Км 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 Приготування стерильного 6% розчину NaOH для посівних апаратів об'ємом 4,40 та 400 л	Концентрація NaOH, температура, час, стерильність	Хімічний метод, термометр, годинник	Після приготування розчину, тиск і температуру перевіряють безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод	C=6%, t=131°C, P=0.15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Приготування і стерилізація підживлюючого розчину глюкози	Підживлюючий розчин глюкози Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112°C, τ= 30 хв, P=0,05 МПа відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 6.1 Приготування і стерилізація додаткового розчину мікроелементів	Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ= 40 хв, P=0,15 МПа відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1.1, 7.2.1, 7.3.1, 7.4.1, 7.5.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °C, τ=30 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.2.2, 7.3.2, 7.4.2, 7.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція В Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ= 40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1.2, Приготування і стерилізація композиції С	Композиція С Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °C, τ=40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 8.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник	Мікробіологічний контроль	t=4°C, відсутність сторонньої мікробіоти
Км 8.2 Одержання робочої культури	Колекційна культура Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин	t= 37 °C, τ= 24 год Відсутність сторонньої мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 8.3 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, $\omega = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти $C_{\text{біом.}} = 0,5-0,6$ г/л
Кт, Км 8.4 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 8 л	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси, джерела вуглецю та азоту	Датчик рН годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, колонка для газової хроматографії, спектрофотометр	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту – кожні 8 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\omega = 200$ об/хв, $P_{\text{надл.}} = 0,02$ МПа, $pH = 7$, відсутність сторонньої мікробіоти $C_{\text{біом.}} = 0,5-0,6$ г/л
Кт, Км 8.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 80 л	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси, джерела вуглецю та азоту	Датчик рН, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, колонка для газової хроматографії, спектрофотометр	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту – кожні 8 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\omega = 200$ об/хв, $P_{\text{надл.}} = 0,02$ МПа, $pH = 7$, відсутність сторонньої мікробіоти, $C_{\text{біом.}} = 0,5-0,6$ г/л

1	2	3	4	5
Кт, Км 8.6 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 800 л	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси, джерела вуглецю та азоту	Датчик рН, годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп, колонка для газової хроматографії, спектрофотометр	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту – кожні 8 годин, концентрація біомаси в кінці культивування	$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24\text{ год}$, $\omega = 200\text{ об/хв}$, $P_{\text{надл.}} = 0,02\text{ МПа}$, $pH = 7$, відсутність сторонньої мікробіоти, $C_{\text{біом.}} = 0,5-0,6\text{ г/л}$
Кт, Кх, Км 9.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 6,3 м ³	Культуральна рідина , тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури,	Датчик рН годинник, термометр технічний, тахометр, манометр, мікроскоп, колонка для газової хроматографії, спектрофотометр, випарна установка	рН визначають в останні години культивування; температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання та визначення концентрації джерела вуглецю та азоту – кожні 8 годин	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ год}$, $\omega = 300-900\text{ об/хв}$, $P_{\text{надл.}} = 0,02\text{ МПа}$, $pH = 7$, відсутність сторонньої мікробіоти $C_{\text{біом.}} = 1,0-1,2\text{ г/л}$,
Кт.14.1 Центрифугування культуруальної рідини	Швидкість обертів, час	Датчик швидкості обертів за хвилину	Швидкість обертів визначають безперервно під час центрифугування	$T = 20-25\text{ хв}$, $v = 12000\text{ об/хв}$
Кт 16 Сушіння	Діаметр частинок	Аналізатор	Температура	$T = 60^{\circ}\text{C}$

РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

10.1. Опис функціональної схеми автоматизації

Автоматизація — це один із напрямів науково-технічного прогресу, застосування саморегулюючих технічних засобів; економіко-математичних методів і системам управління, які ж і, звільняють людину від участі у процесах отримання, перетворення, передачі, а також використання, матеріалів або інформації, які зменшують ступінь цієї ж участі чи трудоємкості виконуваних операцій. Потребує додаткового застосування: датчиків (сенсорів), пристроїв введення, управляючих пристроїв (контролерів), тощо.

Мета автоматизації — це підвищення продуктивності праці, а також іполіпшення якості продукції, а також оптимізація управління, усунення людини від виробництв[68].

Процес біосинтезу триптофану проходить у ферментері об'ємом 6,3 м³.

Культуральна рідина після ферментеру за допомогою насоса потрапляє в збірник, де і зберігається, після чого вже з нею проводять подальші роботи, а саме відділення біомаси (центрифугуванням),очищення цільової амінокислоти, отримання кристалічної субстанції (кристалізація), сушка кристалів амінокислоти та дробіння кристалічного порошку, на виході цих процесів отримує порошкоподібну субстанцію триптофану, яка в подальшому буде використовуватись в складі БАД.

Збірник для зберігання культуральної рідини повинен бути обладнений термометром, мішалкою та датчиком, що вказує на рівень рідини.

Процес триває при температурі 37°C з постійно ввімкнутою мішалкою (3000 об/хв). Температуру регулюємо за допомогою сорочки, встановленої, безпосередньо, на збірнику.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.38</i>			
Зм.	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив.	Багатиренко				Розділ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	Літера	Аркуш	Аркушів
Консульт	Романов М.С						167	191
Керівник	Тетеріна С.М					<i>Кафедра БТМ</i> 160		
Н. Контр.								
Зав.Кафедр	Пирог Т.П							

**10.1 Формуванням завдання на розробку системи автоматизації.
Завдання на розробку схеми автоматизації**

Таблиця 10.26

Машина, апарат	Пар аметр, місце відбору сигналу	Доп устиме значення параметру	Вид автоматизації	Хар актер контролю управління	Засоб и управління та контролю, реалізація управляючої дії
Ферментер	Температура КР	37±2 °С	Контрол ь, регулюв ання	Мон іторинг	Керува ння аналоговим пневматичним клапаном (подача води у сорочку)
	Оберти перемішуюч ого пристрою	3000 об/хв	Контрол ь, управлін ня	Пок ази	Керува ння двигуном (дискретне)
	pH	7,2	Контрол ь	Мон іторинг	Керува ння аналоговим пневматичним клапаном (подача натрій гідроксиду)
	Конц-рація кисню	Концентраці я розчиненого кисню на рівні вище 50%	Контроль, регулювання Підтримання на заданому значенні Сигналізація при значному відхиленні	Моніторинг	Керування аналоговим пневматичним клапаном (подача стисненого очищеного повітря)

				(світлова)		
		Рівень піни	Заданий рівень	Контроль, регулювання	Реєстрація, Сигналізація	Керування двигуном піногасника (дискретне)

10.2 Опис схеми автоматизації зі специфікацією засобів автоматизації

Біосинтез триптофану у ферментері:

Контур 1. Рівень піни в інокуляторі вимірюється спеціальним ємнісним датчиком з електропередачею сигналу (поз. 1а). Дискретний сигнал від датчика подається на ПЛК і приводить таким чином у дію виконуючий механізм – двигун піногасника М (поз. КМ1). Уніфікований сигнал до ВМ надходить з панелі керування (поз. 1б).

Контур 2. Показник рН необхідно фіксувати як і під час процесу біосинтезу так і, при здійсненні допоміжних робіт (стерилізації поживного середовища). Значення рН ж вимірюється первинним перетворювачем (потенціометричним датчиком рН-метра) (поз. 2а). Аналоговий сигнал від датчика подається на ПЛК і перетворюється у цифровий. При відхиленнях значення рН подача луку автоматично дозується регулюючим органом – це аналогова заслінка. (поз. 2д), що приводиться в дію за допомогою мембранного виконавчого механізму (поз. 2г). Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить, безпосередньо з електро-пневмоперетворювача (поз. 2в). Паралельно ж дані фіксуються на ПК і при таких значних відхиленнях- сигналізують оператора (технолога) для подальших технологічних дій.

Контур 3. Показник вмісту розчиненого кисню у культуральній рідині вимірюється, безпосередньо, рідинним газоаналізатором (поз. 3а). Аналоговий сигнал від датчика подається на МПК і перетворюється у цифровий, в залежності від інтенсивності споживання кисню мікроорганізмами, автоматично дозується подача аераційного повітря пари, безпосередньо, в інокулятор регулюючим органом – аналоговою заслінкою (поз. 3д), що і приводиться в дію за допомогою

мембранного виконавчого механізму (поз. 3г). Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить вже з електро-пневмоперетворювача (поз. 3в).

Контур 4. Температура культуральної рідини вимірюється постійно за допомогою- термоелектричного перетворювача (термопари) (поз. 4а). Сигнал від термодатчика у вигляді величини термоелектрорушійної сили (ТЕРС) надходить в нормуючого перетворювача (поз. 4б) і перетворюється в уніфікований електричний сигнал. Останній йде до ПЛК, конвертуючись у цифровий. При відхиленнях температури (екзотермічний процес) подача води технічної холодної в сорочку інокулятора відбувається автоматично дозується виконавчим механізмом – насосом М (поз. КМ2). Уніфікований електричний сигнал до ВМ надходить з електроперетворювача (поз. 4в).

Регулювання перемішуючого пристрою. При натисканні кнопки- «Пуск» на моторі М (поз. КМ3) відбувається перемішування культуральної рідини і в апараті із заданою частотою обертів. Керування можна здійснювати як по місцю за допомогою ключа керування, так і на щиті (панель дистанційного ручного керування).

Таблиця 10.27

Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Позиція	Параметр	Місце устано вки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлюв ач
1	2	3	4	5	6
1a	Рівень	По місцю	Ємнісний датчик для безконтактного контролю положення предметів, виготовлених з електропровідних і не електропровідних матеріалів, відстань спрацьовування до – 4...25 мм, максимальна частота 50 Гц, вихід - дискретний	EC3025 PPAPL	Carlo Gavazzi
1б	Рівень	По місцю	Блок ручного управління імпульсними виконавчими механізмами, вхід – імпульсний, вихід – імпульсний, перехід ручний/автоматични й режим	БРУ5	ТОВ «Мікрол» Україна
КМ1	Рівень	По місцю	Магнітний пускач, робочий струм – 7 А, потужність двигуна – 3 кВт, управляючий сигнал – 220 В	3RT2015 -1AP01	SIEMENS
2a	pH	В агрегаті	pH електроди, матеріал – скло, пластик, діапазон вимірювань pH 1...12, максимальна температура – до 80 градусів С, максимально допустимий тиск – 6 бар	APS	Kobold

1	2	3	4	5	6
2б	pH	По місцю	Перетворювач вимірювання pH і окисно-відновного потенціалу, аналоговий вихід	APM-Z	Kobold
2в	pH	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вихідний сигнал – 4...20 мА, вихідний сигнал 20...100 кПа	2713-WP	Dwyer
3а	Розчинений кисень	В агрегаті	Промисловий екстрактивний газоаналізатор 3-х компонентний, CO – 0...250 мг/м ³ , CO ₂ – 0...400 мг/м ³ , SO ₂ – 0...400 мг/м ³	ULTRA- MAT 23	SIEMENS
3б	Розчинений кисень	По місцю	Перетворювач вимірювання O ₂ , аналоговий вихід	ULTRA- MAT 23	SIEMENS
3в	Розчинений кисень	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вихідний сигнал – 4...20 мА, вихідний сигнал 20...100 кПа	2713-WP	Dwyer
3г	Розчинений кисень	По місцю	Мембранний виконавчий механізм прямої дії для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал – 20...100 кПа, крутячий момент – 5...30 нм/бар, кут повороту – 90°	KUP	Kobold
4а	Температура КР	В агрегаті	Термоелектричні перетворювачі (термопари), матеріал– латунь, градувальна характеристика хромель-копель (К), діапазон вимірювань: – 50...+1100°C, клас точності – 1,0.	1-3, ТХА (К)	ПАО «Тера» Україна

4б	Температура КР	На щиті	Універсальний нормуючий перетворювач для встановлення в шкаф управління, вихідний сигнал термометра опору/термопари, вихідний сигнал – 4...20 мА, напруга живлення --= 24 В	НПТ1	Овен
4в	Температура КР	На щиті	Перетворювач частоти серії Altivar61, потужність – 45 кВт, максимальний струм – 94 А	ATV61 HD45N4	Schneider Electric
4г	Температура КР	По місцю	Пульт управління перетворювачем частоти, графічний термінал	VW3A1101	Schneider Electric
КМ2	Температура КР	По місцю	Магнітний пускач, робочий струм – 7 А, потужність двигуна – 3 кВт, управляючий сигнал – 220 В	3RT2015- 1AP01	SIEMENS
5а	Температура	По місцю	Датчик термоперетворювач опору ТСП, НСХ- Pt100, діапазон (0 – 100)°С, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА	TCM0193- 01 ЧТП	“Теплоприбор” м. Челябинск
5б	Рівень	По місцю	Контактний датчик рівня, з вихідним сигнал по напрузі	SITRANS L Pointek CLS 200	ДП “Сименс Україна” м.Київ
Км 3	Оберти	По місцю	Частотний перетворювач	Altivar 71	“СВ Альтера” м.Київ

Список використаної літератури:

- 1) *Tong Shen, Qing Liu, Xixian Xie, Qingyang Xu, and Ning Chen* . Improved Production of Tryptophan in Genetically Engineered Escherichia coli with TktA and PpsA Overexpression//Journal of Fermentation and Bioengineering, -2012. –P-345.
- 2) Триптофан у складі БАД для спортсменів.[Електронний ресурс].-Режим доступу: <https://ru.iherb.com/pr/now-foods-l-tryptophan-500-mg-120-veggie-caps/13859?gclid=CjwKCAjwxOvsBRAjEiwAuY7L8iWtJsYARXir5D6Zb7AX2-mkuAKwUifB3JTjAuzz4K WpnuMquF6ixoCunQQA vD BwE&gclsrc=aw.ds>
- 3) Саморозвантажна центрифуга [Електронний ресурс]Режим доступу :http://elib.hduht.edu.ua/bitstream/123456789/3473/1/2017_поз.35.pdf
- 4) Патент РФ № 2000130511/28, 23.07.1980. Выделение L-триптофана // Патент России № 2122745. 1980. Бюл. № 33. / С.Н. Шолин А.Ф, Рошаль Е.Р.
- 5) Молоткова дробарка. [Електронний ресурс]Режим доступу: <https://www.fora-zakhid.com.ua/ua/obladnannja/molotkova-drobarka/>
- 6) Незаменимые аминокислоты.[Електронний ресурс]Режим доступу: <https://ru.depositphotos.com/>
- 7)Недоліки та переваги триптофану. [Електронний ресурс] Режим доступу: [https:// L-tryptophan#section=FIFRA-Requirements](https://L-tryptophan#section=FIFRA-Requirements)
- 8)*О.В Швед, О.Б Миколів, О.З Комаровська-Порохнявець, В.П Новіков*. Екологічна біотехнологія: Навчальний посібник.-2-е вид.-Львів:Львівська Політехника,2010.-368с.
- 9) *Лобова О.В, Пилипчук О.О*.Біотехнологія :Конспект лекцій .-Київ,2014.-83с.
- 10)Аналіз суміші L-триптофану на організм людини [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://pharmed.zsmu.edu.ua>
- 11)*Candida utilis* продуцент триптофана . [Електронний ресурс]Режим доступу: <http://tehnohimicheski-kontrol/>
- 12)*Ткаченко А.Ф, Бейко Н.Є, Хоменко А.І, Шульга С.М*. Мутантний штам *Bacillus subtilis* IFBG МК-1 з підвищеним вмістом триптофану// BIOTECHNOLOGIA ACTA-2013.-V.6,№6.- Р.-105-111

13)Шульга С.М, Ткаченко А.Ф, Тигунова Е.А, Бейко Н.Е. Влияние компонентов энзимической среды на биосинтез триптофана-2011.-Т.4,№3.- Ст.- 52-55.

14)Молекулярна маса триптофана.[Електронний ресурс]Режим доступу: <https://books.google.com.ua/>

15) Gorelik V.S., Umarov M.F. Photoluminescence spectra in polycrystals of chirally pure and racemic phases of tryptophan //J. Optics and Spectroscopy. – 2018. – Vol.125, N 1. –P. 144–147

16)Алешкова А.В. Пищевая промышленность- индустрия инноваций: монография/А.В Алешкова.- Хабаровск: РИЦ ХУЭП, 2016.-188С.

17)Препарат L-Тryptophan. Цитовір. Аміносол. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.vidal.by/poisk_preparatov/tryptophan.html

18)Підбір оптимальних умов аналізу суміші L-триптофану та тіотриазоліну методом ВЕРХ/ Кучеренко Л.І, Борсук С.О, Мазур І.А. // “Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики”:Международ. Научн.- практ.журн. 2018. Том11, №2(27). С.-142-147.

19) Западнюк В.И. Аминокислоты в медицине / В.И. Западнюк, Л.П. Купраш, М.И. Заика [и др.] – К.: Здоров'я, 1982. – С.-200

20) Отримання триптофану. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://orgchem.ru/chem5/n44.htm>

21)Ціни на компоненти поживного середовища. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://prom.ua/>

22) Пирог Т.П, Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ,2009.-336с.

23)Тіамін. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://moz.gov.ua/article/health/scho-treba-znati-pro-tiamin---vitamin-v1>

24) Германов Н.И. 'Микробиология' - Москва: Просвещение, 2010 - с.227.Режим доступу : <http://biologylib.ru> , вільний.

25) Зображення *E.coli* під мікроскопом. Зображення *E.coli* на диференційно-діагностичних середовищах. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.google.com.ua/search?q=зображення+e.сшдш&sxsrf=ALeKk01RGaaw2>

[6Ot56T17VQERt8eDF1-](#)

[Pw:1590172037050&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjvq5m7jMjpAhVQxIsKHUx5DWkQ_AUoAXoECAsQAw&biw=884&bih=418#imgsrc=K0Jp1UuIUlFYrM](#)

26) [Електронний ресурс]// Філогенетична класифікація, 2010-. -Режим доступу: https://works.doklad.ru/view/ZXgVzRx_qmg.html, вільний.

27) Кривша С.П. Нарушение сна в лечении.-2019 рік [Електронний ресурс].-Режим доступу: <https://www.apteka.ua/article/32856>

28) Способи приймання та дозування триптофану.[Електронний ресурс].-Режим доступу: <https://www.obozrevatel.com/health/lekarstva/triptofan-instruktsiya-po-primeneniyu-tsena-kupit.htm>

29) Люди, які стикаються з безсонням. 2012 [Електронний ресурс].-Режим доступу: <https://vgolos.com.ua>

30) Перепис населення 2019 [Електронний ресурс].-Режим доступу: https://countrysmeters.info/ru/Ukraine#population_2019

31)Дутчак М.В. Спорт для всіх в Україні :результати загальнонаціонального опитування// Міністерство України у справах сім'ї, молоді та спорту.-2006.

32)Амінокислоти ВСАА та протеїн. 2018 [Електронний ресурс].-Режим доступу: <https://fitnesscity.com.ua/2018/08/25/амінокислоти-bcaa-що-це-таке/>

33)Триптофан із США.[Електронний ресурс].-Режим доступу: <http://justbio.club/ru/product/5-гидроксн-l-триптофан-5-нтр-doctors-best-60-кап/>

34)Триптофан із США.[Електронний ресурс].-Режим доступу: <https://bcaa.ua/proizvoditeli/now>

35)Триптофан із США. [Електронний ресурс].-Режим доступу:<https://prom.ua/p520920072-source-naturals-triptofan.html>

36)США – країна – виробник триптофану. 2019[Електронний ресурс].-Режим доступу: <https://ua.iherb.com/pr/Zahler-L-Tryptophan-Purified-L-Tryptophan-500-mg-60->

[Capsules/76647?gclid=Cj0KCQjwoebsBRCHARIsAC3JP0JOcRiAEMcA84grGvpS0iU3ryKvclejk5UKzBZeG3OSkpoG-zSQGggaAtpCEALw_wcB&gclsrc=aw.ds](https://ua.iherb.com/pr/Zahler-L-Tryptophan-Purified-L-Tryptophan-500-mg-60-Capsules/76647?gclid=Cj0KCQjwoebsBRCHARIsAC3JP0JOcRiAEMcA84grGvpS0iU3ryKvclejk5UKzBZeG3OSkpoG-zSQGggaAtpCEALw_wcB&gclsrc=aw.ds)

37) США – країна – виробник триптофану. [Електронний ресурс].-Режим доступу:[https://ua.iherb.com/pr/Zahler-L-Tryptophan-Purified-L-Tryptophan-500-mg-60-](https://ua.iherb.com/pr/Zahler-L-Tryptophan-Purified-L-Tryptophan-500-mg-60-Capsules/76647?gclid=Cj0KCQjwoebsBRCHARIsAC3JP0JOcRiAEMcA84grGvpS0iU3ryKvclejk5UKzBZeG3OSkpoG-zSQGggaAtpCEALw_wcB&gclsrc=aw.ds)

[Capsules/76647?gclid=Cj0KCQjwoebsBRCHARIsAC3JP0JOcRiAEMcA84grGvpS0iU3ryKvclejk5UKzBZeG3OSkpoG-zSQGggaAtpCEALw_wcB&gclsrc=aw.ds](https://ua.iherb.com/pr/Zahler-L-Tryptophan-Purified-L-Tryptophan-500-mg-60-Capsules/76647?gclid=Cj0KCQjwoebsBRCHARIsAC3JP0JOcRiAEMcA84grGvpS0iU3ryKvclejk5UKzBZeG3OSkpoG-zSQGggaAtpCEALw_wcB&gclsrc=aw.ds)

38) США – країна – виробник триптофану. [Електронний ресурс].-Режим доступу:[https://www.walmart.com/ip/L-](https://www.walmart.com/ip/L-Tryptophan/548848930?adid=2222222254418684945&wmlspartner=wmtlabs&wl0=b&wl1=g&wl2=c&wl3=291938340609&wl4=dsa-504748227745&wl5=9061014&wl6=&wl7=2840&wl8=&veh=sem&gclid=Cj0KCQjwoebsBRCHARIsAC3JP0LMYHcDeeHNmnX93XSZG-qnktxuRu-w3Qs3wo6xmYh_G9FRprby20aAo56EALw_wcB)

[Tryptophan/548848930?adid=2222222254418684945&wmlspartner=wmtlabs&wl0=b&wl1=g&wl2=c&wl3=291938340609&wl4=dsa-504748227745&wl5=9061014&wl6=&wl7=2840&wl8=&veh=sem&gclid=Cj0KCQjwoebsBRCHARIsAC3JP0LMYHcDeeHNmnX93XSZG-qnktxuRu-w3Qs3wo6xmYh_G9FRprby20aAo56EALw_wcB](https://www.walmart.com/ip/L-Tryptophan/548848930?adid=2222222254418684945&wmlspartner=wmtlabs&wl0=b&wl1=g&wl2=c&wl3=291938340609&wl4=dsa-504748227745&wl5=9061014&wl6=&wl7=2840&wl8=&veh=sem&gclid=Cj0KCQjwoebsBRCHARIsAC3JP0LMYHcDeeHNmnX93XSZG-qnktxuRu-w3Qs3wo6xmYh_G9FRprby20aAo56EALw_wcB)

39) Триптофан із США. [Електронний ресурс].-Режим доступу:[https://bigl.ua/p624596887-triptofan-500mg-](https://bigl.ua/p624596887-triptofan-500mg-bluebonnet?click_track_data=.eJwdzssKgkAYQOF3-dcKo442ugsLE60UJcgIUUenyfsNjOjds5bnrL43dENL52yKOQVDk7Gqa4RsBMiSuks4a_5fQrokq5oAYzsPWQ4GpJxVIMDUlnmz5jEutylRAuTvLH6RqZ5OvSvWnt97S1U3Yl9js7ARex18ssMIVNwkMqPGRTQITLQDHV8rcf88hyii9GDhxKF99YgL-EGmnLXDa4WMYNxkRJB0_3wBwH86CA.pIMHII0IWU-0INZM46mixiHkCRk)

[bluebonnet?click_track_data=.eJwdzssKgkAYQOF3-dcKo442ugsLE60UJcgIUUenyfsNjOjds5bnrL43dENL52yKOQVDk7Gqa4RsBMiSuks4a_5fQrokq5oAYzsPWQ4GpJxVIMDUlnmz5jEutylRAuTvLH6RqZ5OvSvWnt97S1U3Yl9js7ARex18ssMIVNwkMqPGRTQITLQDHV8rcf88hyii9GDhxKF99YgL-EGmnLXDa4WMYNxkRJB0_3wBwH86CA.pIMHII0IWU-0INZM46mixiHkCRk](https://bigl.ua/p624596887-triptofan-500mg-bluebonnet?click_track_data=.eJwdzssKgkAYQOF3-dcKo442ugsLE60UJcgIUUenyfsNjOjds5bnrL43dENL52yKOQVDk7Gqa4RsBMiSuks4a_5fQrokq5oAYzsPWQ4GpJxVIMDUlnmz5jEutylRAuTvLH6RqZ5OvSvWnt97S1U3Yl9js7ARex18ssMIVNwkMqPGRTQITLQDHV8rcf88hyii9GDhxKF99YgL-EGmnLXDa4WMYNxkRJB0_3wBwH86CA.pIMHII0IWU-0INZM46mixiHkCRk)

40) Триптофан із Венгрії. [Електронний ресурс].-Режим доступу:https://rozetka.com.ua/scitec_nutrition_728633105106/p12397884/

41) Триптофан із Польщі. [Електронний ресурс].-Режим доступу:<https://mega-mass.ua/ostrovit-tryptophan-200-g/>

42) Триптофан. Країна виробник Росія. 2019 [Електронний ресурс].-Режим доступу:https://biosfera.kz/product/product?product_id=20113

43) Триптофан. Країна виробник Німеччина. 2019 [Електронний ресурс].-Режим доступу: <https://eu-doctor.com/product/l-triptofan-l-tryptophan-250-mg-kapseln-60/>

- 44)Триптофан. Країна виробник Германія. 2019 [Електронний ресурс]Режим доступу:<https://bonvivant.ua/aminoplus-tryptophan/specification.html>
- 45)Триптофан. Країна виробник Португалія.2019[Електронний ресурс].- Режим доступу:<https://belok.ua/prozis-l-tryptophan-100-g/>
- 46)Триптофан. Країна виробник Білорусь.2019 [Електронний ресурс].- Режим доступу: <https://apteka.103.by/triptofan-instruktsiya/>
- 47)Триптофан. Країна виробник Японія.2019 [Електронний ресурс].- Режим доступу: <https://ua.iherb.com/pr/Jarrow-Formulas-L-Tryptophan-500-mg-60-Veggie-Caps/13385>
- 48) Kyota Encyclopedia of Genes and Genoms [Електронний ресурс]Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_module?M00008, вільний.
- 49) Пирог Т. П., Карлаш Ю. В., Красінько В. О. Основи проектування біотехнологічних виробництв // методичні рекомендації до викон. курс. проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання. – К.: НУХТ, 2015. – 92 с.
- 50) [Елетронний ресурс]// *Growth Rate and Generation Time, 2012.*[Елетронний ресурс]Режим доступу: http://textbookofbacteriology.net/growth_3.html, вільний.
- 51) Технічні мийні засоби для харчової промисловості. 2018[Електронний ресурс].-Режим доступу: <https://bytpromhim.ub.ua/ua/goods/view/3986154>
- 52) Вімол. Мийно-дезинфікувальний засіб. 2018 [Електронний ресурс].- Режим доступу: <https://farmakos.ua/vimol.html>
- 53)БіоЛонг. Дезинфікувальний розчин для генерального прибирання. 2019 [Електронний ресурс].-Режим доступу:<http://biosanvin.com.ua/zasb-deznfkuyuchij-z-mijnoyu-vlastivstyu-bolong-g16210783>
- 54)Нутч фільтр____[Електронний ресурс].-Режим доступу: <https://dlu.com.ua/Нутч-фильтр-3>
- 55)Друк фільтр [Електронний ресурс] Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ru/druk_filt_ru.php
- 56)Вакуум фільтр [Електронний ресурс].-Режим доступу: https://nomitech.ru/articles-and-blog/ustroystvo_i_printsip_raboty_vakuum_filtrov/

57) Ультрафільтраційна установка [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://orhey.org/uk/ultrafiltracijna-ustanovka-nagema-5000-lch-g1662915>

58) Катіоніт КУ-2-8. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pgk.prom.ua/p1789037-kationit.html>

59) Кристалізація. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://cyberleninka.ru/article/n/zastosuvannya-aminokislot-dlya-stvorennja-nanostruktur/viewer>

60) Вакуум сушка. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://vakum.com.ua/vakuumnaya-sushka-vidy-vakuumnoj-sushki-oborudovanie-dlya-vakuumnoj-sushki-v-ukraine/>

61) Розпилювальна сушка. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dlu.com.ua/Розпилювальна-сушарка-Nano-Spray-Dryer-B-90-HP>

62) Ліофільна сушка. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.prosushka.ru/138-kak-rabotaet-liofilnaya-sushka.html>

63) Різновиди дробарок. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.6262.com.ua/list/232780>

64) Фасувально-пакувальна машина серії “Мастодонт”. [Електронний ресурс]: Режим доступу: <https://packtech.com.ua/oborudovanie/fasovochnoe/avtomaty-serii-mastadont>

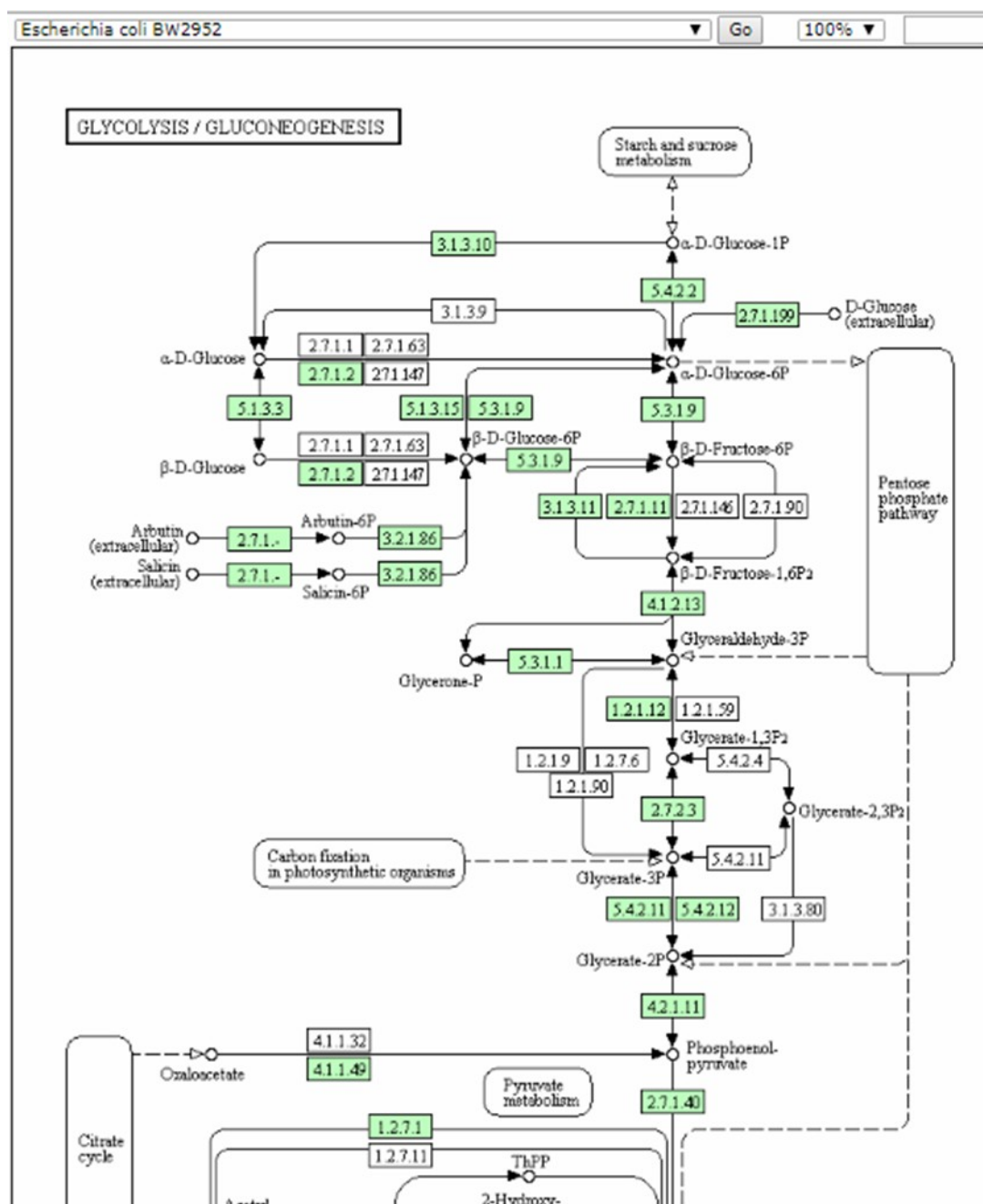
65) Метод формального титрування 2018. [Електронний ресурс].-Режим доступу: <http://docs.cntd.ru/document/gost-25179-90>

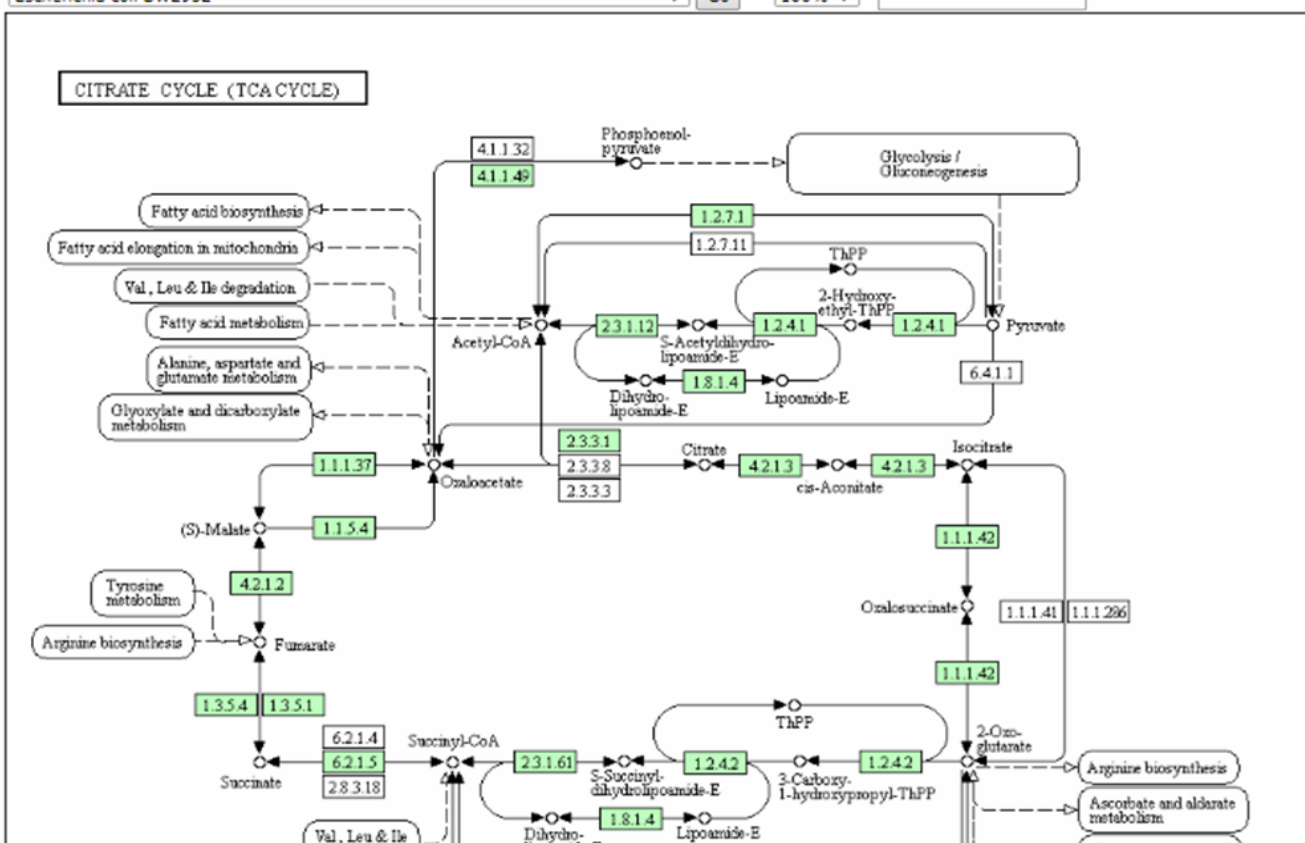
66) Хроматограф промисловий К-40 Prime. [Електронний ресурс]: Режим доступу: <https://helicon.ru/catalog/oborudovanie/khromatografiya/khromatografy/khromatograf-promyshlennyy-k-prime-40/>

67) ОНАУС МВ 25 Аналізатор вологості. [Електронний ресурс]: Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1870232-ohaus-mb25-analizator.html>

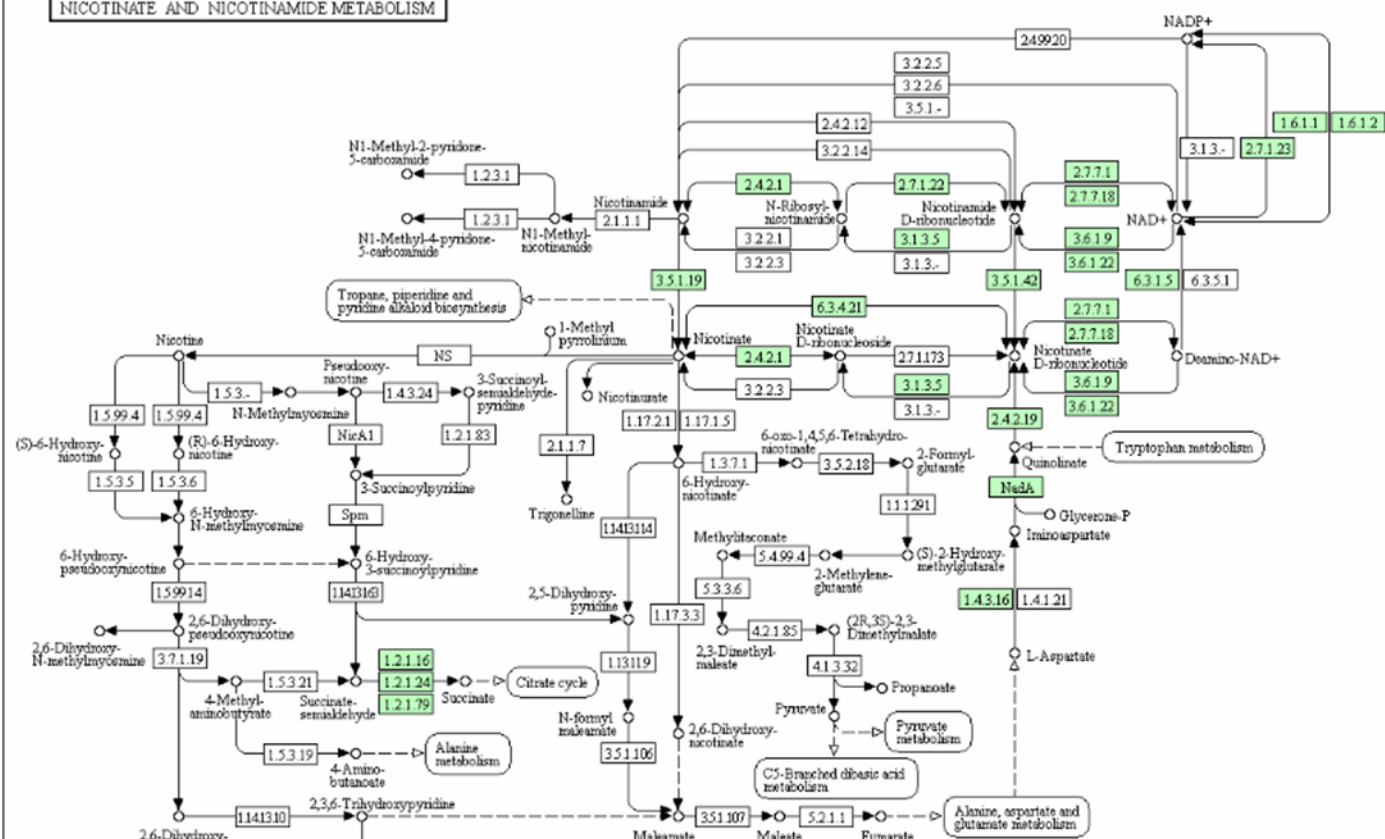
68) Ельперін І.В Автоматизація виробничих процесів: підручник / І.В Ельперін , О.М Пупена, В.М Сідлецький , С.М Швед – Вид. 2-ге виправлене- К: Вид. Ліра –К, 2015.-378с.

Додатки





NICOTINATE AND NICOTINAMIDE METABOLISM



[28].

Improved Production of Tryptophan in Genetically Engineered *Escherichia coli* with TktA and PpsA Overexpression

Abstract

Intracellular precursor supply is a critical factor for amino acid productivity. In the present study, *ppsA* and *tktA* genes were overexpressed in genetically engineered *Escherichia coli* to enhance the availability of two precursor substrates, phosphoenolpyruvate and erythrose-4-phosphate. The engineered strain, TRTH0709 carrying pSV709, produced 35.9 g/L tryptophan from glucose after 40 h in fed-batch cultivation. The two genes were inserted, independently or together, into a low-copy-number expression vector (pSTV28) and transferred to TRTH0709. Fed-batch fermentations at high cell densities of the recombination strains revealed that overexpression of the *ppsA* gene alone does not significantly increase tryptophan yield. On the other hand, overexpression of the *tktA* gene, alone or with the *ppsA* gene, could further improve tryptophan yield to a final tryptophan titer of 37.9 and 40.2 g/L, respectively. These results represent a 5.6% and 11.9% enhancement over the titer achieved by TRTH0709. No evident genetic modifications leading to growth impairment were observed.

1. Introduction

The aromatic tryptophan is a very important amino acid that is widely used in medicine and as a supplement in animal feeds. However, the market for L-tryptophan remains limited due to its high production cost [1]. From an industrial point of view, a high production rate is desirable, and many attempts have been undertaken to improve tryptophan yield.

Tryptophan can be manufactured through bacterial fermentation by two representative producer organisms, *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*. Our laboratory has a tryptophan overproducing strain, *E. coli* TRTH0709, which contains overexpressed genes in the tryptophan operon (*trpE^{fb} DCBA*) and DAHP synthase (*aroG^{fb}*), and the serine-biosynthetic gene (*serA*) on pBR322, with deletion of *trpR* and *tna*. *E. coli* TRTH0709, is a stable recombinant strain that can produce 35.9 g/L of L-tryptophan after 40 h in fed-batch fermentor cultivation in an antibiotic-free medium. However, production efficiency is not high enough for an industrial fermentation method. In most cases, the first targets for engineering are the common and branched pathways leading to tryptophan synthesis; these steps have been modified in TRTH0709. Further improvement of productivity and yield requires alteration of the central metabolic pathways, which supply the necessary precursors and energy for biosyntheses. In *E. coli*, aromatic metabolites are generated from the condensation reaction between phosphoenolpyruvate (PEP) and erythrose 4-phosphate (E4P) to form 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate (DAHP). Thus, increasing the availability of PEP and E4P is crucial for achieving the maximum flow of carbon into the common pathway [2, 3]. One way to increase the PEP supply is to directly recycle PEP from pyruvate. However, once PEP has been converted to pyruvate by either the phosphotransferase system or the pyruvate kinases, it is less likely to be converted back to PEP because of the high energy cost. This stoichiometric limitation may be overcome by overexpression of PEP synthase, which is coded by *ppsA*, so that more carbon flux will be directed into the aromatic pathway [4]. Another way to increase PEP supply is to recycle PEP from oxaloacetate (OAA). This way had been proved to be slightly less efficient compared with the former [5]. The E4P pool could be increased by the overexpression of transketolase (TktA) [3, 6] and transaldolase (Tal) [7]. While the overexpression of both of these enzymes increased the DAHP production rate, it was found that overexpression of TktA had a stronger effect than the overexpression of Tal. And overexpression of Tal in strains which already overexpress TktA did not show a further increase in production of aromatics. This result was attributed to the saturation of E4P supply when TktA was overexpressed [7].

Although the limitation of each precursor could be relieved to some extent by such genetic approaches, effective yield improvement requires a balanced supply of each precursor to the common pathway through a combination of these approaches. Thus, *ppsA* and *tktA* have been co-overexpressed and the yield of DAHP was close to the theoretical maximum [2, 3]. Previous attempts to drastically redirect carbon flux into a desired pathway resulted in growth impairment and/or the formation of unwanted by-products [8, 9]. Due to reduced growth and sugar consumption, high-copy-number amplification of the gene resulted in a tryptophan production level even lower than that without the gene [10]. In order to prevent the damaging effects of high expression on cells, a low-copy-number vector could be used.

Previous studies have performed amplification of *ppsA* and/or *tktA* genes to adjust the carbon flux in *E. coli*. However, these studies mainly aim to accumulate other intermediates in the aromatic amino acid pathway, such as DAHP and shikimic acid, and are usually performed in wild *E. coli* or low producers of tryptophan [2–4, 11, 12]. From a practical point of view, amplification of *ppsA* and/or *tktA* should be applied in highly engineered hyperproducers, so that the improved strains could be immediately used for industrial production. This approach has been successfully applied on a recombinant hyperproducing *C. glutamicum* strain: a fewfold amplification of the *tktA* gene resulted in 15% enhancement over the original strain. To our knowledge, there have been no reports on the modification of *ppsA* and/or *tktA* in existing *E. coli* L-tryptophan-producing strains. In the present study, the two genes were introduced either independently or together into pSTV28 [13], a low-copy-number plasmid compatible with the resident plasmid pSV-709. The resulting plasmids were transferred into *E. coli* TRTH0709. We investigated the effects of gene modification on cell growth, L-tryptophan formation, and plasmid stability and maintenance during fermentation.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains and Plasmids

All bacterial strains, plasmids, and their relevant characteristics and sources are presented in [Table 1](#). Primer sets used in the amplification of target genes are also listed in [Table 1](#). DNA manipulation was routinely conducted in *E. coli* strain DH5a.

2.2. Plasmid Construction

tktA and *ppsA* genes were synthesized from the *E. coli* TRTH0709 genome by PCR using primers P1-P2 and P3-P4, respectively. The *tktA* gene was subsequently digested by *Sac I*-*BamH I* and incorporated into pSTV28 (TaKaRa BIO Inc., Japan) to produce pEML02. The *ppsA* gene was digested by *BamH I*-*Sph I* and then inserted into pSTV28 and pEML02 to produce pEML01 and pEML03, respectively. The three resulting plasmids were transferred into *E. coli* TRTH0709, thereby producing strains TRTH1011, TRTH1012, and TRTH1013. Isolation of chromosomal DNA from *E. coli* TRTH0709 was performed as described previously [15]. Target genes were amplified using Pfu DNA polymerase (Fermentas, Glen Burnie, USA) in a GeneAmp PCR System thermocycler (Mastercycler, Eppendorf, Germany). Sizes of the PCR products were determined by agarose gel electrophoresis. When required, amplicons were purified by cutting the desired band from the agarose gels and processing with a gel PCR purification kit (Tiandz, Beijing, China). A Plasmid Miniprep Kit (Biomed, Beijing, China) was used for plasmid isolation from *E. coli*. The sequence of the PCR-amplified fragments was confirmed by a DNA MegaBACE 1000 sequencer (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK). All restriction enzymes and Taq DNA polymerase were purchased from Fermentas (Beijing, China). Rapid DNA ligase and alkaline phosphatase were obtained from TaKaRa (Shanghai, China). Primers were ordered from Bomeike (Tianjin, China). Plasmid transfer into *E. coli* was achieved by electroporation of competent cells following the method by Dower et al. [16]. Recombinant strains were selected on a Luria-Bertani (LB) medium with chloramphenicol (25 µg/mL).

2.3. Media and Culture Conditions

2.3.1. Media

LB media was used for all cloning procedures and gene expressions. The TF1 medium used for seed culture in a flask or a 5 L seed tank contained (per liter) glucose, 50 g; yeast powder, 5 g; KH_2PO_4 , 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; thiamine, 5 mg; trace element mixture, 2 mL (0.278 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g/L ZnCl_2 , 0.02 mg/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.20 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/L H_3BO_3) at pH 7.0. The TF2 medium used for production in 30-L jar fermentors contained (per liter) glucose, 8 g; yeast powder, 1 g; KH_2PO_4 , 4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5 g; trace element mixture, 2 mL (0.278 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g/L ZnCl_2 , 0.02 mg/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.20 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/L H_3BO_3) at pH 7.0. Tetracyclines (50 $\mu\text{g/mL}$) and chloramphenicol (25 $\mu\text{g/mL}$) were added as required.

2.3.2. Culture Conditions

Cultivation in a Rotary Shaker —

Shake flask cultivation was used for the initial investigation of PpsA and TktA overexpression in LB medium. Cultures (30-mL) in 500 mL baffled Erlenmeyer flasks were placed on a rotary shaker at 37°C and 200 rpm for 8 h. The cells of an overnight preculture were washed with 0.85% (w/v) NaCl and inoculated into the LB medium to an initial optical density at 660 nm (OD₆₆₀) of approximately 1. Expression of cloned genes was induced by adding 0.1 mM isopropyl 1-thio-D-galactopyranoside (IPTG) at the onset of cultivation.

Fed-Batch Fermentation —

Single colonies of the strain were produced on an LB plate by incubation at 37°C for 24 h. A single colony was inoculated into test tubes containing 10 mL TF1. After approximately 16 h at 37°C and 200 rpm, the first-seed culture was inoculated into 100 mL TF1 medium in a 1 L flask. After 14 h cultivation at 37°C on a rotary shaker, the second-seed broth was transferred into a 5 L fermenter (BaoXing, ShangHai, China) containing 2 L TF1. The culture was placed at 37°C for approximately 10 h until OD₆₆₀ was 20. pH value was controlled at 6.7 by adding 25% aqueous ammonia. Dissolved oxygen (DO) was maintained between 20% to 40% by aeration at a rate of 3–6 m³/min and a stirring speed between 200 and 600 rpm. The resulting preculture was inoculated into 14 L of TF2 medium in a 30-L fermenter (BaoXing, ShangHai, China). Fermentation was carried out at 37°C with aeration at 1–3 m³/min, DO at 20%–40%, and stirring at 300–900 rpm. pH was maintained at 7.0 by the addition of aqueous ammonia. Whenever residual glucose dropped to nearly zero, 800 g/L glucose solution was continuously added to the culture. Glucose concentration in the fermenter was kept at approximately 0 g/L by adjusting flow sugar pulse and DO. Fermentation was completed after 40 h.

2.4. Analysis of Biomass, Substrate, and Products

For quantification of substrate consumption and product formation, 1 mL samples were taken from the cultures and centrifuged at 12,790 ×g for 10 min. The supernatant was used for determination of L-tryptophan, glucose, and organic acid concentrations in the culture fluid. Glucose was determined by a lactic acid-glucose biosensor SBA-40C (Biology Research Institute, Shandong Academy of Sciences, China). Organic acid concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using an Agilent1100 system (Palo Alto, CA, USA). The HPLC system was equipped with an Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm; 9 μm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) maintained at 50°C. The mobile phase consisted of 5 mM H_2SO_4 , with a flow rate of 0.5 mL/min. All metabolites were detected with a photodiode array detector at 210 nm. Accumulated L-tryptophan was quantitatively determined by HPLC using the Agilent1100 system. An Agilent reversed-phase C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm; 3.5 μm) was used with a mobile phase of

0.030% KH₂PO₄ water solution and methanol (volume ratio of 90 : 10), with a flow rate of 1.0 mL/min at 39°C and a detective wavelength of 278 nm.

Cell density of the cultures was determined by measuring the OD₆₆₀ value using a 721 spectrophotometer. Cell dry weight was obtained as described previously [17].

2.5. Enzyme Assays

Cells were harvested at the exponential phase in TF2 medium by centrifugation at 6,395 ×g. They were then washed and resuspended in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) or 5 mM Tris-Cl 1 mM MgCl₂ (pH 7.4) for Tkt or Pps assay. Cells were continuously sonicated for 15 min on ice with an ultrasonic disruptor (JY92-II; Scientz Biotechnology Co., Ningbo, China). Cellular debris was removed by centrifugation at 10,658 ×g for 20 min at 4°C to collect the supernatant. Crude extracts were dialyzed against the potassium phosphate buffer for 6 h and used for enzyme assay. Tkt and Pps activities in the crude cell extracts were measured as described previously [9, 18]. Total protein content in the extracts was determined according to Lowry et al. [19].

2.6. Plasmid Stability

Tetracycline (50 µg/mL) and chloramphenicol (25 µg/mL) were added to the TF2 medium. After fed-batch fermentations in a 30 L jar, samples were collected from the cultures, diluted by 10⁶- and 10⁷-fold, and spread on agar plates with or without antibiotic pressure. Plasmid stability was estimated as the ratio of the percentage of colonies on antibiotic agar plates to percentage of colonies on agar plates without antibiotics. The same experiment was carried out in the TF2 medium without antibiotics.

3. Results

3.1. Expression of *ppsA* and *tktA* Genes in *E. coli* TRTH0709

The *ppsA* and *tktA* genes were amplified from *E. coli* TRTH0709 genomic DNA by PCR and subsequently cloned into the pSTV28 plasmid at corresponding restriction sites. After DNA sequencing, the cloning of *ppsA* has a G to A mutation at nucleotide position 148 and the cloning of *tktA* has an A to C mutation at nucleotide position 186. The point mutations led to single amino acid changes, A to T and I to L at position, respectively. The rest of the sequences agree with the literature [5, 20]. The two-point mutations might exist in the genomic DNA because *E. coli* TRTH0709 had been dealt with mutation breeding before.

The two genes were expressed in TRTH0709 to confirm their bioactivities. Expression vectors were constructed by either single gene expression or coexpression of the two genes based on vector Pstv28. The constructs were transformed into *E. coli* TRTH0709, and the protein profiles of the transformants were analyzed by SDS-PAGE. Distinct protein bands corresponding to the molecular weights of Pps (84 kD) and Tkt (73 kD) were detected on SDS-PAGE

3.2. Tryptophan Production in Transformed *E. coli* TRTH0709

To investigate the effect of enhanced enzymatic activities on tryptophan production, we tested the tryptophan production of the *E. coli* TRTH0709 transformants harboring different constructs in a jar fermentor under the conditions described above. Levels of tryptophan, biomass, correlative organic acids, and residual glucose were determined. As shown in Figure 2(c), TRTH1011 and pMEL01 accumulated 36.3 g/L L-tryptophan after 40 h, which represents only a 1% improvement over the production of the original TRTH0709. The pMEL02 carrier had a 5.6% increase in tryptophan yield compared with TRTH0709. Under the same culture conditions, the pEML03 carrier produced 40.2 g/L tryptophan, a relative 11.9% yield increase from the original strain. Our findings suggest

that simultaneous overexpression of *ppsA* and *tktA* may significantly enhance L-tryptophan production through independent *ppsA* or *tktA* overexpressions.

Growth of TRTH1011, TRTH1012, and TRTH1013 was slightly slower than that of TRTH0709 at an early stage (Figure 2(b)). However, TRTH1012 and TRTH1013 grew more quickly than TRTH0709 at later stages. Maximum biomass was attained at 28–30 h of fermentation. The maximum biomass of TRTH1011 (45.5 g/L) was lower than that of the three other strains, which attained almost the same biomass of 47 g/L. At the initial stage of fermentation, glucose consumption of TRTH1012 and TRTH1013 was slightly slower compared with TRTH0709. However, after 18 h, their consumption of glucose exceeded that of TRTH0709. TRTH1011 was similar to TRTH0709 and exhibited slightly faster consumption of glucose at early stages. This trend of glucose consumption is in accordance with the production of biomass and tryptophan in the four strains (Figure 2(a)).

The concentrations of pyruvate, lactic acid, acetate, and shikimic acid during the fermentation process were determined. Results showed similar trends in organic acid levels (Figure 3): levels increased during the growth stage and decreased after reaching a maximum value. Organic acids generated at the earlier stages were assimilated by cells due to the limited glucose supply in the mid- to late-stages of fermentation. TRTH1011 had the highest concentration of pyruvate, lactic acid, and acetate during fermentation among the four strains, but had lower levels of shikimic acid than the two other recombinations.

3.3. Comparison of L-Tryptophan Accumulation and Substrate-Specific L-Tryptophan Yields

Figure 4 summarizes the tryptophan accumulation and substrate-specific L-tryptophan yields of TRTH0709 and its plasmid-carrying strains. TRTH0709 accumulated approximately 35.9 g/L tryptophan with a Yp/s of 0.130 mol tryptophan per mol glucose after 40 h of fermentation in a 30 L jar fermentor. Overexpression of the *ppsA* gene alone in TRTH0709 resulted in a slightly higher L-tryptophan accumulation of approximately 36.3 g/L, but a lower Yp/s of 0.125 mol L-tryptophan per mol glucose. Overexpression of the *tktA* gene resulted in a modest increase in L-tryptophan accumulation to 37.9 g/L and a Yp/s of 0.132 mol L-tryptophan per mol glucose. Cooverexpression of the *ppsA* and *tktA* genes resulted in an evident increase in tryptophan accumulation to 40.2 g/L and the maximal Yp/s of 0.145 mol tryptophan per mol glucose. Our findings suggest that amplification of *tktA* alone or *tktA* with *ppsA* in TRTH0709 could further improve the productivity and yield of L-tryptophan, whereas amplification of *ppsA* alone could not effectively enhance L-tryptophan production.

3.4. Plasmid Stability in Fermentation

The result of the plasmids stability in fermentation was shown in Table 3. Plasmid pSV709 was stable in batch cultivations under selective pressure. Its stability could be maintained at 98% even in the absence of selective pressure. In comparison, pEML03 was not stable during the fermentation process and showed approximately 15% loss with or without antibiotic pressure. Due to the stability of plasmid pSV709, the maintenance of both plasmids in one cell approximates that for plasmid pEML03. Results also show no significant difference in stability of plasmids in cultures with and without antibiotics.

Table 3

Stability of plasmids pSV709 and pEML03 in TRTH1013 after 40 h of fermentation.

Plasmids	Stability with tetracycline and chloramphenicol (%)	Stability without antibiotics (%)
----------	---	-----------------------------------

Plasmids	Stability with tetracycline and chloramphenicol (%)	Stability without antibiotics (%)
pSV709	100 ± 2.3	98 ± 2.5
pMEL03	85 ± 7.1	86 ± 4.4
pSV709 and pMEL03	84 ± 6.2	83 ± 4.5

Values show the ratio in percentage of colonies on agar plates with antibiotics to colonies on agar plates without antibiotics. Means are determined from at least three independent experiments.

4. Discussion

Overexpression of genes plays important roles in the biosynthesis pathway and is a major approach for metabolic pathway engineering. Increasing the availability of PEP and E4P is a crucial factor for achieving the maximum flow of carbon into the common pathway. The present study verifies the significance of increasing intracellular PEP synthase and transketolase contents for maximal tryptophan production using *E. coli* TRTH0709. The transfer of pSTV28 with *ppsA* and/or *tktA* moderately increased the expression of *ppsA* and/or *tktA* genes and the activity of PEP synthase or/and transketolase (Figure 1, Table 2).

Previous studies have demonstrated that overexpression of PpsA to increase DAHP production in *E. coli* cultured on nutrient-rich and glucose-containing media leads to growth impairment, increased glucose consumption, and excretion of pyruvate and acetate [2]. Growth impairment was significant enough that cell density of the high overexpression *ppsA* plasmid-containing culture at the stationary phase was up to 70% lower than that in the control culture [9]. In the present study, TRTH1011 showed a final biomass that is 4% less compared with the original strain (Figure 2). The lower influence on biomass can be attributed to the adoption of low gene dosage and the strategy of glucose-limited fed-batch culture using the DO-stat method in the fermentation process [21]. This strategy kept the glucose concentration in the fermentation broth near zero, thus reducing the accumulation of harmful byproducts. Byproducts, especially acetate, can inhibit cell growth and protein production. TRTH1011 and TRTH1012 did not exhibit significant growth impairment. Some studies have reported that transketolase gene overexpression imposes a metabolic burden leading to retarded growth and segregation of plasmids [1, 12, 17]. Minimization of *tktA* expression levels and glucose-limited fed-batch culture actually reduced the negative effects in the present study, so that pEML03 could be maintained at 85% after 40 h fermentation. The plasmid was not readily lost in the absence of antibiotics, indicating that the strain may be suitable for tryptophan industrial fermentation without antibiotics.

Determination of several correlative organic acids revealed that overexpression of PpsA leads to accumulation of acetate, lactic acid, and pyruvate. The increase in pyruvate, lactic acid, and acetate excretion may be attributed to the high glycolytic flux, which saturates the tricarboxylic acid cycle and leads to overflow of these products. When TktA is overexpressed, the excess PEP could be redirected to the aromatic pathway. This would lead to increased concentration of shikimic acid, a metabolite in the aromatic common pathway, whereas concentrations of pyruvate, lactic acid, and acetate would be decreased since they are metabolites of the glycolysis pathway. Thus, in the final fermented liquids of

TRTH0709, TRTH1012, and TRTH1013, these organic acids were found in trace amounts or not at all. Shikimic acid in the culture supernatant of strains that overexpressed *tktA* was slightly higher than that in the original strain and the strain overexpressing *ppsA* (Figure 3).

Findings of the present study indicate that overexpression of *ppsA* alone does not significantly enhance L-tryptophan production. This result concurs with a previous report that the positive *ppsA* effect is only significant with concomitant overexpression of a feedback-deregulated DAHP synthase and transketolase gene *tktA* [4]. Effective enhancement of L-tryptophan by *tktA* overexpression verified that transketolase is the pivotal enzyme in L-tryptophan production. However, increasing E4P supply alone through *tktA* overexpression cannot increase the tryptophan yield to the theoretical level due to the stoichiometric limitation of pyruvate recycling to PEP [2]. In the present study, the simultaneous overexpression of *ppsA* and *tktA* resulted in higher yields of L-tryptophan, as expected.

However, the tryptophan productivity and yield of the modified strain was still far from the theoretical level and was lower than that of many other amino acids [10]. A large amount of research is necessary to exploit the potential production capacity of the current bacterial strain. The production of tryptophan, coupled with cell growth and overexpression of plasmid-encoded protein, leads to growth impairment. An optimal balance among the dosages of gene expression, tryptophan accumulation, and cell biomass must be determined. Findings of this study indicate that a detailed study to further strengthen the expression of the *tktA* and *ppsA* genes is needed in the future. Modifications on plasmid copy number, promoter strength, and placement of genes in the plasmid should be attempted so that greater tryptophan production could be achieved and cell growth inhibition could be avoided.[1].

того продукта применяют такие трудоемкие и энергоемкие операции как многократное упаривание, кристаллизацию и перекристаллизацию. Выход L-триптофана около 50% недостаточен велик. Указанные недостатки затрудняют использование этого способа в промышленности.

Целью изобретения является разработка более эффективного и технологичного способа выделения L-триптофана из растворов, содержащих большое количество минеральных и органических примесей, который позволил бы получать L-триптофан в промышленных условиях с высокой чистотой и с высоким выходом.

Поставленная цель достигается тем, что сорбцию L-триптофана осуществляют на макропористом слабоосновном анионите, а после десорбции с анионита из полученного элюата L-триптофан повторно сорбируют на сульфокатионите в H-форме с последующей десорбцией L-триптофана с катионита.

При этом для десорбции L-триптофана с анионита используют обессоленную воду и/или растворы минеральных кислот в концентрации 0,1-0,5 М при температуре 10-25°C. Для десорбции триптофана с катионита применяют 1,5-3,0% раствор аммиака в водном растворе этанола при температуре 40-70°C.

Согласно предлагаемому способу кристаллизацию триптофана из аммиачно-спиртовых элюатов целесообразно осуществлять путем подкисления последних уксусной кислотой до pH 3,5-4,0 с последующим охлаждением до 0-5°C.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом.

Содержащую L-триптофан культуральную жидкость пропускают через колонку с макропористым сорбентом (например, ИА-1р). При этом L-триптофан сорбируется, тогда как минеральные соли, другие аминокислоты и неионизированные компоненты питательной среды неароматического характера практически не поглощаются смолой. Во избежание заиливания сорбента и седиментации микробных клеток в колонне раствор в колонку подают в направлении снизу вверх. С другой стороны, такой способ подачи раствора существенно улучшает динамику сорбции L-триптофана и исключает слеживание смолы. Диапазон оптимальных значений pH подаваемого раствора от 1,0 до 7,0.

По окончании сорбции колонка с сорбентом промывается водой.

В случае наличия окрашенных примесей в исходном растворе элюцию L-триптофана следует проводить водой при комнатной температуре с одновременной подачей триптофансодержащего элюата

на колонку с сульфокатионитом (КУ-2-8, дауэкс 50W) в H-форме. При десорбции с анионита раствор пропускают через колонку сверху вниз, а при сорбции на сульфокатионите минеральных солей и целого ряда других примесей сульфокатиониты поглощают триптофан с высокой эффективностью. Одновременно с концентрированием происходит дальнейшая очистка триптофана от окрашенных примесей. Для повышения чистоты конечного продукта осуществляют промывку катионита в колонне горячей водой при температуре 50-90°C.

Элюцию триптофана с катионита проводят 1,5-3,0% раствором аммиака в водном растворе этанола при 50-70°C. Этот способ элюирования позволяет избежать кристаллизации десорбированного триптофана в колонке и осуществления ее в приемнике фракций элюата, не прибегая к многократному упариванию элюата. Во фракциях с содержанием триптофана более 10 г/л при охлаждении и нейтрализации в уксусной кислоте происходит кристаллизация L-триптофана. Вылавшие кристаллы, содержащие L-триптофан, уксусную кислоту и воду, отфильтровывают, промывают этанолом и высушивают в вакууме при температуре порядка 50°C.

Уже на этом этапе способ позволяет получать продукт с содержанием основного вещества порядка 99% и выходом около 50%.

Кристаллический продукт может быть подвергнут дополнительной очистке известным методом, включающим обработку активированным углем и перекристаллизацию из водноэтанольных растворов.

Фракции аммиачного элюата могут быть обработаны известными методами, включающими упаривание, кристаллизацию и перекристаллизацию или возвращены на стадию сорбции на анионите последующего технологического цикла. Таким образом, общий выход кристаллического L-триптофана может быть увеличен до 60-70%.

По предлагаемому способу L-триптофан получают со следующими характеристиками: выход кристаллического L-триптофана 50-70%, содержание основного вещества не менее 99%, удельное оптическое вращение +30-31° (с=1, H₂O), влажность не более 1,0%, зольность (сульфатная) не более 0,1%, содержание примесей: сульфаты не более 0,01%, хлориды не более 0,01%, железо не более 0,001%, тяжелые металлы не более 0,001%. Продукт не содержит примесей других аминокислот, нетоксичен и непирогенен.

Способ поясняется следующими примерами.

Пример 1. 2 л раствора, содержащего 16 г L-триптофана, 8,4 г L-аланина, 5,6 г глицина, 7,0 г валина, 10 г диэтилхлоргидрата и 4 г L-глутаминовой кислоты, подают на колонну с ИА-1р (объем смолы 0,45 л) в направлении снизу вверх со скоростью 0,5 л/час. После обнаружения L-триптофана в фильтрате (пропущено 1,85 л) фильтрат подают на вторую колонну с ИА-1р (объем смолы 0,1 л).

Колонны промывают 0,85 л воды (до обнаружения L-триптофана на выходе из второй колонны), после чего проводят десорбцию 0,2 н HCl с обеих колонн, пропуская раствор в направлении сверху вниз со скоростью 0,35 л/час. Одновременно элюат подают на колонну с КУ-2 в H-форме (объем смолы 110 мл) в направлении снизу вверх. Элюцию кислотой прекращают после прохождения 7 л раствора. Элюцию L-триптофана с КУ-2 проводят 2,0 л раствором аммиака в 50% растворе этанола при температуре 63°C, подавая раствор сверху вниз со скоростью 80 мл/час. Первую фракцию объемом 90 мл отбрасывают. Вторую фракцию объемом 250 мл, содержащую L-триптофан в концентрации более 7,0 г/л, обрабатывают 20 мл ледяной уксусной кислоты до pH 4,5 и охлаждают в течение 20 час при температуре 3-5°C. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают охлажденным этанолом и высушивают при 40°C.

В результате получают 11,9 г кристаллического L-триптофана с содержанием основного вещества более 99%.

Пример 2. Исходным материалом для выделения L-триптофана является ферментационная среда, полученная в результате культивирования штамма *Vas. subtilis* ВНИИгенетики 3557 на питательной среде, содержащей сахар, кукурузный экстракт, мочевины, соли фосфорнокислого калия, сернокислый магний, хлористый натрий. Концентрация L-триптофана 6,20 г/л. 1 литр культуральной жидкости подают на колонну со смолой ИА-1р объемом 0,25 л снизу вверх со скоростью 0,3 л/час. Затем колонну промывают 0,5 л воды в том же направлении с той же скоростью. После пропускания первых 0,2 л воды и обнаружения в выходящем растворе триптофана в следовых концентрациях выходящий раствор направляют на вторую колонну со смолой ИА-1р (объем смолы 250 мл).

Десорбцию L-триптофана с первой колонны осуществляют 3,0 л воды, подаваемой со скоростью 0,2 л/час в направлении сверху вниз. Элюат, содержащий триптофан, пропускают с той же скоростью через колонну с 80 мл сульфокатионита КУ-2-8 в H-форме в направлении снизу вверх. Затем ко-

лонну со смолой КУ-2-8 промывают 0,5 л воды при температуре 70°C со скоростью 0,2 л/час.

Элюирование триптофана со смолы КУ-2-8 проводят 0,5 л 1,5% раствора аммиака в 50% водном растворе этанола при температуре 58°C. Элюат собирают по фракциям. Первая фракция объемом 100 мл содержит триптофан в концентрации 0,15 г/л. Эту фракцию направляют на стадию сорбции на смоле ИА-1р в последующем цикле. Вторая фракция объемом 70 мл содержит триптофан в концентрации 48 г/л. Эту фракцию обрабатывают 5,0 мл ледяной уксусной кислоты до pH 4,10 и охлаждают до 5°C. Выпавшие кристаллы отделяют фильтрованием, промывают этанолом и высушивают в вакууме. В результате получается 3,02 г кристаллического триптофана, хроматографически чистого с содержанием основного вещества 99%. Выход L-триптофана в кристаллическом продукте составляет 48,4%. Содержание триптофана в маточном растворе составляет 5,2 г/л, объем маточного раствора 65 мл, а вместе с промывными водами 80 мл. Этот раствор после отгонки спирта подают на стадию сорбции на смоле ИА-1р в последующем цикле. Третья фракция элюата объемом 350 мл содержит триптофан в концентрации 4,2 г/л. Эту фракцию упаривают в вакууме до объема 18 мл и охлаждают при 5°C. Выпавшие кристаллы триптофана отделяют фильтрованием, промывают этанолом и высушивают. В результате получают 1,15 г триптофана с содержанием основного вещества 95%. Общий выход триптофана в кристаллическом продукте составляет 66%. Маточный раствор после кристаллизации триптофана из третьей фракции элюата возвращают на стадию сорбции на смоле ИА-1 в последующих циклах.

Пример 3. Культуральная жидкость та же, что в примере 1. Объем культуральной жидкости 2,6 литра. Объем анионита ИА-1р составляет 0,5 л. Условия сорбции и десорбции триптофана в случае смолы ИА-1р аналогичны условиям примера 1 за исключением того, что промывку колонны после сорбции производят 1,0 литром воды, а элюцию триптофана с анионита 6,0 литрами воды. Элюат, содержащий триптофан, минуя промежуточную емкость, подают на колонну с сульфокатионитом Дауэкс 50Wx4 20/50 mesh в H-форме, взятым в объеме 70 мл снизу вверх со скоростью 0,2 л/час. По окончании сорбции триптофана колонну с сульфокатионитом промывают 0,5 л воды при температуре 75°C в направлении снизу вверх со скоростью 0,2 л/час.

Элюирование триптофана со смолы Дауэкс 50Wx4 проводят 0,5 л 1,7%

раствора аммиака в 50% водном растворе этанола при температуре 63°C. Первую фракцию объемом 70 мл, содержащую триптофан в концентрации 0,20 г/л, направляют на стадию сорбции на анионите ИА-1р в последующем цикле. Вторую фракцию элюата с сульфокатионита объемом 90 мл, содержащую триптофан в концентрации 80,5 г/л, обрабатывают 5,5 мл ледяной уксусной кислоты до pH 4,15 и охлаждают до 50°C. Выпавшие кристаллы обрабатывают так же, как в примере 1. В результате получают 6,55 г кристаллического L-триптофана, хроматографически чистого, с содержанием основного вещества 99%. Выход L-триптофана в кристаллическом продукте составляет 51,2%. Маточный раствор объемом 78 мл с содержанием триптофана 5,1 г/л и промывные воды после отгонки спирта возвращают на стадию сорбции на анионите ИА-1 в последующем цикле. Третью фракцию элюата объемом 315 мл с содержанием триптофана в концентрации 6,5 г/л упаривают до объема 30 мл и охлаждают при 50°C. Выпавшие кристаллы отделяют фильтрованием, промывают этанолом и высушивают. В результате получается 1,98 г кристаллического триптофана с содержанием основного вещества 96%. Общий выход триптофана в кристаллическом продукте составляет 67,2%. Кристаллы триптофана с содержанием основного вещества 96% перекристаллизуют. Для этого 2,25 г триптофана растворяют в 25 мл 50% этанола при нагревании. В раствор добавляют 0,4 г активированного угля, горячий раствор фильтруют, фильтрат охлаждают и выпавшие кристаллы триптофана отфильтровывают, промывают этанолом и высушивают. В результате получают 1,56 г триптофана, хроматографически чистого, с содержанием основного вещества 99%. Выход на стадии перекристаллизации составляет 72%

в пересчете на триптофан с содержанием основного вещества 100%.

формула изобретения

1. Способ выделения L-триптофана из растворов путем сорбции его на ионообменных смолах, десорбции полученного элюата и кристаллизации, отличающийся тем, что, с целью повышения эффективности процесса, а также получения готового продукта, свободного от примесей, сорбцию L-триптофана осуществляют на макропористом слабоосновном анионите, а после десорбции с анионита из полученного элюата L-триптофан повторно сорбируют на сульфокатионите в H-форме с последующей десорбцией L-триптофана с катионита.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что десорбцию L-триптофана с анионита осуществляют обессоленной водой и/или растворами минеральных кислот в концентрации 0,1-0,5 М при температуре 10-25°C.
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что десорбцию L-триптофана с катионита осуществляют 1,5-3,0% раствором аммиака в водном растворе этанола при температуре 40-70°C.
4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что кристаллизацию L-триптофана из аммиачно-спиртовых элюатов проводят путем подкисления последних уксусной кислотой до pH 3,5-4,0 с последующим охлаждением до 0-5°C.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе

1. Патент США № 2.416.956, опублик. 1947.
2. Патент США № 2.700.672, опублик. 1955.
3. Патент США № 3.450.712, опублик. 1969 (прототип).

Составитель В. Максимова
 Редактор Н. Козлова Техред Ж. Кастелевич Корректор С. Шекмар
 Заказ 4556/19 Тираж 522

Подписное
 ЦНИИПИ Государственного комитета СССР
 по делам изобретений и открытий
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4