



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” листопада 2024 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БАГЛАЙ Наталія Андріївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез ізолейцину *Corynebacterium glutamicum*

керівник роботи СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна, ас.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05 листопада 2024 року №932-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 07.02.2025

3. Вихідні дані до роботи Продукт ізолейцину *Corynebacterium glutamicum*; геометричний об'єм ферментера 3 куб.м.; коефіцієнт заповнення 0,6

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

5. Перелік графічного матеріалу

1 аркуш формату А1 (технологічна схема) і 1 аркуш формату А1

(апаратурна схема)

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2024 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	01.11.2024 – 11.11.2024	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	12.11.2024 – 17.11.2024	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	18.11.2024 – 05.12.2024	
4.	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва ізолейцину	06.12.2024 – 20.12.2024	
5.	Специфікація обладнання	21.12.2024 - 30.12.2024	
6.	Опис технологічної схеми	31.12.2024 – 14.01.2025	
7.	Контроль виробництва ізолейцину	15.01.2025 – 21.01.2025	
8.	Охорона довкілля	22.01.2025 – 29.01.2025	
9.	Оформлення пояснювальної записки	30.01.2025 - 31.01.2025	
10.	Виконання графічної частини проекту	01.02.2025 - 07.02.2025	
11.			
12.			
13.			

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Наталія БАГЛАЙ** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

**Тетяна СУЛЕЙКО** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Представлена кваліфікаційна робота зосереджена на створенні технологічної та апаратурної схем отримання ізолейцину із застосуванням бактеріального штаму *Corynebacterium glutamicum* YILM1504, здатного продукувати 43,6 г/л даної амінокислоти. Запропоновано застосування ізолейцину як амінокислотного додатку, що сприяє нарощуванню та покращенню якості м'язової тканини, внаслідок чого підвищується фізична витривалість та функціональні показники. На підставі статистичних даних Міністерства молоді та спорту України було визначено річну виробничу потужність, яка становить 6 205 кг ізолейцину.

Виробничий процес включає комплекс допоміжних операцій (забезпечення аераційним повітрям, приготування резервного розчину рибофлавіну та підживлювального розчину глюкози, проведення стерилізації поживних середовищ для культивування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу) та основний процес, що складається з трьох етапів нарощування посівного матеріалу з подальшим біосинтезом у ферментаційному апараті об'ємом 3 м<sup>3</sup> при коефіцієнті заповнення 0,6. В основу технології виробництва ізолейцину покладено одностадійний глибинний періодичний метод культивування.

Структура курсового проекту охоплює вступну частину, вісім тематичних розділів, перелік використаних джерел, а також технологічну та апаратурну схеми у форматі А1. Робота викладена на 76 сторінках та містить 7 графічних зображень і 15 таблиць.

**Ключові слова:** незамінна амінокислота, *Corynebacterium glutamicum* YILM1504, ізолейцин, продуктивність виробництва.

## ABSTRACT

The qualification work focuses on developing technological and hardware schemes for isoleucine biosynthesis using the *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 strain, capable of producing 43.6 g/l of this amino acid. The proposed application of isoleucine as an amino acid supplement contributes to muscle mass growth and quality improvement, resulting in enhanced physical endurance and functional performance. Based on statistical data from the Ministry of Youth and Sports of Ukraine, the annual production capacity was determined to be 6,205 kg of isoleucine.

The production process encompasses a complex of auxiliary operations (provision of aeration air, preparation of riboflavin reserve solution and glucose feeding solution, sterilization of nutrient media for inoculum cultivation and industrial biosynthesis) and the main process, consisting of three stages of inoculum growth followed by biosynthesis in a 3 m<sup>3</sup> fermentation vessel with a fill coefficient of 0.6. The isoleucine production technology is based on a single-stage submerged batch cultivation method.

The structure of the course project includes an introduction, eight thematic sections, a list of references, as well as technological and hardware schemes in A1 format. The work is presented on 76 pages and contains 7 graphical images and 15 tables.

**Keywords:** essential amino acid, *Corynebacterium glutamicum* YILM1504, isoleucine, production capacity.

## ЗМІСТ

<b>РЕФЕРАТ</b> .....	4
<b>ВСТУП</b> .....	8
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ІЗОЛЕЙЦИНУ</b> .....	10
<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b> .....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента .....	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	15
2.3. Таксономічний статус .....	15
<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</b> .....	17
3.1. Потреба населення України в ізолейцині.....	17
3.2. Розрахунок потужності виробництва ізолейцину.....	19
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	21
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу ізолейцину.....	22
3.5. Біосинтез цільового продукту.....	23
3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	23
3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	25
<b>РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ІЗОЛЕЙЦИНУ</b> .....	29
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	29
4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря для одержання ізолейцину.....	30
4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування <i>Corynebacterium glutamicum</i> YILM1504.....	31
4.3.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	32
4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторах.....	34
4.3.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу ізолейцину.....	36
4.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника.....	38
<b>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b> .....	40
<b>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b> .....	45
<b>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ІЗОЛЕЙЦИНУ</b> .....	53
7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу ізолейцину.....	53
7.2. Мікробіологічний контроль.....	56
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту .....	58
7.3.1. Визначення концентрації біомаси.....	58
7.3.2. Визначення концентрації ізолейцину.....	58
7.3.3. Визначення концентрації джерела вуглецю і азоту.....	58

<b>РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....</b>	<b>61</b>
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів .....	61
8.2. Характеристика рідких відходів виробництва ізолейцину .....	62
8.2.1. Розрахунок об'ємів відходів.....	62
8.2.2. Заходи для зменшення об'ємів рідких відходів.....	63
8.2.3. Утилізація рідких відходів.....	63
8.3. Характеристика твердих відходів виробництва ізолейцину.....	64
8.3.1. Розрахунок об'ємів відходів.....	64
8.3.2. Утилізація твердих відходів.....	65
8.4. Характеристика газоповітряних відходів виробництва ізолейцину....	65
8.4.1. Розрахунок об'ємів відходів.....	65
8.4.2. Утилізація газоповітряних відходів.....	66
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>67</b>
<b>ДОДАТКИ .....</b>	<b>71</b>

## ВСТУП

Амінокислоти використовуються в багатьох промислових цілях як біохімічні маси для виробництва широкого спектру продуктів, таких як кормові добавки для тварин, підсилювачі смаку або як інгредієнти в косметичних і медичних продуктах [1]. Світовий ринок амінокислот досяг 10,3 мільйона тонн із валовим обсягом продажів у 28 мільярдів доларів у 2021 році. Очікується, що світовий ринок амінокислот буде зростати на 6,76% у наступному десятилітті [2].

Амінокислоти можуть бути синтезовані різними методами, такими як екстракція з білкового гідролізату, хімічний синтез, ферментативний синтез і мікробна ферментація [1, 3]. У порівнянні з іншими методами виробництва амінокислот, мікробна ферментація вважається економною, ефективною та екологічно чистою [4]. В даний час він став основним методом виробництва більшості амінокислот, що забезпечує 80% світового виходу амінокислот [5].

Зелене хімічне виробництво за допомогою мікробних процесів має вирішальне значення для розвитку сталого суспільства в двадцять першому столітті. Серед важливих промислових мікроорганізмів грампозитивна бактерія *Corynebacterium glutamicum* була використана для ферментації амінокислот, яка є однією з найбільших мікробних галузей [6].

**Актуальність теми.** Сучасний розвиток біотехнології сприяє активному впровадженню мікробних методів виробництва біологічно активних сполук, зокрема амінокислот. Враховуючи зростаючий попит на амінокислоти у фармацевтичній, харчовій та сільськогосподарській галузях, удосконалення технологій їх біосинтезу є вкрай важливим. Використання *Corynebacterium glutamicum* як продуцента ізолейцину відкриває нові можливості для підвищення ефективності та економічної доцільності його виробництва.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Баглай Н.А.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Судейко Т.Л.</i>					8	2
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Саме тому дослідження, присвячене оптимізації процесу біосинтезу ізолейцину із застосуванням цього мікроорганізму, є актуальним та перспективним.

**Новизна.** У роботі досліджено використання штаму *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 для виробництва ізолейцину. Встановлено, що цей штам здатний синтезувати ізолейцин у концентрації приблизно 44 г/л протягом 46 годин культивування, що є перспективним показником для промислового застосування.

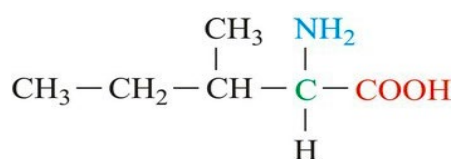
## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ІЗОЛЕЙЦИНУ

*Ізолейцин* – це харчова добавка у вигляді незамінної протеїногенної амінокислоти, що зустрічається в усіх організмах як у вільному стані, так і у складі білків. Для людини ця амінокислота відіграє доволі важливу роль, оскільки вона є необхідною для здійснення різних життєво важливих функцій.

Вперше ізолейцин був виділений у 1904 році з фібрину, білка, який бере участь у формуванні тромбів. У мікроорганізмах і рослинах ізолейцин синтезується з амінокислоти треоніну. Ця амінокислота є високогідрофобною. Ізолейцин має два асиметричних атоми вуглецю і тому може існувати у вигляді будь-якого з чотирьох ізомерів. У білках існує лише один ізомер. Він необхідний для харчування людини (в середньому дорослим потрібно 0,7 г на день) і може метаболізуватися м'язами.

Молекулярна маса ізолейцину становить 131,2 г/моль [7]. На рис. 1.1 показано структурну формулу ізолейцину.

Рисунок 1



**Рис. 1.1.** Структурна формула ізолейцину

На основі інфрачервоного спектроскопічного дослідження було припущено, що кристал L-ізолейцину належить до досить незвичайного типу, в якому молекули приймають два види конформації.

Кристалічна структура L-ізолейцину була розкрита на основі структури L-валіну. Обидва ці кристали належать до однієї просторової групи і мають однакові постійні ґратки; отже, дробові координати всіх атомів, крім 7 і 6 атомів вуглецю, двох кристалографічно незалежних молекул L-ізолейцину вважалися такими ж, як і в L-валіні. Тривимірна карта електронної густини, заснована на 12 атомах, показала щість атомів вуглецю в 7 і 6 позиції.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Баглай Н.А.				Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Судейко Т.Л.					10	2
Реценз.					<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

Розраховані структурні фактори для цілих 18 атомів дали значення  $R = 0.24$  [8].

У біотехнологічному виробництві ізолейцину основним продуцентом є *Corynebacterium glutamicum*, завдяки його високій ефективності у синтезі цієї амінокислоти. Мікроорганізм володіє розвиненим метаболічним шляхом, який забезпечує активний біосинтез ізолейцину шляхом ферментативних перетворень попередників. На рисунку 1.2 представлено схему основних етапів цього процесу в клітині *Corynebacterium glutamicum*, що демонструє ключові метаболічні ланки та ферменти, залучені до синтезу амінокислоти [9].

Рисунок 2

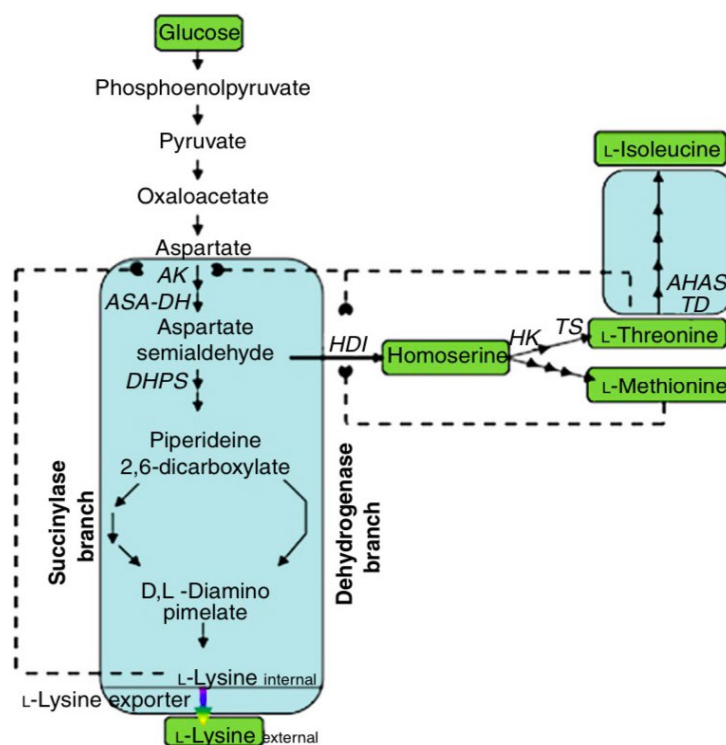


Рис. 1.2. Шлях біосинтезу ізолейцину у клітині *Corynebacterium glutamicum*

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

### 2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента

Головним промисловим продуцентом для виробництва ізолейцину є *Corynebacterium glutamicum*. Станом на сьогоднішній день була виведена велика кількість різних штамів *Corynebacterium glutamicum*, які спеціалізуються на промисловому біосинтезі ізолейцину. Так, у роботі [10] зазначається про отримання рекомбінантного штаму *Corynebacterium glutamicum*YILW, який здатний виробляти ізолейцин концентрацією до 29 г/л.

Натомість у роботі [11] стверджується про здатність штаму *Corynebacterium glutamicum*WM001 виробляти ізолейцин концентрацією до 29,8 г/л. У той час у роботі [12] зазначається про здатність штаму *Corynebacterium glutamicum*IWJ001/pDXW8-ilvBN1-ilvA1-ppnk1 виробляти ізолейцин концентрацією до 32,3 г/л.

До того ж у роботі [13] описано штам *Corynebacterium glutamicum*YILM1504, який здатний виробляти ізолейцин в концентрації 43,67 г/л. Отже, згідно таблиці 2.1, у цій роботі у якості найбільш ефективного штаму для виробництва ізолейцину планується використати *Corynebacterium glutamicum*YILM1504.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>	<i>Баглай Н.А.</i>				<i>Літ..</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушієв</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Сулейко Т.Л.</i>					12	5
<i>Реценз.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						
					<i>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ІЗОЛЕЙЦИНУ</i>		

## Порівняльна характеристика продуцентів ізолейцину

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Умови культивування, год	Концентрація ізолейцину, г/л	Використане джерело
<i>C. glutamicum</i> YILM1504	Глюкоза – 70, Пептон - 10, Дріжджовий екстракт – 2, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O - 3, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2,2, Кукурудзяний гідролізат - 20, Лізин - 1, Глутамат - 3, Метіонін – 0,2, Кукурудзяний екстракт – 50, Рибофлавін – 0,2 мг/л, Додецилсульфату натрію – 1,5	32 °C 40 год pH=6,7-7 200 об/хв	43,67	Xiong, H., Liu, Y., & Xu, Q. (2020). Effect of sodium dodecyl sulfate on the production of L-isoleucine by the fermentation of <i>Corynebacterium glutamicum</i> . <i>Bioengineered</i> , 11(1), 1124–1136. <a href="https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1831364">https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1831364</a>
<i>C. glutamicum</i> YILW	Глюкоза - 80, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 4, FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O - 0,015, MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O - 0,5, MnSO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O - 0,015, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×3H <sub>2</sub> O - 1,5, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×3H <sub>2</sub> O - 3, Біотин - 100 мкг/л, Вітамін В1 - 5 мг/л, Гідролізат сої – 20, Кукурудзяний екстракт - 15	32 °C 60 год pH=7,0 200 об/хв	29	Xie, X., Xu, L., Shi, J., Xu, Q., & Chen, N. (2012). Effect of transport proteins on l-isoleucine production with the l-isoleucine-producing strain <i>Corynebacterium glutamicum</i> YILW. <i>Journal of Industrial Microbiology &amp; Biotechnology</i> , 39(10), 1549–1556. <a href="https://doi.org/10.1007/s10295-012-1155-4">https://doi.org/10.1007/s10295-012-1155-4</a>

Продовження таблиці 2.1

<i>C. glutamicum</i> WM001	Глюкоза - 130, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 35, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 1, MgSO <sub>4</sub> - 0,5, Кукурудзяний екстракт – 15, CaCO <sub>3</sub> - 20, Канаміцин – 0,03, IPTG – 0,12	30 °C 96 год pH=7,2 200 об/хв	29,8	Ma, W., Wang, J., Li, Y., Yin, L., & Wang, X. (2018). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-produced with l-isoleucine in <i>Corynebacterium glutamicum</i> WM001. <i>Microbial Cell Factories</i> , 17(1). <a href="https://doi.org/10.1186/s12934-018-0942-7">https://doi.org/10.1186/s12934-018-0942-7</a> .
<i>C. glutamicum</i> IWJ001/pDXW8-ilvBN1-ilvA1-ppnk1	Глюкоза - 80, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 35, Кукурудзяний екстракт - 20, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 1, MgSO <sub>4</sub> - 1, CaCO <sub>3</sub> - 30, Канаміцин – 0,03 IPTG – 0,24 г/л	30 °C 72 год pH=7,0 180 об/хв	32,3	Yin, L., Zhao, J., Chen, C., Hu, X., & Wang, X. (2014). Enhancing the carbon flux and NADPH supply to increase L-isoleucine production in <i>Corynebacterium glutamicum</i> . <i>Biotechnology and Bioprocess Engineering</i> , 19(1), 132–142. <a href="https://doi.org/10.1007/s12257-013-0416-z">https://doi.org/10.1007/s12257-013-0416-z</a> .

## 2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Corynebacterium glutamicum*

*Corynebacterium glutamicum* належить до групи грампозитивних бактерій, що характеризуються факультативно анаеробним типом дихання та нездатністю до спороутворення. Під час експоненційної фази росту клітини мають паличкоподібну форму, досягаючи розмірів до 3 мкм у довжину [14-16].

При культивуванні на агаризованих поживних середовищах штами *Corynebacterium glutamicum* утворюють характерні колонії круглої форми з блискучою поверхнею. Колір колоній варіює від сріблясто-білого до жовтуватого чи оранжевого відтінку.

Даний мікроорганізм демонструє значну метаболічну пластичність щодо засвоєння різноманітних поживних субстратів, включаючи вуглеводи, спиртові сполуки та органічні кислоти. Особливо важливою для промислової біотехнології є здатність *C. glutamicum* до ефективної конверсії вуглеводних компонентів у амінокислоти в процесі свого метаболізму.

## 2.3. Таксономічний статус

У таблиці 2.2 наведено таксономічний статус *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 відповідно до даних ITIS [17]:

Таблиця 2.2

### Таксономічна характеристика *Corynebacterium glutamicum* YILM1504

Царство	<i>Bacteria</i>
Підцарство	<i>Posibacteria</i>
Тип	<i>Actinobacteria</i>
Підклас	<i>Actinobacteridae</i>
Порядок	<i>Actinomycetales</i>
Підряд	<i>Corynebacterineae</i>
Родина	<i>Corynebacteriaceae</i>
Рід	<i>Corynebacterium</i>
Вид	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Штам	YILM1504

Філогенетичне дерево *Corynebacterium glutamicum* зображене на рис. 2.1.

Рисунок 3

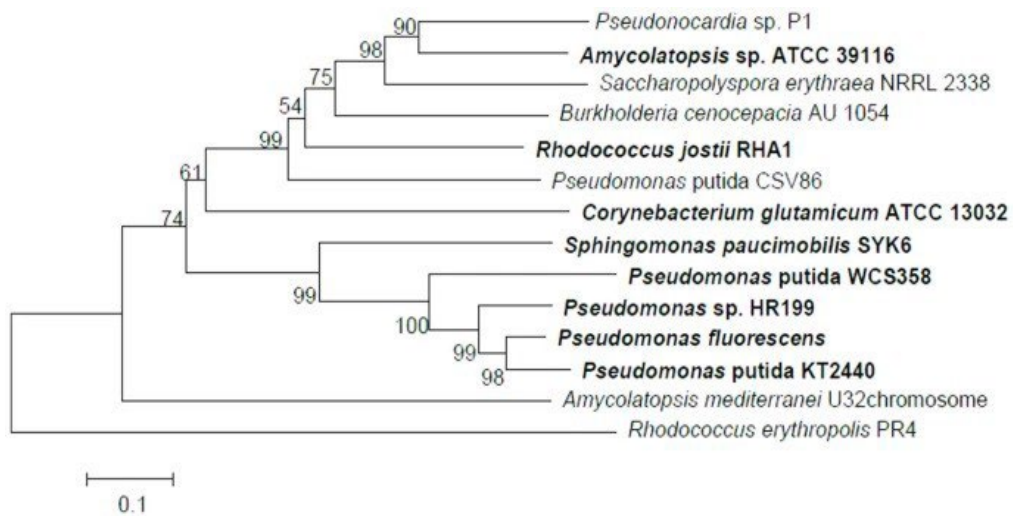


Рис. 2.1. Філогенетичне дерево *Corynebacterium glutamicum* [18]

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба населення України в ізолейцині

Амінокислоти виступають фундаментальними структурними компонентами для біосинтезу білків у живому організмі. Їх регулярне надходження є критично важливим для забезпечення безперервного процесу синтезу білкових молекул та формування м'язової тканини [19].

Особливу увагу слід приділити есенціальним амінокислотам, які організм не здатен синтезувати самостійно, тому їх надходження можливе виключно із зовнішніх джерел. Ці незамінні амінокислоти відіграють ключову роль у процесах біосинтезу м'язових білків, підтримуючи необхідну концентрацію в організмі та запобігаючи катаболічним процесам у м'язовій тканині. Дослідження підтверджують їх позитивний вплив на збільшення об'єму та покращення якісних характеристик м'язової тканини [20].

Протягом останніх 100 років було чітко встановлено важливість споживання всіх незамінних амінокислот, і для кожної з них визначені рекомендовані добові норми як частина звичайного раціону. Добова потреба базується на мінімальній кількості кожної незамінної амінокислоти, яку необхідно споживати, щоб уникнути клінічних симптомів дефіциту. Недостатнє споживання лише однієї з них спричинить симптоми дефіциту, включаючи порушення синтезу білка [21].

Щоденна потреба зазвичай забезпечується через вживання білкових продуктів у звичайному раціоні [22]. З їжею важко отримати достатню кількість незамінних амінокислот, тому для підтримки повноцінного білкового балансу доцільно використовувати харчові добавки. Це особливо актуально для людей, які мають підвищені фізичні навантаження, обмежений раціон або потребують швидкого відновлення після тренувань.

*Ізолейцин є представником незамінних амінокислот, що*

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Баглай Н.А.</i>				<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Судейко Т.Л.</i>						17	12
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

характеризується подвійними метаболічними властивостями - глікогенними та кетогенними. Разом із лейцином та валіном він формує групу амінокислот з розгалуженим ланцюгом (BCAA).

Наукові дослідження демонструють важливу роль BCAA у регуляції енергетичного обміну під час фізичної активності. Ці сполуки виступають не лише як безпосереднє джерело енергії, але й беруть участь у поповненні пулу інтермедіатів циклу трикарбонових кислот (анаплеротичні реакції) та забезпечують субстратами процес гліоконеогенезу [23].

Враховуючи ці функціональні особливості, розробка та виробництво дієтичних добавок, збагачених амінокислотами з розгалуженим ланцюгом, набуває особливого значення для забезпечення енергетичних потреб та оптимізації відновлювальних процесів в організмі.

Використання спеціалізованих харчових добавок, зокрема протеїнових комплексів та препаратів BCAA, дозволяє ефективно забезпечувати організм необхідними амінокислотами без надмірного споживання звичайної їжі. Такі нутрієнтні комплекси мають особливу цінність для декількох категорій споживачів:

- професійних спортсменів з підвищеними потребами в білковому харчуванні
- осіб, що ведуть інтенсивний спортивний спосіб життя
- прихильників силових та витривалісних тренувань
- людей, які потребують прискореного відновлення після фізичних навантажень
- осіб з обмеженнями в харчуванні або на спеціальних дієтичних програмах

Статистичні дані Міністерства молоді та спорту України за 2023 рік свідчать про значний потенціал ринку спортивного харчування, оскільки кількість активних спортсменів становить 689 477 осіб [24].

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва ізолейцину

Амінокислотні добавки, особливо комплекси ВСАА (що включають ізолейцин, лейцин та валін), посідають важливу позицію на світовому ринку спортивного харчування. Їхня популярність особливо висока серед трьох основних груп споживачів: професійних спортсменів, представників бодібілдингу та прихильників активного способу життя.

Зростаючий тренд на використання спортивного харчування безпосередньо корелює з підвищенням суспільного інтересу до здорового способу життя, фітнес-культури та активних спортивних практик. Сучасні споживачі цілеспрямовано шукають ефективні засоби для:

- підвищення спортивних показників
- прискорення відновлювальних процесів після тренувань
- захисту м'язової тканини від навантажувального стресу

Науково доведено, що композиції вільних незамінних амінокислот активують процеси білкового синтезу та оптимізують білковий метаболізм в організмі, включаючи формування нових м'язових білків. Стимуляція синтезу м'язового білка (MPS) за допомогою незамінних амінокислот сприяє не лише кількісному збільшенню м'язової маси, але й покращенню її якісних характеристик, що позитивно впливає на фізичну витривалість та функціональні показники організму [21]. Ці фактори формують стабільний попит на амінокислотні комплекси як дієтичні добавки.

Український ринок спортивного харчування демонструє значну різноманітність, представлену як провідними світовими брендами, так і вітчизняними виробниками. Кожен з них пропонує широкий спектр нутрієнтних добавок, розроблених для задоволення специфічних потреб різних категорій споживачів. Детальний огляд найпопулярніших продуктів спортивного харчування, доступних на українському ринку, наведено в таблиці 3.1.

**Перелік найпопулярніших спортивних добавок з амінокислотними комплексами в Україні**

<b>Назва</b>	<b>Форма випуску</b>	<b>Бренд</b>	<b>Країна</b>
<b>L-isoleucine</b>	капсули	Nutricost	США
<b>BCAA 2:1:1</b>	порошок	Nosorog	Україна
<b>IBCAA 2-1-1 &amp; Vit B<sub>6</sub></b>	порошок	Stark Pharm	Україна
<b>Essential BCAA 2:1:1</b>	порошок	Myprotein	Великобританія
<b>BCAA 2:1:1 natural</b>	порошок	IronFlex	Польща
<b>BCAA Instant</b>	порошок	OstroVit	Румунія
<b>Xtend BCAAs</b>	порошок	Scivation	США
<b>BCAA Zero</b>	порошок	BioTech	США
<b>BCAA 80000 MG</b>	напій	Extrifit	Чехія

Отже, основну частку ринку спортивного харчування з амінокислотними комплексами в Україні становлять імпортні продукти. Однак, українські виробники також поступово розвиваються, задовольняючи зростаючий попит на вітчизняні добавки, особливо серед споживачів, які надають перевагу локальним товарам. Тому припустимо, що частка нашої амінокислотної добавки становитиме 5 % від загального обсягу ринку.

Розраховуємо потенційну кількість українців, які можуть використовувати нашу амінокислотну добавку:

$$689\,477 \times 0,05 = 34\,474 \text{ особи}$$

Одна порція прийому на добу складає - 6 г порошку, яка містить 1250 мг ізолейцину. Отже, на рік для 1 спортсмена, який займається спортом три рази на тиждень (144 дні за рік) потрібно:

$$1250 \text{ мг} \times 144 \text{ дні} = 180\,000 \text{ мг або } 180 \text{ г}$$

Отже, для загальної кількості спортсменів на рік необхідно:

$$G_{\text{гн}} = 34\,474 \times 180 \text{ г} = 6\,205\,320 \text{ г} \approx 6\,205 \text{ кг/рік}$$

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

Виробнича потужність ізолейцину становить  $G_{гп} = 6205$  кг на рік. Ізолейцин виробляється у вигляді сухої субстанції з вмістом залишкової вологості  $W = 5-10$  %, тому вміст сухої речовини в кінцевому продукті варіюється між  $CP = 0,9 - 0,95$ .

*Corynebacterium glutamicum* YILM1504 виробляє 43,67 г ізолейцину на 1 літр культуральної рідини [13].

Ми плануємо виробляти обрану кількість субстанції протягом 280 робочих днів.

Кількість циклів на рік становить:

$$N_{цк} = 24 \times T_{рд} / T_{цф} = 24 \times 330 / 48,5 = 139 \text{ цикли.}$$

Кількість продукту за цикл складає:

$$G_{цк} = G_{гп} / N_{цк} = 6205 / 139 = 45 \text{ кг/цикл.}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один цикл, із врахуванням сумарних втрат цільового продукту при виділенні (40 %):

$$V_{кр.} = K_1 \times G_{цк} \times C_{гп} / P_{кр} (1 - E_{св}) = 1,1 \times 45 \times 0,9 / (43,67 \times (1 - 0,4)) = 1,7 \text{ м}^3$$

, де  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ). Отже, за виробничий цикл отримують  $V_{кр} = 1,7 \text{ м}^3$  культуральної рідини.

При отриманні культуральної рідини слід враховувати її втрати через краплинний відтік через колектор відпрацьованого повітря, що становлять від 10 до 15%.

1,7 м<sup>3</sup> культуральної рідини ( $V_{кр}$ ) можна отримати у ферментері, робочий об'єм якого має становити:

$$V_{роб} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 1,7 / (1 - 0,1) = 1,8 \text{ м}^3$$

, де  $E_{ф}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу. Можливий геометричний об'єм ферментера при  $K_3 = 0,6$

$$V_{мф} = V_{роб} / K_3 = 1,8 / 0,6 = 3 \text{ м}^3$$

Знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер  $V_{\text{ф}} = 3 \text{ м}^3$ . Уточнюємо коефіцієнт заповнення  $K_{\text{зф}} = V_{\text{кр}} / V_{\text{ф}} = 1,8 / 3 = 0,6$  – не перевищує заданого значення.

### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу ізолейцину**

Виробниче культивування *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 для одержання ізолейцину проходить у ферментері з геометричним об'ємом  $3 \text{ м}^3$  із коефіцієнтом заповнення  $0,6$ . Робочий об'єм ферментера становить:

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

Кількість посівного матеріалу становить  $10\%$  від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання  $1,8 \text{ м}^3$  культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 1,8 \times 0,1 = 0,18 \text{ м}^3 \text{ (180 л) посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті об'ємом  $0,3 \text{ м}^3$  (300 л) із коефіцієнтом заповнення  $0,6$ .

Для засіву посівного апарату (одержання 180 л культуральної рідини) необхідно:

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

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у посівному апараті об'ємом  $0,03 \text{ м}^3$  (30 л) із коефіцієнтом заповнення  $0,6$ .

$0,018 \text{ м}^3$  (18 л) культуральної рідини можна одержати із використанням:

$$V_{\text{роб.3}} = 18 \times 0,1 = 1,8 \text{ л посівного матеріалу}$$

Приготування такої кількості інокуляту можна здійснити у 12 колбах на качалці об'ємом 750 мл, кожну з яких заповнюють до 150 мл.

Для полегшення аналізу кількості стадій та обсягів підготовки посівного матеріалу складено узагальнену таблицю 3.2.

**Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу**

Об'єм ферментера, м <sup>3</sup>	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, м <sup>3</sup>	Об'єм посівного матеріалу (10 %), м <sup>3</sup>	Конденсат (10 %), м <sup>3</sup>	Об'єм підготовки поживного середовища, м <sup>3</sup>
3	0,6	1,8	0,18	0,18	1,44
0,3 (300 л)	0,6	0,18 (180)	0,018 (18 л)	0,018 (18 л)	0,144 (144 л)
0,03 (30 л)	0,6	0,018 (18 л)	0,0018 (1,8 л)	0,0018 (1,8 л)	0,0144 (14,4 л)
12 колб по 750 мл	0,2	-	-	-*	0,0018 (1,8 л)

\* стерилізація складових поживного середовища здійснюється в колбах за допомогою автоклавування.

Таким чином, процес отримання посівного матеріалу для біосинтезу ізолейцину у ферментері об'ємом 3 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде реалізовуватися в чотири етапи: культивування в ферментері об'ємом 3 м<sup>3</sup>, культивування в інокуляторах об'ємом 0,3 та 0,03 м<sup>3</sup> і культивування в 12 колбах по 750 мл кожна.

### 3.5. Біосинтез цільового продукту

#### 3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

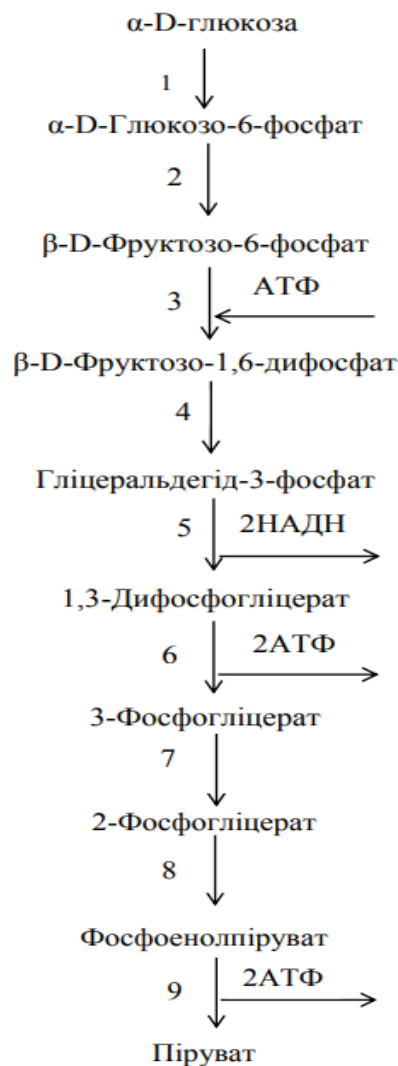
Для біосинтезу ізолейцину *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 як ростовий субстрат використовує глюкозу, катаболізм якої відбувається через гліколітичний шлях.

Відповідно до даних Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [25], катаболізм глюкози у *Corynebacterium glutamicum* розпочинається з її фосфорилування глюкокіназою (КФ 2.7.1.2) до  $\alpha$ -D-глюкозо-6-фосфату. Далі ця сполука ізомеризується глюкозо-6-фосфат-ізомеразою (КФ 5.3.1.9) у  $\beta$ -D-фруктозо-6-фосфат, який за участю 6-фосфофруктокінази (КФ 2.7.1.11) переходить у  $\beta$ -D-фруктозо-1,6-дифосфат.

В результаті розщеплення фруктозо-1,6-дифосфату фруктозо-дифосфат альдолазою (КФ 4.1.2.13) утворюються діоксиацетонфосфат і гліцеральдегід-

3-фосфат. Останній під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) окиснюється до 1,3-дифосфогліцерату, який потім перетворюється на 3-фосфогліцерат за допомогою фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3).

Далі 3-фосфогліцерат трансформується у 2-фосфогліцерат (фосфогліцеромутаза, КФ 5.4.2.11), з якого під дією енолази (КФ 4.2.1.11) утворюється фосфоенолпіруват (ФЕП). Піруваткіназа (КФ 2.7.1.40) каталізує перетворення ФЕП у піруват, який далі ферредоксиноксидоредуктазою (КФ 1.2.7.11) перетворюється на ацетил-КоА.



**Рис. 3.1.** Катаболізм глюкози у *C. glutamicum* згідно з KEGG.

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-дифосфат альдолаза (КФ.4.1.2.13);

- 5 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12);
- 6 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3);
- 7 – фосфогліцеромутаза (КФ.5.4.2.11);
- 8 – енолаза (КФ.4.2.1.11);
- 9 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

### **3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт**

Під час росту *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 на глюкозі піруват утворюється через гліколіз і перетворюється на ацетил-КоА під дією ферредоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.11), який далі залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК). Для поповнення рівня оксалоацетату в ЦТК при використанні глюкози відбувається карбоксилювання фосфоенолпірувату (фосфоенолпіруваткарбоксілаза, КФ 4.1.1.31) та карбоксилювання пірувату (піруваткарбоксілаза, КФ 6.4.1.1).

Оксалоацетат перетворюється на L-аспартат під дією аспартат-амінотрансферази (КФ 2.6.1.1), а потім на L-аспартилфосфат за участю аспартаткінази (КФ 2.7.2.4). Далі утворюється L-аспартат-4-напівальдегід (аспартат-напівальдегіддегідрогеназа, КФ 1.2.1.11), який перетворюється на гомосерин (гомосериндегідрогеназа, КФ 1.1.1.3) і далі на о-фосфогомосерин (гомосерин-кіназа, КФ 2.7.1.39). Останній під дією треонінсинтази (КФ 4.2.3.1) трансформується у треонін, з якого фермент треоніндегідратаза (КФ 4.3.1.19) утворює 2-оксобутаноат.

Одержаний 2-оксобутаноат зв'язується з піруватом і під дією піруватдегідрогенази (КФ 2.2.1.6) перетворюється на S-2-ацето-2-гідрокси-бутаноат. З нього під дією кетол-кислої редуктоізомерази (КФ 1.1.1.86) синтезується R-3-гідрокси-3-метил-2-оксопентаноат, а потім R-2,3-дигідрокси-3-метилпентаноат. Останній під впливом дигідроксикислої дегідратази (КФ 4.2.1.9) перетворюється на S-3-метил-2-пентанову кислоту, з якої амінотрансфераза амінокислот із розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42) синтезує L-ізолейцин.

На рис. 3.2 зображена схема біотрансформації глюкози в ізолейцин за участю *Corynebacterium glutamicum* YILM1504.

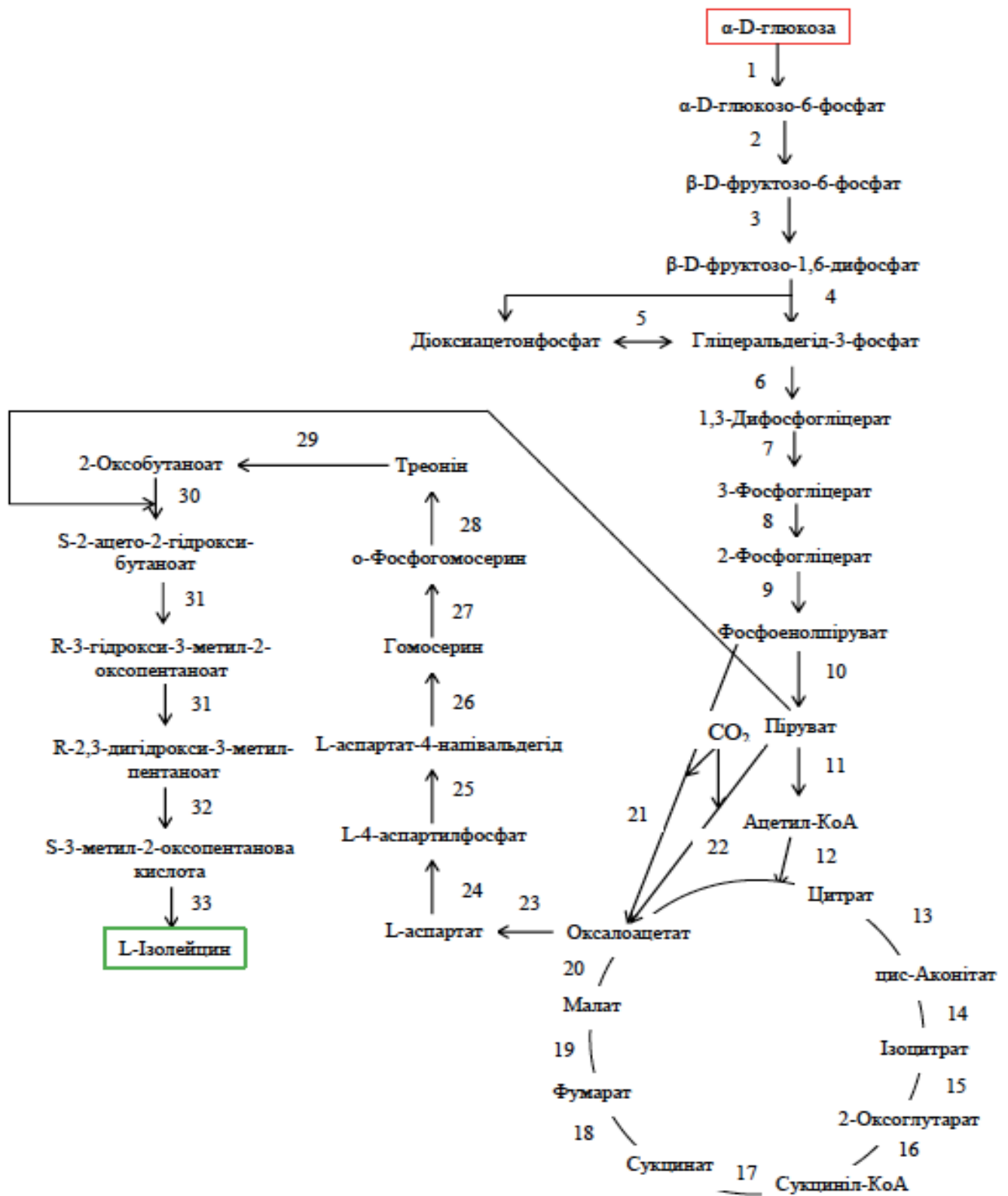


Рис. 3.2. Схема біотрансформації глюкози в ізолейцин за участю *Corynebacterium glutamicum* YILM1504.

- Ферменти: 1) КФ 2.7.1.2 - глюкокіназа;  
2) КФ 5.3.1.9 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза;  
3) КФ 2.7.1.11 - 6-фосфофруктокіназа;  
4) КФ 4.1.2.13 - фруктозо-дифосфат альдолаза;  
5) КФ 1.2.1.12 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа;  
6) КФ 2.7.2.3 – фосфогліцераткіназа;  
7) КФ 5.4.2.11 – фосфогліцеромутаза;  
8) КФ 4.2.1.11 – енолаза;  
9) КФ 2.7.1.40 – піруваткіназа;  
10) КФ 1.2.7.11 – фередоксиноксидоредуктаза;  
11) КФ 2.3.3.1 – цитратсинтетаза;  
12) КФ 2.3.3.1 – цитратсинтетаза;  
13) КФ 4.2.1.3 – аконітатгідратаза;  
14) КФ 4.2.1.3 – аконітатгідратаза;  
15) КФ 1.1.1.42 – ізоцитратдегідрогеназа;  
16) КФ 2.3.1.61 - 2-оксоглутаратдегідрогеназа;  
17) КФ 6.2.1.5 - сукциніл-КоА-синтетаза;  
18) КФ 1.3.5.1 – сукцинатдегідрогеназа;  
19) КФ 4.2.1.2 – фумаратгідратаза;  
20) КФ 1.1.1.37 – малатдегідрогеназа;  
21) КФ 4.1.1.31 – фосфоенолпіруваткарбоксилаза;  
22) КФ 6.4.1.1 – піруваткарбоксилаза;  
23) КФ 2.6.1.1 - аспартат-амінотрансфераза  
24) КФ 2.7.2.4 – аспартаткіназа;  
25) КФ 1.2.1.11 - аспартат-напівальдегід-дегідрогеназа;  
26) КФ 1.1.1.3 - гомосерин-дегідрогеназа;  
27) КФ 2.7.1.39 - гомосерин-кіназа;  
28) КФ 4.2.3.1 – треонінсинтаза;  
29) КФ 4.3.1.19 - треонін-дегідратаза;  
30) КФ 2.2.1.6 – піруватдегідрогеназа;

- 31) КФ 1.1.1.86 - кетол-кисла редуктоізомераза;
- 32) КФ 4.2.1.9 - дигідрокисла дегідратаза;
- 33) КФ 2.6.1.42 - аміотрансфераза амінокислот із розгалуженим ланцюгом.

## РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ІЗОЛЕЙЦИНУ

### 4.1. Обґрунтування вибору умов культивування і типу ферментера

*Corynebacterium glutamicum* є облигатним аеробом, а тому потребує постійного доступу до кисню для нормального росту та метаболічної активності. Для ефективного біосинтезу ізолейцину необхідно забезпечити стерильне аераційне повітря, оскільки його забруднення може негативно вплинути на процес культивування. Інтенсивне перемішування також є обов'язковою умовою, оскільки воно сприяє рівномірному розподілу кисню в культуральному середовищі та запобігає утворенню зон із недостатнім газообміном.

Ріст *Corynebacterium glutamicum* залежить від кислотно-лужного балансу середовища. Оптимальним є діапазон рН 6,7–7,0, хоча організм може підтримувати життєдіяльність у ширших межах від 6,0 до 9,0. Найбільш сприятливі умови для швидкого розвитку бактерій спостерігаються при рН 7,0–8,5. Температурний режим також відіграє ключову роль у культивуванні, а найбільш підходящою температурою для росту є 32 °С.

Посів культури можна здійснювати глибинним або поверхневим методом. Проте поверхнєве культивування має суттєві обмеження, зокрема недостатню площу росту, оскільки бактерії розвиваються лише на межі живильного середовища з повітрям. Натомість глибинний метод забезпечує рівномірний розподіл клітин у всьому об'ємі середовища, що сприяє їх інтенсивному росту та підвищенню виходу кінцевого продукту. Тому саме глибинний метод є більш ефективним для вирощування *Corynebacterium glutamicum*.

Щодо режиму культивування, можливе використання як безперервного, так і періодичного процесу.

					НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Баглай Н.А.				РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ІЗОЛЕЙЦИНУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Сулейко Т.Л.						29	11
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Проте з огляду на аеробний характер бактерій доцільніше застосовувати періодичний метод, який дозволяє ретельніше контролювати всі важливі параметри, включаючи рівень рН, концентрацію розчиненого кисню та температуру. Такий підхід дає змогу коригувати умови середовища у разі відхилень, що є важливим для стабільного росту культури та ефективного синтезу ізoleyцину [26].

Для культивування *Corynebacterium glutamicum* необхідний аеробний біореактор із системою глибинного культивування, що забезпечує рівномірне перемішування та ефективну аерацію. Ферментер має бути оснащений механічною мішалкою та барботером для подачі стерильного повітря, а також датчиком розчиненого кисню для контролю аерації. Важливими параметрами є підтримка оптимального рівня рН у межах 6,7–7,0 за допомогою датчика рН із системою коригування, а також контроль температури на рівні 32 °С завдяки вбудованій нагрівальній та охолоджувальній системі.

Культивування пропонується проводити періодичним способом протягом 46 годин зі швидкістю перемішування 200 об/хв, що забезпечить оптимальні умови для росту культури та біосинтезу ізoleyцину.

#### **4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря для одержання ізoleyцину**

Так як продуцент ізoleyцину *C. glutamicum* YILM1504 є аеробом, то для його росту необхідна постійна подача стерильного повітря, що передбачає у технологічній схемі підготовку стерильного аераційного повітря.

Для стерилізації повітря в мікробіологічних боксах і лабораторіях, де готують посівний матеріал та інокулят, застосовують ультрафіолетове випромінювання за допомогою ультрафіолетових ламп.

Підготовка стерильного аераційного повітря здійснюється наступним чином:

1. Атмосферне повітря захоплюється через забірну шахту, розташовану на висоті приблизно 16 метрів (висота двоповерхової будівлі з урахуванням даху), і подається за допомогою турбокомпресора.

2. Потім, для ефективного зниження рівня контамінантів, повітря проходить через фільтри попереднього очищення, де видаляються великі частки пилу та інші аерозолі.

3. Стиснення повітря в турбокомпресорі до тиску 0,35–0,5 МПа, що викликає підвищення його температури до 120–250 °С та збільшення кількості вологи в об'ємі повітря.

4. Щоб запобігти злипанню волокон і утворенню каналів, повітря охолоджується у краплевловлювачі за допомогою теплообмінника, що призводить до конденсації вологи.

5. Підігрівання повітря здійснюється у теплообмінниках.

6. Видалення конденсованої вологи, яка надходить з компресора, проводиться в ресивері.

7. Очищення повітря здійснюється на основних фільтрах.

8. Подальша очистка повітря відбувається через індивідуальні фільтри. Від основних фільтрів повітря потрапляє до колектора, звідки надходить в індивідуальні фільтри третього рівня, встановлені на кожному ферментері, які затримують 99,999% мікроорганізмів [27].

#### **4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування *Corynebacterium glutamicum* YILM1504**

Процес отримання посівного матеріалу буде здійснюватися в 4 етапи: спочатку засів у 12 качалкових колбах об'ємом 750 мл, потім в інокуляторі об'ємом 30 л, далі в інокуляторі об'ємом 300 л і, зрештою, засів у ферментер об'ємом 3 м<sup>3</sup>. Вирощування посівного матеріалу та біосинтез *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 відбувається на поживному середовищі із наступним складом [13]:

Глюкоза – 70 г/л

Кукурудзяний екстракт	– 50 г/л
Кукурудзяний гідролізат	– 20 г/л
Пептон	– 10 г/л
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	– 3 г/л
Глутамат	– 3 г/л
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	– 2,2 г/л
Дріжджовий екстракт	– 2 г/л
Лізін	– 1 г/л
Метіонін	– 0,2 г/л
Рибофлавін	– 0,2 мг/л

Виробничий біосинтез проходить на такому ж поживному середовищі, але з 10 год культивування додається додецилсульфат натрію в концентрації 1,5 г/л, в якості піногасника. Дані, наведені в табл. 4.1, свідчать про те, що для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 30 л і 300 л та для стадії виробничого біосинтезу, необхідно готувати запасний розчин рибофлавіну (з розрахунку 0,1 г на 1000 мл розчину), який вноситиметься в розрахунку 0,1 мл на 100 мл середовища.

Таблиця 4.1

**Розрахунок вмісту рибофлавіну у різних об'ємах поживного середовища**

Об'єм поживного середовища, л	Вміст рибофлавіну, г
1,8	0,18
14,4	1,44
144	14,4
1440	144
<b>Всього</b>	<b>160 г</b>

**4.3.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках**

Для вирощування *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 у колбах на качалках використовують поживне середовище, де глюкоза є джерелом енергії та вуглецю, а пептон та дріжджовий екстракт – джерелом азоту в середовищі. Для цього необхідно приготувати 1800 мл поживного

середовища у 12 колбах об'ємом 750 мл задля попередження контакту вмісту колби із ватно-марлевою пробкою, що є джерелом прямої контамінації.

**Композиція А:** глюкоза, кукурудзяний гідролізат, кукурудзяний екстракт, пептон, лізин, метіонін та глутамат (режим стерилізації – 112°C, 0,05 МПа протягом 20-30 хв).

**Композиція Б:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації – 131°C, 0,15 МПа протягом 40-60 хв).

До складу композиції А входять термолабільні компоненти, такі як глюкоза, кукурудзяний гідролізат, кукурудзяний екстракт, пептон, лізин, метіонін та глутамат (режим стерилізації: 112°C, 30 хв). До складу композиції Б входять  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та стерилізуються за стандартною для солей температури 131°C протягом 40 хв, 0,15 МПа. Окремо готують концентрований розчин рибофлавіну, так як його концентрація занадто низька, що унеможлиблює його зважування на технічних вагах, тому виникає потреба у приготуванні запасного розчину. Розчин рибофлавіну стерилізують в автоклаві при 112°C протягом 30 хв, 0,05 Мпа. Додецилсульфат натрію готують та стерилізують окремо, так як він вноситься в поживне середовище з 10 год культивування (режим стерилізації:  $t = 131^\circ\text{C}$ , 40 хв, 0,15 МПа).

Розрахунок необхідних обсягів компонентів поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках подано в таблиці 4.2:

Таблиця 4.2

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,8 л поживного середовища**

Компоненти	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1,8 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	70	126	А	1,2
Дріжджовий екстракт	2	3,6		
Кукурудзяний гідролізат	20	36		
Кукурудзяний екстракт	50	90		

Продовження таблиці 4.2

Пептон	10	18		
Лізин	1	1,8		
Метіонін	0,2	0,36		
Глутамат	3	5,4		
<b>Вода</b>		<b>1200 мл</b>		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	5,4	<b>Б</b>	0,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,2	3,96		
<b>Вода</b>		<b>600 мл</b>		
Розчин рибофлавіну	1	1,8 мл	-	0,0018

**4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторах**

Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 30 л

Стерилізація 14,4 л середовища здійснюється у збірниках. Поділ композицій відбувається за тим же принципом, що і на попередній стадії.

Розрахунок необхідних обсягів компонентів поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л наведений у табл. 4.3:

Таблиця 4.3

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 14,4 л поживного середовища**

Компоненти	Вміст, г/л	Кількість для приготування 14,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	70	1008	<b>А</b>	<b>8,6</b>
Дріжджовий екстракт	2	28,8		
Кукурудзяний гідролізат	20	288		
Кукурудзяний екстракт	50	720		
Пептон	10	144		
Лізин	1	14,4		
Метіонін	0,2	2,88		
Глутамат	3	43,2		

<b>Вода</b>		<b>7,8 л</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>0,8 л</b>		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	43,2	<b>Б</b>	<b>5,8</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,2	31,68		
<b>Вода</b>		<b>5,2 л</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>0,6 л</b>		
Розчин рибофлавіну	1 мл	14,4 мл	-	<b>0,0144</b>

*Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 300 л*

Стерилізація 144 л середовища здійснюється у збірниках. Поділ композицій відбувається за тим же принципом, що і на попередній стадії.

Розрахунок необхідних обсягів компонентів поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л наведений у табл. 4.4:

Таблиця 4.4

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 144 л поживного середовища**

Компоненти	Вміст, г/л	Кількість для приготування 144 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	70	10080	<b>А</b>	<b>85,4</b>
Дріжджовий екстракт	2	288		
Кукурудзяний гідролізат	20	2880		
Кукурудзяний екстракт	50	7200		
Пептон	10	1440		
Лізин	1	144		
Метіонін	0,2	28,8		
Глутамат	3	432		
<b>Вода</b>		<b>78 л</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>7,4 л</b>		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	432	<b>Б</b>	<b>58,4</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,2	316,8		
<b>Вода</b>		<b>54 л</b>		

<b>Конденсат</b>		<b>4,4 л</b>		
Розчин рибофлавіну	1 мл	144 мл	-	<b>0,144</b>

#### 4.3.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу ізoleyцину

Для стадії виробничого біосинтезу потрібно приготувати 1440 л поживного середовища. Поділ композицій відбувається за тим же принципом, що і на попередній стадії, але з 16 год культивування додають 80% розчин глюкози для підживлення та додецилсульфат натрію з 10 год культивування.

Розрахунок необхідних обсягів компонентів поживного середовища для вирощування посівного матеріалу для виробничого культивування у ферментері об'ємом 3 м<sup>3</sup> наведений у табл. 4.5:

Таблиця 4.5

#### Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1440 л поживного середовища

Компоненти	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1440 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	70	10,08	А	744,4
Дріжджовий екстракт	2	0,288		
Кукурудзяний гідролізат	20	2,88		
Кукурудзяний екстракт	50	7,2		
Пептон	10	1,44		
Лізин	1	0,144		
Метіонін	0,2	0,288		
Глутамат	3	4,32		
<b>Вода</b>		<b>677 л</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>67,4 л</b>		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	4,32	Б	554,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,2	3,168		
<b>Вода</b>		<b>504 л</b>		
<b>Конденсат</b>		<b>50,2 л</b>		

Розчин рибофлавіну	1 мл	1,44 л	-	<b>1,44</b>
Підживлювальний розчин глюкози	75	108	-	<b>135</b>
Додецилсульфат натрію	1,5	2,16	-	<b>5</b>
<b>Вода</b>		<b>2,5 л</b>		

Для визначення методики приготування окремих компонентів середовища (розчин рибофлавіну) і допоміжних розчинів (таких як соляна кислота та луг), а також для вибору відповідних колб або реакторів, проведемо розрахунок кількості цих компонентів, необхідних для створення середовища на кожній з чотирьох стадій виробничого процесу (див. табл. 4.6).

#### ***Обґрунтування приготування та стерилізації підживлювального розчину глюкози***

Початкова концентрація глюкози в поживному середовищі становить 70 г/л. Автори Xiong & Xu [8], повідомили, що з 16 години культивування додавали 80 % розчин глюкози, щоб підтримувати залишковий цукор у резервуарі між 10–20 г/л. Також нам відомо, що кількість споживання глюкози становить 0,3 г/л [8]. Отже, щоб розрахувати необхідний об'єм підживлювального розчину потрібно знайти загальну кількість глюкози, необхідну для утворення всієї кількості ізолейцину.

$$C_{\text{глюкози}} = \frac{43,6}{0,3} = 145 \text{ г/л}$$

Знаючи загальну та початкову концентрацію глюкози знаходимо кількість глюкози, яку необхідно внести в якості розчину підживлення:

$$145 - 70 = 75 \text{ г/л}$$

Проведемо розрахунок необхідної кількості глюкози для приготування підживлювального розчину. При об'ємі виробничого середовища 1440 л складаємо пропорцію:

$$1 \text{ л середовища} \text{ — } 75 \text{ г глюкози} \quad 1440 \text{ л середовища} \text{ — } X \text{ г глюкози}$$

$$X = 1440 \times 75 = 108000 \text{ г} = 108 \text{ кг глюкози}$$

Для визначення об'єму 80%-го підживлювального розчину, що містить необхідну кількість глюкози, складаємо пропорцію:

$$0,1 \text{ м}^3 \text{ розчину} \text{ — } 80 \text{ кг глюкози} \quad V \text{ м}^3 \text{ розчину} \text{ — } 108 \text{ кг глюкози}$$

$$V = (108 \times 0,1)/80 = 0,135 \text{ м}^3 = 135 \text{ л підживлювального розчину}$$

Підготовка та стерилізація розрахованого об'єму розчину (0,135 м<sup>3</sup>) проводиться в реакторі-змішувачі місткістю 250 л при наступних параметрах стерилізації: температура 112°C протягом 30 хвилин.

Далі необхідно розрахувати кількість підживлень та об'єм розчину глюкози для кожного підживлення, враховуючи, що загальна тривалість біосинтезу ізолейцину складає 46 годин. Підживлення вноситься у середовище з 16 год. Отже для внесення підживлювального розчину залишається 46 – 16 = 30 год. Прийmemo, що кількість порцій підживлення становить 5, тобто розчин вноситься кожні 6 годин. З цього випливає, що з кожною порцією підживлення у середовище необхідно внести 135/5 = 22,5 л 80%-го підживлювального розчину глюкози.

#### **4.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника**

Приготування титрувальних агентів для регуляції рН під час біосинтезу ізолейцину є необов'язковим. В статті присвяченій біосинтезу ізолейцину *S. glutamicum* YILM1504 [13], немає жодної згадки про обов'язкове титрування або регулювання рН у процесі культивування продуцента. Це свідчить про те, що сам продуцент здатний підтримувати оптимальний рівень рН, або ж склад поживного середовища забезпечує достатній буферний ефект, стабілізуючи рН протягом усього процесу культивування.

Додатково важливо відзначити, що поживне середовище містить компоненти, які не створюють нерозчинних осадів під час стерилізації, що забезпечує його гомогенність та стабільність фізико-хімічних властивостей, зокрема рН. Також можливо, що певні компоненти середовища, як такі

фосфати або амонійні солі, забезпечують функцію природних буферів, підтримуючи необхідний рівень рН без додаткового втручання.

Додецилсульфат натрію (SDS) є основним компонентом, який спричиняє піноутворення під час культивування, оскільки він є поверхнево-активною речовиною, що знижує поверхневий натяг рідини і сприяє утворенню бульбашок. Це призводить до інтенсивного піноутворення, особливо при аерації або перемішуванні.

Для боротьби з піною, викликану SDS, ефективно застосовуються піногасники-рекуператори (дефоамери). Це механічні пристрої, які встановлюються в реакторі та руйнують піну шляхом обертання або використання спеціальних пластин, що переривають бульбашки повітря. Використання дефоамерів дозволяє зменшити або усунути піну без додавання хімічних речовин, що робить цей метод безпечним і ефективним для процесів культивування [28].

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

### Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу ізoleyцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрозбірник	1	Ємність: 1-2 м <sup>3</sup> , робочий тиск: 0,5-2 бар (виробник: Atlas Copco) <a href="https://www.atlascopco.com/uk-ua/compressors/products/air-compressor">https://www.atlascopco.com/uk-ua/compressors/products/air-compressor</a>
ФГО-2	Фільтр грубої очистки	1	Продуктивність: до 1000 м <sup>3</sup> /год, ступінь фільтрації: від 100 мкм (виробник: Donaldson) <a href="https://www.buyfilteronline.com/brands/donaldson/?gad_source=1&amp;gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUIV2etU2MyEJacKiwRhiZG3UAMGyfTppWOYBlaxizo3gWxKVMo5K5gaAo25EALw_wcB">https://www.buyfilteronline.com/brands/donaldson/?gad_source=1&amp;gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUIV2etU2MyEJacKiwRhiZG3UAMGyfTppWOYBlaxizo3gWxKVMo5K5gaAo25EALw_wcB</a>
К-3	Компресор	1	Продуктивність: 100-2000 м <sup>3</sup> /год, тиск: 0,5-1,5 бар, потужність: 15-30 кВт (виробник: Ingersoll Rand) <a href="https://www.ingersollrand.com/en/air-compressor/turbo-air-compressors">https://www.ingersollrand.com/en/air-compressor/turbo-air-compressors</a>
ТО-4	Теплообмінник -охолоджувач	1	Продуктивність: до 500 л/год, температура охолодження: до +5°C, тип: пластинчастий (виробник: Alfa Laval) <a href="https://en.bjhuaaixin.com/Recommended/2.html?gad_source=1&amp;gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUmo-34uNeMPtv8wNIKUxPZ2YWG-ha3QrTl_zg0lzsBZqrc50vr3ZsaAlZiEALw_wcB">https://en.bjhuaaixin.com/Recommended/2.html?gad_source=1&amp;gclid=Cj0KCQjwgrO4BhC2ARIsAKQ7zUmo-34uNeMPtv8wNIKUxPZ2YWG-ha3QrTl_zg0lzsBZqrc50vr3ZsaAlZiEALw_wcB</a>
Р-5	Ресивер	1	Об'єм: 0,5-2 м <sup>3</sup> , тиск: 0,5-2 бар (виробник: Festo) <a href="https://www.festo.com/ua/uk/a/192159/">https://www.festo.com/ua/uk/a/192159/</a>

НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум. №	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.	Баглай Н.А.								
Перевір.	Судейко Т.Л.						40	5	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н.Контр.									
Затверд.	Стабніков В.П.								

Продовження таблиці 5.1

ТН-6	Теплообмінник -нагрівач	1	Продуктивність: до 500 л/год, температура нагріву: до +90°C, тип: пластинчастий (виробник: Guntner) <a href="https://en.ahlsell.se/en/products/cooling/heat-exchanger/evaporators/spare-parts-guntner/7443031">https://en.ahlsell.se/en/products/cooling/heat-exchanger/evaporators/spare-parts-guntner/7443031</a>
ФТО-7	Фільтр тонкого очищення	1	Ступінь фільтрації: 5-10 мкм, продуктивність: до 500 м³/год (виробник: Donaldson) <a href="https://art-agro.com.ua/filtri-donaldson">https://art-agro.com.ua/filtri-donaldson</a>
ІФ-10 ІФ-17 ІФ-28	Фільтр надтонкого очищення	3	Ступінь фільтрації: 0,1-1 мкм, продуктивність: до 3400 м³/год (виробник: Інтерхолод) <a href="https://interholod.com.ua/ua/p716654683-filtry-tonkoj-ochistki.html">https://interholod.com.ua/ua/p716654683-filtry-tonkoj-ochistki.html</a>
РЗ-8	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Об'єм: 20 літрів з нержавіючої сталі AISI 316L з мішалкою та сорочкою, частота обертання якірної мішалки - 0-70 об/хв (виробник: STS Group) <a href="https://prom.ua/ua/p1723663252-reaktor-laboratornyj-litrov.html?utm_source=google_product&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pla&amp;utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&amp;gad_source=1&amp;gclid=Cj0KCQiA4rK8BhD7ARIsAFe5LXLwwED1hMC9lqWEOVZkIm81Xef4dKU_9aL1zXFUFPTsMnfjybPyRc8aAmrTEALw_wcB">https://prom.ua/ua/p1723663252-reaktor-laboratornyj-litrov.html?utm_source=google_product&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pla&amp;utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&amp;gad_source=1&amp;gclid=Cj0KCQiA4rK8BhD7ARIsAFe5LXLwwED1hMC9lqWEOVZkIm81Xef4dKU_9aL1zXFUFPTsMnfjybPyRc8aAmrTEALw_wcB</a>
РЗ-9	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Об'єм: 10 літрів з нержавіючої сталі AISI 316L з мішалкою та сорочкою, частота обертання мішалки - 0~600 об/хв; (виробник: ACHIEVECHEM) <a href="https://ua.achievechem.com/chemical-equipment/stainless-steel-reactor.html">https://ua.achievechem.com/chemical-equipment/stainless-steel-reactor.html</a>
І-11	Інокулятор	1	Об'єм: 30 л, матеріал: нержавіюча сталь SS 316L; внутрішній тиск – 0,2 МПа; швидкість обертання мішалки – 400 об/хв; габаритні розміри: діаметр – 300 мм, довжина – 1600 мм. (Виробник: RUIAN GLOBAL MACHINERY CO LTD) <a href="https://chinapharmamachine.com/product/fermentation-tank">https://chinapharmamachine.com/product/fermentation-tank</a>

Продовження таблиці 5.1

Д-12 Д-19 Д-22 Д-25	Об'ємно-ваговий дозатор	4	Дозатор напівавтоматичний; модель: ВДСВ-2; тип – з вібраційним живильником; межі зважування: найменша межа дозування – 50 г/мл, найбільша межа дозування – 15 кг/мл; об'єм бункера – 420 л; похибка дозування – 0,35%
РЗ-13	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Об'єм: 200 л, матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L (виробник: STS Group) <a href="https://prom.ua/ua/p1016488897-reaktor-200-litrov.html">https://prom.ua/ua/p1016488897-reaktor-200-litrov.html</a>
Н-14 Н-16 Н-24 Н-27	Відцентровий насос	4	Модель: Vitals aqua PRO CP 10100Y Продуктивність: 100 л/год, робоча частота обертання - 2850 об/хв, споживча потужність – 1000 Вт (виробник: «Фуян Нью Інджа Памп Ко ЛТД») <a href="https://vitals-aqua.ua/poverhnostnyye-nasosy/tsentrobezhnnyye-seriya-cp/pro-cp-10100y">https://vitals-aqua.ua/poverhnostnyye-nasosy/tsentrobezhnnyye-seriya-cp/pro-cp-10100y</a>
РЗ-15	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Об'єм: 100 л, матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L, частота обертання якірної мішалки - 0-150 об/хв, габаритні розміри (Д х Ш х В), мм -700х700х1500 (виробник: STS Group) <a href="https://prom.ua/ua/p1720299542-reaktor-rubashkoj-meshalkoj.html">https://prom.ua/ua/p1720299542-reaktor-rubashkoj-meshalkoj.html</a>
І-18	Інокулятор	1	Об'єм: 300 л, матеріал: нержавіюча сталь SS 316L; внутрішній тиск – 0,2 МПа; швидкість обертання мішалки – 340 об/хв; габаритні розміри: діаметр – 600 мм, довжина – 2400 мм. (Виробник: RUIAN GLOBAL MACHINERY CO LTD) <a href="https://chinapharmamachine.com/product/fermentation_tank">https://chinapharmamachine.com/product/fermentation_tank</a>

Продовження таблиці 5.1

P3-20	<p>Реактор-змішувач для приготування підживлювального розчину глюкози</p>	1	<p>Об'єм: 250 л, матеріал: нержавіюча сталь; Частота обертання якорної заважки – 93,3 об/хв; габаритні розміри (Д х Ш х В) - 1050 х 1050 х 1600 мм (виробник: STS Group)  <a href="https://prom.ua/ua/p1719804126-himicheskij-reaktor-250.html?utm_source=google_product&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pla&amp;utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&amp;gad_source=1&amp;gclid=Cj0KCQiA19e8BhCVARIsALpFMgGVcCmvrug3rJGersqohJX7v63xHUdexMvF5q8ENqNCTvUeIpVezB0aAkH0EALw_wcB">https://prom.ua/ua/p1719804126-himicheskij-reaktor-250.html?utm_source=google_product&amp;utm_medium=cpc&amp;utm_content=pla&amp;utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&amp;gad_source=1&amp;gclid=Cj0KCQiA19e8BhCVARIsALpFMgGVcCmvrug3rJGersqohJX7v63xHUdexMvF5q8ENqNCTvUeIpVezB0aAkH0EALw_wcB</a></p>
P3-13	<p>Реактор-змішувач для приготування композиції А</p>	1	<p>Об'єм: 1,5 м<sup>3</sup>, матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L, габаритні розміри: 1740х1530х2530 мм, частота обертання мішалки – від 100 до 300 об/хв (Виробник: Промвіт)  <a href="https://promvit.com.ua/reaktor-fermentator-1500-l-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rastenij/">https://promvit.com.ua/reaktor-fermentator-1500-l-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rastenij/</a></p>
P3-26	<p>Реактор-змішувач для приготування композиції Б</p>	1	<p>Об'єм: 1 м<sup>3</sup>, матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L, габаритні розміри: 1400×1400×2400 мм, частота обертання рамної мішалки - 70 об/хв, потужність реактора: 5,5 кВт (Виробник: STS Group)  <a href="https://stprom.com.ua/ua/p1723667546-reaktor-laboratornyj-1000.html?srsltid=AfmBOop4jwgITFSaBvKKiXREsDOyg-hStqR2T8DRT4dd0k9QXTYPrxzj">https://stprom.com.ua/ua/p1723667546-reaktor-laboratornyj-1000.html?srsltid=AfmBOop4jwgITFSaBvKKiXREsDOyg-hStqR2T8DRT4dd0k9QXTYPrxzj</a></p>

*Закінчення таблиці 5.1*

Ф-29	Ферментер	1	Об'єм: 3 м <sup>3</sup> , матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; габаритні розміри: діаметр – 1300 мм, довжина – 4300 мм, частота обертання мішалки – 160 об/хв, потужність двигуна: 4 кВт (Виробник: RUIAN GLOBAL MACHINERY CO LTD) <a href="https://chinapharmamachine.com/product/fermentation_tank">https://chinapharmamachine.com/product/fermentation_tank</a>
------	-----------	---	--

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### ДР 1. Підготовка аераційного повітря

#### ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Повітря забирається через повітрозабірник (ПЗ-1), розташований на найвищій точці будівлі на висоті 10 м, що враховує висоту поверху та нахил даху. Тут також розміщуються системи для стиснення та очищення повітря.

#### ДР 1.2. Груба очистка повітря

Необхідно провести грубе очищення повітря від пилу та механічних часток. Цей етап здійснюється за допомогою фільтра (Ф-2), що має здатність затримувати 80% часток.

#### ДР 1.3. Компресування повітря

Компресор (К-3) стискає повітря до тиску 0,4 МПа. Під час цього процесу повітря нагрівається, тому наступним етапом є охолодження.

#### ДР 1.4. Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості

Для зменшення вологи повітря охолоджується до 19 °С у теплообміннику (ТО-4), після чого волога конденсується в ресивері (Р-5), що дозволяє знизити вологість до 60%.

#### ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охоложене повітря нагрівається до 30 °С в теплообміннику (ТН-6) для запобігання утворенню конденсату на фільтрах.

#### ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря пропускають через головний фільтр (Ф-7), де його чистота збільшується до 95%.

#### ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед подачею повітря до посівних апаратів та ферментера, використовуються індивідуальні фільтри (ІФ-10, ІФ-17, ІФ-28), які

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Баглай Н.А.</i>					45	8
<i>Перевір.</i>		<i>Судейко Т.Л.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н.Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

забезпечують ефективність очищення до 99,99998%.

## **ДР 2. Приготування запасного розчину рибофлавіну**

*Таблиця 6.1*

### **Розрахунок вмісту та особливості приготування розчину рибофлавіну**

<b>Об'єм поживного середовища, л</b>	<b>Розчин рибофлавіну</b>	
	<b>Об'єм, мл</b>	<b>Особливість приготування</b>
1,8	1,8	Колба об'ємом 3 л
14,4	14,4	
144	144	
1440	1440	

#### *ДР 2.1. Приготування та стерилізація запасного розчину рибофлавіну*

Процедуру приготування розчину рибофлавіну можна описати наступним чином:

Наважку рибофлавіну масою 160 г, визначену на технічних вагах, переносять у колбу місткістю 3000 мл. До наважки додають 1600 мл дистильованої води, яку відміряють за допомогою мірного циліндра. Вміст колби ретельно перемішують до повного розчинення компонентів. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та проводять стерилізацію в автоклаві при температурі 112°C та тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин.

## **ДР 3. Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози**

#### *ДР 3.1. Приготування та стерилізація 80%-го розчину глюкози для виробничого біосинтезу*

У реактор-змішувач (РЗ-20) місткістю 250 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-19) вносять 24,3 кг глюкози. Водопровідну воду в кількості 135 л подають через лічильник. Після внесення компонентів вмикають перемішувальний пристрій і проводять гомогенізацію до повного розчинення глюкози. Стерилізацію розчину здійснюють безпосередньо в

реакторі-змішувачі при наступних параметрах: температура 112°C, тривалість 30 хвилин, тиск 0,05 МПа.

Готовий підживлювальний розчин перекачують за допомогою насосу (Н-21) у ферментер (Ф-29) 5-ма порціями кожні 6 год.

#### **ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища**

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

Для нарощування посівного матеріалу на даному етапі потрібно підготувати 1,8 л поживного середовища.

##### *ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А*

За допомогою технічних вагів проводять зважування компонентів поживного середовища:

- глюкоза - 126 г,
- дріжджовий екстракт - 3,6 г,
- кукурудзяний гідролізат - 36 г,
- кукурудзяний екстракт - 90 г,
- пептон - 18 г,
- лізин - 1,8 г,
- метіонін - 0,36 г,
- глутамат - 5,4 г.

Зважені компоненти переносять у колбу місткістю 2 л, додають 1200 мл водопровідної води, відміряної мірним циліндром, та ретельно перемішують до повного розчинення. Отриману композицію стерилізують в автоклаві за наступних умов: температура 112°C, тривалість 30 хвилин, тиск 0,05 МПа.

##### *ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

За допомогою технічних вагів проводять зважування мінеральних компонентів:

- сульфат амонію ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) - 5,4 г,
- дигідрофосфат калію (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) - 3,96 г.

Зважені солі переносять у колбу місткістю 1 л, додають 600 мл водопровідної води, відміряної мірним циліндром, та ретельно перемішують до повного розчинення. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві за наступних умов: температура 131°C, тривалість 40 хвилин, тиск 0,15 МПа.

*ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі на 30 л*

Для цієї стадії вирощування інокуляту потрібно приготувати 14,4 л поживного середовища.

*ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А*

У реактор-змішувач РЗ-8 (об'єм 20 л) через гребінку завантажують попередньо зважені на технічних вагах компоненти:

1. глюкозу - 1008 г,
2. кукурудзяний екстракт - 720 г,
3. кукурудзяний гідролізат - 288 г,
4. пептон - 144 г,
5. глутамат - 43,2 г,
6. дріжджовий екстракт - 28,8 г,
7. лізин - 14,4 г,
8. метіонін - 2,88 г,

За допомогою лічильника додають 7,8 л водопровідної води та вмикають перемішування. Стерилізацію суміші проводять безпосередньо в реакторі протягом 30 хвилин при температурі 112°C та тиску 0,05 МПа.

*ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 43,2 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 31,7 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Відважені компоненти поміщають у реактор-змішувач (РЗ-9) об'ємом 10 л. Далі, використовуючи лічильник, доливають 5,2 л водопровідної води, потім вмикають мішалку. Далі композицію самоплином подають в інокулятор (І-11). Стерилізація композиції відбувається в інокуляторі за температури 131°C упродовж 40 хв, під тиском 0,15 МПа.

*ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі на 300 л*

На стадії вирощування інокуляту готують 144 л поживного середовища.

*ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-12) у реактор-змішувач (РЗ-13) об'ємом 200 л поміщають 10,08 кг глюкози, 0,288 кг дріжджового екстракту, 2,88 кг кукурудзяного гідролізату, 7,2 кг кукурудзяного екстракту, 1,44 кг пептону, 0,144 кг лізину, 0,0288 кг метіоніну та 0,432 кг глютамату. Далі, використовуючи лічильник, доливають 78 л водопровідної води, потім вмикають мішалку. Стерилізація композиції проходить за температурі 112 °С упродовж 30 хв, під тиском 0,05 МПа.

*ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 0,432 кг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,317 кг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Відважені компоненти поміщають у реактор-змішувач (РЗ-15) об'ємом 100 л. Далі, використовуючи лічильник, доливають 54 л водопровідної води, потім вмикають мішалку. Приготовлену композицію перекачують за допомогою насоса (Н-16) до інокулятора (І-18). Стерилізують композицію в інокуляторі при температурі 131 °С упродовж 40 хв, під тиском 0,15 МПа.

*ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 3 м<sup>3</sup>*

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно підготувати поживне середовище об'ємом 1440 л.

*ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-22) у реактор-змішувач (РЗ-23) об'ємом 1,5 м<sup>3</sup> поміщають 100,8 кг глюкози, 2,88 кг дріжджового екстракту, 28,8 кг кукурудзяного гідролізату, 72 кг кукурудзяного екстракту, 14,4 кг пептону, 1,44 кг лізину, 0,288 кг метіоніну та 4,32 кг глютамату. Далі, використовуючи лічильник, доливають 677 л водопровідної води, потім

вмикають мішалку. Стерилізація композиції проходить у реакторі при температурі 112 °С упродовж 30 хв, під тиском 0,05 МПа.

#### *ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-25) у реактор-змішувач (РЗ-26) об'ємом 1 м<sup>3</sup> додають 4,32 кг (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,17 кг КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>. Далі, використовуючи лічильник, доливають 504 л водопровідної води, потім вмикають мішалку. Приготовану композицію перекачують за допомогою насоса (Н-27) до ферментера (Ф-29). Стерилізують композицію у ферментері при температурі 131°С упродовж 40 хв, під тиском 0,15 МПа.

### **ТП 5. Підготовка посівного матеріалу**

#### *ТП 5.1. Підтримання колекційної культури*

Штам *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 підтримують на скошеному м'ясо-пептонному агарі за температури 4°С, здійснюючи пересіви з періодичністю 1-3 місяці. Маніпуляції з культурою виконують з дотриманням умов асептики.

#### *ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах*

З використанням бактеріологічної петлі культуру із колекції висівають на чашки Петрі, що містять поживний агар, та витримують за температури 30°С впродовж 24 годин.

#### *ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках*

Ізольовані колонії, отримані від ТП 5.2, переносять в пробірки з скошеним поживним агаром за допомогою петлі, при цьому кожену пробірку засівають однією колонією. Тривалість інкубації становить 24 години.

Пробірки, засіяні культурою, поміщають в термостат при температурі 30 °С та інкубують протягом 24 годин. Чистоту культури перевіряють за допомогою мікроскопії.

#### *ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках*

Поживне середовище готують в асептичних умовах, змішуючи у колбі (3 л):

1. розчин композиції А (від ДР 4.1.1) - 1200 мл,

2. розчин композиції Б (від ДР 4.1.2) - 600 мл,
3. розчин рибофлавіну (від ДР 2.1) - 1,8 мл, який вносять самплером.

Підготовлене середовище розподіляють по 150 мл у 12 качалочних колб (750 мл).

Клітини *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 суспендують у 10 мл стерильного фізіологічного розчину. Отриману суспензію стерильною піпеткою переносять у колби з поживним середовищем, використовуючи для кожної колби вміст однієї пробірки.

Процес культивування проводять у 12 качалочних колбах за умов:

- температура - 32°C,
- частота обертання - 200 об/хв,
- тривалість - 16 годин.

#### *ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 30 л*

В інокулятор І-11, що містить 5,8 л охолодженої після стерилізації композиції Б (від 4.2.2), самопливом вносять:

1. композицію А (від ДР 4.2.1) - 8,6 л,
2. рибофлавін (від ДР 2.1) - 14,4 мл,
3. посівний матеріал (від ТП 5.4).

Культивування проводять протягом 16 годин при температурі 32°C за таких параметрів:

- початкова вентиляція - 2,0 л/хв,
- тиск у баку - менше 0,05 МПа,
- швидкість обертання - 200 об/хв.

Через барботер здійснюється подача стерильного повітря та відведення відпрацьованих газів. Всі операції з внесення компонентів проводять в суворо асептичних умовах.

#### *ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 300 л*

У інокулятор (І-18), що містить 58,4 л попередньо охолодженої стерилізованої композиції Б (від 4.3.2), здійснюється перекачування 85,4 л композиції А (від ДР 4.3.1) за допомогою насоса (Н-14). В асептичних

умовах до інокулятора додають 144 мл рибофлавіну (від ДР 2.1). У суворо асептичних умовах здійснюється внесення посівного матеріалу (від ТП 5.5) до інокулятора.

Культивування проводиться при наступних параметрах: температурний режим – 32 °С, тривалість культивування – 16 год. Забезпечується подача стерильного повітря через барботер та відведення відпрацьованих газів. На початку процесу встановлюються наступні показники: вентиляція – 2,0 л/хв, тиск у баку – менше 0,05 МПа, швидкість перемішування – 200 об/хв.

## **ТП 6. Біосинтез**

### *ТП 6.1. Виробничий біосинтез*

У ферментер (**Ф-29**), що містить 554,2 л попередньо охолодженої стерилізованої композиції Б (від 4.4.2), здійснюється перекачування 744,4 л композиції А (від ДР 4.4.1) за допомогою насоса (**Н-24**). В асептичних умовах до ферментера додають 1,44 л рибофлавіну (від ДР 2.1). У суворо асептичних умовах здійснюється внесення посівного матеріалу (від ТП 5.6) до ферментера.

Культивування проводиться при наступних параметрах: температурний режим – 32 °С, тривалість культивування – 46 год. Забезпечується подача стерильного повітря через барботер та відведення відпрацьованих газів. Для підтримання рівня розчиненого кисню в межах 30-40% поступово підвищують швидкість обертання перемішувального пристрою від 200 до 900 об/хв, а також збільшують інтенсивність вентиляції з 2,0 до 6,0 л/хв.

Починаючи з 16-ї години культивування, здійснюється періодичне (кожні 6 год) внесення підживлювального розчину глюкози (від ДР 3.1). На 10-й годині процесу до ферментера вносять 2,2 л додецилсульфат натрію. Для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси (35-36,5 г/л) і ізoleyцину (43,67 г/л) кожні 4 години відбираються проби культуральної рідини.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ІЗОЛЕЙЦИНУ

### 7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 7.1

#### Карта постадійного контролю біосинтезу ізолейцину

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
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	<b>Повітрязабірник</b> Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	H = 10 м
Кт 1.2 <i>Очистка від грубих домішок</i>	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр грубої очистки	E = 90%
Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i>	<b>Стиснене повітря</b> Тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресування	P = 0,35-0,5 МПа, t = 120- 250°C
Кт 1.4 <i>Охолодження і видалення зайвої вологи</i>	<b>Охолоджене повітря</b> Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°C, W = 60%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	<b>Нагріте повітря</b> Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	t = 40-50°C, W = 50%
Кт 1.6 <i>Очищення у головному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 95%
Кт, Км 1.7 <i>Очищення в індивідуальному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	E = 99,999%, КУО ≤ 1
Кт, Км 2.1 <i>Приготування та стерилізація запасного розчину рибофлавіну</i>	<b>Розчин рибофлавіну</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Баглай Н.А.			
Перевір.	Судейко Т.Л.			
Реценз.				
Н.Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ  
ВИРОБНИЦТВА  
ІЗОЛЕЙЦИНУ

Літ.	Арк.	Акрушів
	53	8

Кафедра БТМ

Продовження табл. 7.1

Кт, Км 3.1 <i>Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози</i>	<b>Розчин глюкози</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	<b>Композиція А</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	<b>Композиція Б</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	<b>Композиція А</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	<b>Композиція Б</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	<b>Композиція А</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	<b>Композиція Б</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

Кт, Км 4.4.1 <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	<b>Композиція А</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	<b>Композиція Б</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	<b>Колекційна культура</b> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <b>YILM1504</b> температура, мікробіологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці	t = 2 – 4 °С, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованих середовищах</i>	<b>Робоча культура</b> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <b>YILM1504</b> температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 <i>Вирощування посівного матеріалу в пробірках</i>	<b>Робоча культура</b> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <b>YILM1504</b> температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 <i>Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</i>	<b>Посівний матеріал</b> температура, час, рН, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 32 °С, τ = 16 год, w = 200 об/хв, рН = 6,8-7,0, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 7.1

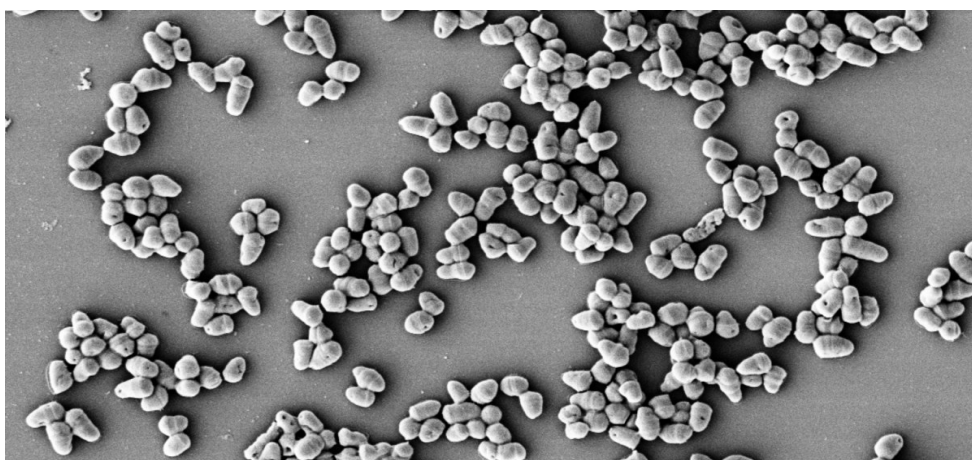
<p>Кт, Км, Кх 5.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 30 л</i></p>	<p><b>Посівний матеріал</b> температура, час, рН, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО<sub>2</sub>, ротаметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації ізолейцину і мікробіологічний контроль –кожні 4 год і після культивування</p>	<p>t = 32 °С, τ = 16 год, рН = 6,8-7,0, рО<sub>2</sub> = 20 – 30%, w = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 5.6 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 300 л</i></p>	<p><b>Посівний матеріал</b> температура, час, рН, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО<sub>2</sub>, ротаметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації ізолейцину і мікробіологічний контроль –кожні 4 год і після культивування</p>	<p>t = 32 °С, τ = 16 год, рН = 6,8-7,0, рО<sub>2</sub> = 20 – 30%, w = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 6.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 3 м<sup>3</sup></i></p>	<p><b>Культуральна рідина</b> Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація ізолейцину, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО<sub>2</sub>, ротаметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації ізолейцину і мікробіологічний контроль –кожні 4 год і після культивування</p>	<p>t = 32 °С, τ = 46 год, рН = 6,8-7,0, рО<sub>2</sub> = 20 – 30%, w = 200 - 900 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

## 7.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється за допомогою розсіву на чашки Петрі із агаром та мікроскопії. Для цього застосовують експрес-метод — мікроскопічне дослідження. Мікроскопію проводять за допомогою

світлового мікроскопа, готуючи препарат у вигляді "роздавленої краплі". Для цього на знежирене предметне скло наносять невелику краплю культурної рідини, накривають покривним скельцем, щоб уникнути повітряних бульбашок, і вивчають препарат при об'єктиві 40×. Також проводиться мікроскопія за допомогою імерсійної системи. [29].

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання видно клітини *Corynebacterium glutamicum* YILM1504, головною особливістю яких є кокобацилярна структура. Ці бактерії мають довжину до 3 мкм (рис. 7.1).



**Рис. 7.1.** Клітини *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 під мікроскопом

Колонії на агаризованому середовищі світлі та невеликі (рис. 7.2).



**Рис. 7.2.** Вигляд колоній *Corynebacterium glutamicum* YILM1504 на DSMZ середовищі

Культурну рідину розсіюють на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) за допомогою петлі, для виявлення бактерій. Мікробіологічну перевірку стерильності поживних середовищ проводять, розсіваючи пробу стерилізованого середовища на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактеріальних забруднень [29].

### **7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту**

#### **7.3.1. Визначення концентрації біомаси**

Біомасу штаму виражали як суху вагу клітин штаму на літр ферментаційного бульйону (електронні ваги серії ZA-RZ, Shanghai Zhanwei Weighing Apparatus Co., Ltd., Шанхай, Китай). Після центрифугування ферментаційного бульйону клітини двічі промивали деіонізованою водою, нагрівали до постійної ваги в термостаті при 80°C і зважували за допомогою аналітичних терезів [13].

#### **7.3.2. Визначення концентрації ізoleyцину**

Концентрацію L-ізолейцину та побічних продуктів у ферментаційному бульйоні визначали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з використанням хроматографічної колонки Agilent C18 (15 мм × 4,6 мм, 3,5 мкм), а дериватизуючим агентом був 2,4-динітрофторбензол. Рухома фаза являла собою 50% ацетонітрил, 4,1 г/л розчину ацетату натрію з температурою колонки 33°C, швидкістю потоку 1 мл/хв і довжиною хвили детектування 360 нм (Agilent1200, Agilent Technologies, Каліфорнія, США) [13].

### **7.4. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю**

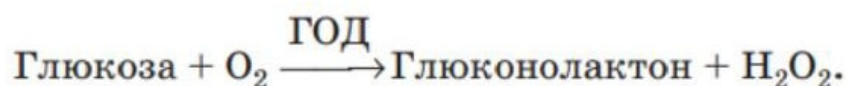
Такі джерела азоту, як пептон, кукурудзяний екстракт та дріжджовий екстракт) містять амінокислоти та пептиди, і визначення його концентрації можна провести методом визначенням концентрації амінного азоту. Метод формольного титрування (алкаліметрія за Серенсенем) для визначення амінного азоту базується на взаємодії вільних аміногруп з формальдегідом при рН 7,0 та подальшому титруванні лугом карбоксильних груп у еквівалентній кількості.

Визначення точок початку та завершення титрування здійснюється потенціометрично. До 2 мл досліджуваного розчину (поживного середовища або супернатанту культуральної рідини) у склянці на 50 мл додають дистильовану воду до загального об'єму 20 мл. рН розчину доводять до 7,0 використовуючи 0,1 М розчини NaOH або HCl. Після досягнення нейтрального значення рН, вносять 2,0 мл нейтралізованого формаліну, перемішують та проводять потенціометричне титрування 0,1 М розчином NaOH до досягнення рН 9,1.

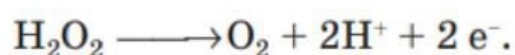
Розрахунок вмісту амінного азоту (у мг %) проводять за формулою:  $X = V \cdot K \cdot 1.4 \cdot 100 / 2$  де: V – об'єм 0,1 М розчину NaOH, витрачений на титрування (мл); K – поправочний коефіцієнт для титру 0,1 М розчину NaOH; 1.4 – маса амінного азоту (мг), що відповідає 1 мл 0,1 М розчину NaOH; 2 – об'єм проби (мл).

Глюкоза виступає основним джерелом вуглецю у середовищі, її концентрацію визначають за допомогою амперометричного біосенсора [30].

Принцип роботи амперометричних біосенсорів на основі ГОД ґрунтується на такій ензиматичній реакції:



Під час ензиматичної трансформації глюкози відбувається утворення пероксиду водню - електрохімічно активної сполуки. При окисненні пероксиду водню вивільняються електрони, які фіксуються за допомогою амперометричного детектора:



Щоб визначити концентрацію глюкози, зразки центрифугували при 10 000 xg протягом 15 хвилин, щоб отримати супернатант. Концентрацію глюкози виявляли кожні 12 годин біологічним датчиком SBA-40 C (Інститут біології Шаньдунської академії наук, Шаньдун, Китай). Біологічний аналізатор SBA-40 складається з оксидазної мембрани-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> електрода,

системи ферментної реакції та системи комп'ютерного керування. Глюкозооксидазу іммобілізували на полікарбонатній мембрані та помістили на зону чутливості  $\text{H}_2\text{O}_2$  електрода. Зразок був розведений між 0 і 1 г/л. Було проведено аналіз 25 мкл зразка, час відповіді становив 20 с, і концентрація глюкози була отримана комп'ютерною системою [31].

## РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

Розроблена технологія виробництва ізолейцину включає два основні етапи:

Підготовчий (доферментаційний) етап, що складається з:

- виготовлення та стерилізації запасного розчину рибофлавіну;
- приготування та стерилізації підживлювального розчину глюкози;
- підготовки та стерилізації поживного середовища.

Ферментаційний етап, що включає:

- одержання посівного матеріалу;
- проведення основного культивування.

#### Доферментаційні процеси

*Приготування та стерилізація запасного розчину рибофлавіну* На даному етапі утворення рідких відходів можливе тільки при невідповідності параметрів приготованого розчину рибофлавіну встановленим нормам. У такому випадку розчин направляється на утилізацію або коригування для можливого повторного використання. З огляду на це, дані відходи не включаються до загального об'єму рідких відходів виробництва.

*Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози* Як і на попередньому етапі, рідкі відходи утворюються тільки при відхиленні параметрів приготування розчину глюкози від норми.

*Підготовка та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу ізолейцину* На цьому етапі можливе утворення твердих відходів. Це відбувається при використанні сировини, що не відповідає встановленим нормам якості та

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Баглай Н.А.</i>			<b>РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</b>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Сулейко Т.Л.</i>					61	7
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

підлягає відбракуванню. Основними видами відходів є пакувальні матеріали від компонентів поживного середовища.

## **Ферментаційні процеси та підготовка посівного матеріалу**

### Підготовка посівного матеріалу

Враховуючи аеробну природу штаму-продуцента ізолейцину *Corynebacterium glutamicum* YILM1504, його культивування потребує безперервного постачання стерильного повітря. Внаслідок цього процесу генерується значна кількість відпрацьованого повітря, яке є головним джерелом газоповітряних відходів на даному етапі виробництва.

Оскільки отриманий інокулят напряду використовується у виробничому ферментері без проміжних стадій утилізації, відходи посівного матеріалу не враховуються в загальному балансі відходів.

### Виробничий біосинтез

У процесі виробничого біосинтезу ізолейцину зберігається вимога щодо постійного подавання стерильного повітря. Внаслідок цього продовжується утворення значних об'ємів відпрацьованого повітря, що становить газоповітряні відходи даного етапу.

Оскільки головною метою цього етапу є одержання культуральної рідини, збагаченої ізолейцином, рідкі відходи на даній стадії не формуються.

## **8.2. Характеристика рідких відходів виробництва ізолейцину**

### **8.2.1. Розрахунок об'ємів відходів**

Очищення та дезінфекція виробничих приміщень і обладнання під час процесу виробництва ізолейцину тривають протягом 280 днів. Щоденне прибирання підлоги виконується 280 разів, а генеральне прибирання, яке включає очищення стін, підлоги, вікон та інших поверхонь, проводиться раз на місяць, тобто приблизно 9 разів на рік.

Для дезінфекції обладнання застосовується 2% розчин каустичної соди, витрата якого на один виробничий цикл становить 6400 літрів. Для обробки стін, підлоги, вікон і дверей використовують 0,5% розчин «Естер Дез», загальна кількість якого за період виробництва складає 132,6 літра.

**Характеристика рідких відходів виробництва ізолейцину**

<b>Назва рідких відходів</b>	<b>Речовини, що входять до складу відходів</b>	<b>Приблизний об'єм відходів за 1 цикл виробництва, л</b>	<b>Клас небезпеки</b>
2% розчин каустичної соди	Каустична сода – NaOH	6400	II
0,5 % розчин «Естер Дез»	Надоцтова кислота, перекис водню, оцтова кислота, стабілізуюча добавка і вода	132,6	IV

**8.2.2. Заходи для зменшення об'ємів рідких відходів**

Оптимізація санітарної підготовки виробництва може бути досягнута завдяки використанню СІР-мійки, яка дозволяє зменшити витрати мийних і дезінфекційних розчинів, мінімізувати їх скидання в каналізацію та скоротити час простою обладнання. Крім того, ця технологія забезпечує ефективне очищення та дає змогу повторно використовувати деякі розчини, що сприяє зниженню витрат на виробництво ізолейцину.

**8.2.3. Утилізація рідких відходів**

Краплинні біофільтри є ефективною технологією аеробного очищення господарсько-побутових стічних вод. Вони працюють за рахунок мікроорганізмів, які утворюють біоплівку на завантажувальному матеріалі, що заповнює резервуар. На відміну від занурених фільтрів, де вода просочується через пори матеріалу, у краплинних фільтрах вона рівномірно стікає по його поверхні. Як завантаження використовують полімерні пластини або частинки породи різних розмірів.

Кисень у краплинних біофільтрах надходить природним шляхом, що забезпечує активний розклад органічних забруднень. Висока концентрація біомаси на поверхні завантаження сприяє ефективному очищенню стічних вод, зменшуючи вміст органічних речовин.

Окрім очищення рідких відходів, краплинні біофільтри знаходять застосування у зменшенні забруднення повітря. Краплинні повітряні біофільтри (КПБ) використовуються для видалення летких органічних сполук із газових викидів. Процес складається з двох основних етапів: поглинання забрудників біоплівкою та їх біоокиснення мікроорганізмами. Завдяки високій ефективності КПБ застосовують для очищення повітря в промислових підприємствах, хімічних виробництвах та інших екологічно чутливих сферах.

### **8.3. Характеристика твердих відходів виробництва ізолейцину**

#### **8.3.1. Розрахунок об'ємів відходів**

У процесі приготування мийних, дезінфікуючих засобів і поживних середовищ утворюються тверді відходи, зокрема пакувальні матеріали. Основна частина тари для мийних і дезінфікуючих речовин виготовлена з поліпропілену, що дозволяє здійснювати її вторинну переробку. Водночас упаковка деяких компонентів поживних середовищ містить полівінілхлорид (ПВХ), який не підлягає сумісній утилізації з іншими видами пластику. Для мінімізації відходів доцільно використовувати екологічно безпечні матеріали або впроваджувати програми утилізації специфічних видів пакування.

*Таблиця 8.2*

#### **Характеристика твердих відходів виробництва ізолейцину**

<b>Назва твердих відходів</b>	<b>Речовини, що входять до складу відходів</b>	<b>Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, кг</b>	<b>Клас небезпеки</b>
Пластикова тара для мийних та дезінфікуючих засобів	ПП	2,0	IV
Упаковка для компонентів поживного середовища	ПП, ПЕ, PVC-3	2,0	IV

### **8.3.2. Утилізація твердих відходів**

Пакувальні матеріали від мийних, дезінфікуючих засобів і компонентів поживного середовища перед утилізацією проходять сортування. Після розподілу за видами матеріалів придатну для переробки тару відправляють до спеціалізованих пунктів прийому вторинної сировини, що дозволяє зменшити обсяг відходів і сприяє раціональному використанню ресурсів.

## **8.4. Характеристика газоповітряних відходів виробництва ізолейцину**

### **8.4.1. Розрахунок об'ємів відходів**

Під час виробництва ізолейцину утворюються газоподібні відходи, такі як вуглекислий газ і аерозолі. Вони виникають на етапах підготовки посівного матеріалу та під час біосинтетичного процесу виробництва амінокислоти.

Час, відведений на підготовку посівного матеріалу, складає 16 годин, а для самого процесу біосинтезу потрібно 46 годин. Для підтримки аеробних умов під час вирощування посівного матеріалу швидкість подачі стерильного повітря становить 2 л/хв, тоді як під час виробничого біосинтезу цей показник збільшується до 6 л/хв.

Виробниче приміщення оснащено двома інокуляторами (об'ємом 14,4 л і 144 л) та одним ферментером об'ємом 1440 л. Таким чином, приблизний об'єм відпрацьованого повітря для інокулятора об'ємом 30 л становитиме:

$$14,4 \times 2,0 = 28,8 \text{ л/хв}$$

Так як час культивування становить 16 год, тоді:

$$28,8 \times (16 \times 60) = 27,6 \text{ м}^3$$

Аналогічно проводимо розрахунок для інокулятора об'ємом 300 л:

$$144 \times 2,0 \times (16 \times 60) = 276 \text{ м}^3$$

Для ферментера об'ємом 3 м<sup>3</sup> цей показник становитиме:

$$1440 \times 6,0 \times (46 \times 60) = 23846 \text{ м}^3$$

## Узагальнена характеристика газоповітряних відходів

Назва газоподібних відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, м <sup>3</sup>	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря з інокуляторів	діоксид Карбону, клітини	303,6	IV
Відпрацьоване повітря з ферментера	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	23846	IV

## 8.4.2. Утилізація газоповітряних відходів

Для виробництва ізолейцину найбільш підходящим методом утилізації газоповітряних відходів є мікробіологічне очищення. Цей метод ефективно видаляє органічні гази та аерозолі, які утворюються під час процесу біосинтезу амінокислот. Мікроорганізми, які використовуються в цьому процесі, здатні розкласти леткі органічні сполуки (ЛОС), що містяться в газах, на нешкідливі компоненти, такі як вода і вуглекислий газ.

Використання мікробіологічного очищення має кілька переваг. По-перше, цей метод є екологічно чистим, оскільки не потребує застосування хімічних реагентів, що можуть призвести до додаткових забруднень. По-друге, мікробіологічне очищення дозволяє досягти високої ефективності видалення шкідливих речовин при мінімальних витратах енергії, що робить його економічно вигідним для промислового використання.

Одним із основних способів мікробіологічного очищення є використання біофільтрів. У таких системах газоповітряна суміш проходить через шар завантаження, на якому утворюється біоплівка з мікроорганізмів. Ці мікроорганізми поглинають та метаболізують забруднювачі, перетворюючи їх на менш шкідливі сполуки. Біофільтри можуть бути ефективними для очищення від летких органічних сполук, таких як ізопропіловий спирт, ацетон та інші [32].

Цей метод ідеально підходить для виробництва ізолейцину, оскільки він не лише ефективно знижує рівень забруднення, але й відповідає вимогам сучасних стандартів екологічної безпеки.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. D'Este, M., Alvarado-Morales, M., & Angelidaki, I. (2018). Amino acids production focusing on fermentation technologies – A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.001>
2. Tuo, J., Nawab, S., Ma, X., & Huo, Y.-X. (2022). Recent advances in screening amino acid overproducers. *Engineering Microbiology*, 100066. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100066>
3. Zheng, B., Ma, X., Wang, N., Ding, T., Guo, L., Zhang, X., ... & Huo, Y. X. (2018). Utilization of rare codon-rich markers for screening amino acid overproducers. *Nature Communications*, 9(1), 3616.
4. Paloyan, A. M., Melkonyan, L. H., & Avetisova, G. Y. (2022). Microbial approaches for amino acids production. In *Microbial Syntrophy-Mediated Eco-enterprising* (pp. 177-208). Academic Press.
5. Sanchez, S., Rodríguez-Sanoja, R., Ramos, A., & Demain, A. L. (2018). Our microbes not only produce antibiotics, they also overproduce amino acids. *The Journal of antibiotics*, 71(1), 26-36.
6. Tsuge, Y., & Matsuzawa, H. (2021). Recent progress in production of amino acid-derived chemicals using *Corynebacterium glutamicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(3). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03007-4>
7. Amaya-Farfan, J., & Bertoldo Pacheco, M. T. (2003). AMINO ACIDS | Properties and Occurrence. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (c. 181–192). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00038-9>
8. Torii, K., & Iitaka, Y. (1971). The crystal structure of L-isoleucine. *Acta Crystallographica Section Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 27(11), 2237–2246. <https://doi.org/10.1107/s0567740871005612>
9. Sanchez, S., & Demain, A. L. (2014). FERMENTATION (INDUSTRIAL) | Production of Amino Acids. *Encyclopedia of Food Microbiology* (c. 778–784). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00373-6>

10. Xie, X., Xu, L., Shi, J., Xu, Q., & Chen, N. (2012). Effect of transport proteins on l-isoleucine production with the l-isoleucine-producing strain *Corynebacterium glutamicum* YILW. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(10), 1549–1556. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1155-4>.
11. Ma, W., Wang, J., Li, Y., Yin, L., & Wang, X. (2018). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-produced with l-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum* WM001. *Microbial Cell Factories*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0942-7>
12. Yin, L., Zhao, J., Chen, C., Hu, X., & Wang, X. (2014). Enhancing the carbon flux and NADPH supply to increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 19(1), 132–142. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0416-z>.
13. Xiong, H., Liu, Y., & Xu, Q. (2020). Effect of sodium dodecyl sulfate on the production of L-isoleucine by the fermentation of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioengineered*, 11(1), 1124–1136. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1831364>
14. Lee, J. A., Ahn, J. H., & Lee, S. Y. (2019). Organic acids: Succinic and malic acids: Comprehensive biotechnology.
15. Neumeyer, A., Hübschmann, T., Müller, S., & Frunzke, J. (2013). Monitoring of population dynamics of *Corynebacterium glutamicum* by multiparameter flow cytometry. *Microbial biotechnology*, 6(2), 157-167.
16. Donovan, C., Schauss, A., Krämer, R., & Bramkamp, M. (2013). Chromosome segregation impacts on cell growth and division site selection in *Corynebacterium glutamicum*. *PloS one*, 8(2), e55078.
17. *Corynebacterium glutamicum* [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=960923#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=960923#null).

18. Ding, W., Si, M., Zhang, W., Zhang, Y., Chen, C., Zhang, L., ... & Shen, X. (2015). Functional characterization of a vanillin dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum*. *Scientific reports*, 5(1), 8044.
19. Church, D. D., Hirsch, K. R., Park, S., Kim, I. Y., Gwin, J. A., Pasiakos, S. M., ... & Ferrando, A. A. (2020). Essential amino acids and protein synthesis: insights into maximizing the muscle and whole-body response to feeding. *Nutrients*, 12(12), 3717.
20. Wolfe, R. R., & Miller, S. L. (1999). Amino acid availability controls muscle protein metabolism.
21. Ferrando, A. A., Wolfe, R. R., Hirsch, K. R., Church, D. D., Kviatkovsky, S. A., Roberts, M. D., Stout, J. R., Gonzalez, D. E., Sowinski, R. J., Kreider, R. B., Kerksick, C. M., Burd, N. A., Pasiakos, S. M., Ormsbee, M. J., Arent, S. M., Arciero, P. J., Campbell, B. I., VanDusseldorp, T. A., Jager, R., ... Antonio, J. (2023). International society of sports nutrition position stand: essential amino acid supplementation on skeletal muscle and Performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 20(1). <https://doi.org/10.1080/15502783.2023.2263409>
22. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Subcommittee on Interpretation, Uses of Dietary Reference Intakes, Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Panel on the Definition of Dietary Fiber, & Panel on Macronutrients. (2005). *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids*. National Academies Press.
23. Canfield, C.-A., & Bradshaw, P. C. (2019). Amino acids in the regulation of aging and aging-related diseases. *Translational Medicine of Aging*, 3, 70–89. <https://doi.org/10.1016/j.tma.2019.09.001>
24. Звіт із фізичної культури і спорту станом на 01 січня 2024 року [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://mms.gov.ua/fizichna-kultura/statistichna-zvitnist/zviti>

25. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Kyowa Hakko). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/cgl00010>.
26. Leszczewicz, M., & Walczak, P. (2019). Selection of thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* strains for organic acid biosynthesis. *Food Technology and Biotechnology*, 57(2), 249.
27. Michel, A., Koch-Koerfges, A., Krumbach, K., Brocker, M., & Bott, M. (2015). Anaerobic Growth of *Corynebacterium glutamicum* via Mixed-Acid Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(21), 7496–7508. <https://doi.org/10.1128/aem.02413-15>
28. Garrett, P. R. (2015). Defoaming: Antifoams and mechanical methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 20(2), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2015.03.007>
29. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. — 2- е вид., доп . і перероб. — К.: НУХТ, 2010.-63 2 с
30. Різак Г.В. Курс лекцій з фармацевтичної хімії для студентів мед. ф-ту спеціальності «Фармація». Книга 1. - Ужгород: В- ФОП Сабов А.С. 2022 – 194 с.
31. Li, H., Xu, D., Zhang, D., Tan, X., Huang, D., Ma, W., Zhao, G., Li, Y., Liu, Z., Wang, Y., Hu, X., & Wang, X. (2023). Improve L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* WM001 by destructing the biosynthesis of trehalose dicorynomycolate. *Microbiological Research*, 272, 127390. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127390>
32. Процеси та апарати біологічної очистки та дезодорації газоповітряних викидів. Монографія / Л. В. Кричковська, О. В. Шестоपालов, Г. Ю. Бахарєва, К. В. Слісь. – Харків: НТУ «ХПІ», 2013. – 200 с.

## 1 Introduction

L-isoleucine is an essential amino acid for the human body and one of the three branched-chain amino acids [1]. Due to its special structure and function, it occupies a particularly important position in human life metabolism. L-isoleucine, one of the more expensive amino acid raw materials, is mainly made into compound amino acid infusion, three-branched-chain amino acid infusion, which aims to treat liver disease, liver coma, frailty, and other diseases [2,3]. The industrial production process of L-isoleucine is mainly microbial fermentation that can realize large-scale industrial production, and reduce the cost of raw materials and easy to control reaction, but at the same time, large amounts of by-products are produced (such as valine, leucine, and alanine) [4]. L-isoleucine is mainly used in the food and medicine fields, which needs the high purity of the product, and thereby excessive by-products are not conducive to subsequent extraction and purification [5].

Surfactants are a kind of substances that can significantly reduce the surface (interface) tension even at very low concentrations [6,7]. In previous reports, surfactants were used in kitasamycin fermentation and the fermentation of waste-activated sludge [8]. Sodium dodecyl sulfate (SDS) is an anionic surfactant, which stimulates microbial fermentation and enzymatic activity in bioreactors, and also destroys microbial cell membranes [9].

In this study, the surfactant was applied to the fermentation of *Corynebacterium glutamicum* for the first time. The use of surfactants to interfere or destroy the forming or the formed cell membrane to achieve the effect of enhancing the permeability of the cell membrane [9]. Enhanced cell membrane permeability relieved the inhibition of the end product produced by the excessively high intracellular product concentration, improved the secretion ability of L-isoleucine, meanwhile reduced the by-product production [10].

## 2 Materials and methods

### 2.1 Strain

The *Corynebacterium glutamicum* (The strain number is YILM1504) (Tianjin University of

Science, Tianjin, China) used was preserved by the Metabolic Engineering Laboratory of Tianjin University of Science and Technology.

### 2.2 Fermentation medium

The fermentation medium consisted of 70 g/L glucose, 10 g/L peptone, 2 g/L yeast powder, 3 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 mg/L vitamin B, 20 mL/L corn hydrolyzate, 1 g/L lysine, 3 g/L glutamic acid, 0.2 g/L methionine, 50 g/L corn steep liquor. All chemical reagents were of analytical grade and were produced by Aladdin (Shanghai Alighting Biochemical Technology Co., LTD, Shanghai, China).

The Surfactants used in this experiment are Tripion-X, SDS, Sophorolipid, Surfaction, NP-10, Tween-80, all chemical reagents were of analytical grade, and were produced by Deyan (Shandong Deyan Chemical Co. LTD, Shandong, China).

### 2.3 Experimental methods

The preservation tube by *Corynebacterium glutamicum* YILM 1504 was removed from the refrigerator at  $-80^\circ\text{C}$  (DW-45/60/86L550 vertical ultra-low temperature storage box, Jiesheng Refrigeration, Zhejiang, China), which transferred to two oblique interview tubes in sterile intermittent culture. It is then activated in a  $32^\circ\text{C}$  incubator for 24 h, and transferred 200 ml each of the activated strain to two Eggplant-shaped flasks were cultured at  $32^\circ\text{C}$  for 24 h to maintain vigorous strains.

3 L seed culture medium was placed in a 5 L fermenter (5 L automatic control fermentation tank, Shanghai Baoxing Biological Equipment Engineering Co., Ltd., Shanghai, China) and the seed cultivation time was 16 h at  $32^\circ\text{C}$ , and maintained at pH 6.7–7.0. In addition, the initial ventilation, tank pressure, and rotation speed was 2.0 l/min, less than 0.05 MPa, and 200 r/min, respectively. During this period, the rotation speed was gradually adjusted to 400 r/min according to oxygen flux in the fermenter, but other conditions remain unchanged. The  $\text{OD}_{600}$  (752 Spectrophotometer, Shanghai Analytical Instrument Factory, Shanghai, China) greater than 16 was connected to fermentation culture.

The 600 mL cultivated seed liquid was put into 3 L fermentation medium and was continuously cultured

## ДОДАТОК Б

### IV. Спортивна діяльність

А	Б	Кількість осіб, які займаються спортом, усього	У тому числі у							Із кількості осіб, які займаються спортом, – жінок	Кількість працівників фізичної культури і спорту, які проводять заняття, усього	
			ДЮСШ	ШВСМ	ЦОП	закладах спеціалізованої освіти спортивного профілю із специфічними умовами навчання	спортивних клубів	спортивних клубів закладів фахової передвищої освіти	спортивних клубів закладів вищої освіти			регіональних центрах "Лінаспорт"
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Види спорту, усього (сума рядків 2, 3, 4, 5)</b>	<b>1</b>	<b>689 477</b>	339 971	3 124	494	6 096	322 354	4 090	9 933	3 415	183 365	26 624
<b>Олімпійські види спорту</b>	<b>2</b>	484 046	290 734	3 112	494	5 312	174 611	2 950	6 826	7	116 489	18 911
у тому числі												
бадмінтон	2.1	4 190	1 807	22	0	29	2 087	4	241	0	1 402	171
баскетбол	2.2	27 662	17 479	78	14	202	8 654	422	813	0	8 230	1 124
бейсбол	2.3	1 035	762	26	0	0	247	0	0	0	140	51
бокс	2.4	24 561	15 959	227	13	229	7 790	50	293	0	2 199	1 204
боротьба вільна	2.5	16 775	12 120	209	25	347	3 934	0	137	0	2 065	815
боротьба греко-римська	2.6	10 366	7 956	148	19	167	2 004	0	72	0	77	503
брейкінг	2.7	571	0	0	0	0	561	0	10	0	86	15
важка атлетика	2.8	7 229	4 018	177	1	128	2 656	45	204	0	1 099	430
велосипедний спорт	2.9	4 269	2 968	140	13	120	993	24	11	0	1 206	299
біатлон	2.10	1 413	1 252	44	46	25	33	0	13	0	565	128
бобслей	2.11	14	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0
веслувальний слалом	2.12	536	471	16	0	0	49	0	0	0	97	31
веслування академічне	2.13	2 086	1 464	134	7	161	293	0	30	0	527	201
веслування на байдарках і каное	2.14	5 942	4 846	180	14	175	605	72	50	0	1 534	466
вітрильний спорт	2.15	1 431	885	42	0	4	500	0	0	0	326	130
водне поло	2.16	1 527	838	40	0	219	369	0	61	0	363	93
волейбол	2.17	44 438	27 429	138	5	367	14 613	686	1 200	0	20 801	1 541

synthesis [3]. Requirements for daily consumption of each EAA are conventionally met as components of routine dietary protein intake. The amount and profile of EAAs in individual dietary proteins, along with the digestibility of the protein bound EAAs, form the basis for the quantitative assessment of the quality of the pure protein [4]. Proteins that contain an abundant amount of all the EAAs in a highly digestible format are considered to be “high-quality” proteins [4].

While the importance of meeting minimal requirements for each EAA through consumption of high-quality dietary protein intake has been recognized for many decades [5], the benefits attainable from consumption of free-form EAAs in amounts above and beyond minimal requirements has only become fully appreciated in the past 25 years. Products of single free amino acids, such as leucine or lysine, and compositions of small groups of EAAs, most notably the branched chain amino acids (leucine, valine, and isoleucine; BCAAs) are available, but many studies have documented that greater benefits are attained from compositions containing all the EAAs. Daily supplementation with compositions of all the EAAs in free form has been shown to be beneficial in many ways [6]. Most prominently, supplemental free-form EAA compositions stimulate protein synthesis and protein turnover throughout the body, including the synthesis of new muscle protein. Stimulation of muscle protein synthesis (MPS) by EAAs can produce gains in muscle mass and quality, which translate to improvements in physical performance and functional outcomes [7].

This document presents the position of the International Society of Sports Nutrition (ISSN) on the effect of dietary supplementation with free-form EAAs on MPS, muscle mass and quality, and physical performance. Evaluation of the benefits of EAAs differs from many of the other nutritional supplements evaluated by the ISSN in that there are well-accepted requirements for daily EAA consumption. Also, rather than supplements containing only a single compound, such as creatine, there are almost limitless combinations of the nine EAAs that can be made depending on the physiological demand. This document will focus on supplementation of the diet in individuals meeting their daily requirements for EAAs through dietary consumption of protein. Only compositions containing the nine EAAs in free form will be considered in this document.

### **3. Mechanism of action**

## ДОДАТОК В

for 46 h at the maintenance temperature of 32°C and pH 6.7–7.0. Due to the need to keep dissolved oxygen was maintained between 30% and 40%, so the stirring shaft speed was gradually increased from 200 r/min to 900 r/min, and the ventilation was gradually increased from 2.0 L/min to 6.0 L/min. The residual sugar was measured after 16 h, and 80% (volume fraction) glucose was added to maintain the residual sugar in the tank between and 10–20 g/L.

In this experiment, three types of six surfactants were selected, and 1 g/L was added to each shake flask at the initial stage of fermentation. After 40 hours of fermentation, samples were taken to determine the strain biomass and L-isoleucine production in the fermentation broth.

### 2.4 Detection methods

#### 2.4.1 Strain biomass determination

Strain biomass was expressed as the dry weight of strain cells per liter of fermentation broth (g DCW/L) (ZA-RZ series electronic balance, Shanghai Zanwei Weighing Apparatus Co., Ltd., Shanghai, China). After the fermentation broth was centrifuged, the cells were washed twice with deionized water, heated to constant weight in a thermostat at 80°C, and weighed with an analytical balance.

#### 2.4.2 Determination of L-isoleucine and by-products

The concentration of L-isoleucine and by-products in the fermentation broth was determined by high-performance liquid chromatography using an Agilent C18 (15 mm×4.6 mm, 3.5 μm) chromatographic column, and the derivatizing agent was 2,4-dinitrofluorobenzene. Mobile phase was 50% acetonitrile, 4.1 g/L sodium acetate solution with the column temperature at 33°C, flow rate at 1 mL/min, and detection wavelength at 360 nm (Agilent1200, Agilent Technologies, California, U.S.).

#### 2.4.3 Determination of threonine dehydratase enzyme activity

Cells were harvested by centrifugation for 10 min at 8,000 r/min at 4°C and were washed the strain twice with 50 mmol/L Tris-HCl, and resuspend the strain. Then, the suspended strain cells were disrupted by ultrasonic (2 s on 3off 4°C 400 W

10 min), and centrifuged at 4°C 12,000 r/min for 30 min to remove cell debris. The supernatant was the crude enzyme solution.

A volume of 400 μL pyridoxal phosphate (2.5 mM) and 100 μL crude enzyme solution was added to a 5 mL Eppendorf tube sequentially, then 500 μL threonine (80 mM) was added to start the reaction and placed in a 22 ± 2°C water bath for 15 min. The reaction was terminated by adding 1 ml of a solution containing 1% semicarbazide and 0.9% sodium acetate, after 15 min of incubation at room temperature, the amounts of α-ketobutyrate formed at various times were determined spectrophotometrically by monitoring the semicarbazone derivative at 254 nm.

#### 2.4.4 Determination of acetohydroxy acid synthase enzyme activity

After adding 500 μL of sodium pyruvate (200 mM), 200 μL of thiamine pyrophosphate (1 mM), and 200 μL of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 100 μL of crude enzyme solution to the Eppendorf tube to start the reaction, the solution was placed in a water bath at 37°C for 15 min. A total of 100 μL of 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to stop the reaction, then placed in a 62°C water bath for 15 min, and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. A total of 0.25 mL of the supernatant, 0.5 mL of creatine (0.5%), 0.5 mL of 8-naphthol (5%), and 2.25 mL of water was placed in a 5 mL Eppendorf tube and reacted in the dark at room temperature for 60 min, and then the OD value was measured with a 530 nm spectrophotometer.

### 2.5 Establishment of a metabolic flow balance model of *C. glutamicum* producing L-isoleucine

#### 2.5.1 Metabolic flux calculation

Through the establishment of a metabolic flow balance model for isoleucine biosynthesis, quantitative analysis and network optimization analysis of the metabolic network were carried out, and the metabolic flow distribution in the middle and late stages of L-isoleucine fed-batch fermentation was calculated, providing a basis for genetic manipulation and fermentation control of L-isoleucine producing strain.

<i>ilvA-U-F</i>	ATATGGATCCGATGCCTTCGTTTTGGTAAAG	<i>BamHI</i>
<i>ilvA-U-R</i>	GACTATGGGGTATATTGGTAGTATGAGTGAAACATACGTGTCTG	
<i>lrp-U-F</i>	ACTACCAATATACCCCATAGTCAGTTTTGTGGCAGTTTTGCG	
<i>lrp-U-R</i>	ATATGAATTCCACGGTTTGAATGTGACTGG	<i>EcoRI</i>
<i>kan-D-F</i>	ATATGAATTC AATACGACTCACTATAGGGCG	<i>EcoRI</i>
<i>kan-D-R</i>	ACAAAAGAGCTCGTTGGAAATAAAAGCGCAATTAACCCCTCACTAAAG	
<i>ilvA-D-F</i>	CTTTAGTGAGGGTTAATTGGCGCTTTTATTTCACACGAGCTCTTTGT	
<i>ilvA-D-R</i>	ATATGGGCCCGAGTGGCGTGTATGGGAAG	<i>Apal</i>
<i>ilvA-YF</i>	CGATCCTGACCCGAAACTAG	
<i>ilvA-YR</i>	ACTGATGAAGAAGTCGTCG	

WM001 $\Delta$ *treSYA**BilvA::kan-lrp-P<sub>bmFE7</sub>* cells, and selected by chloramphenicol resistance. The positive transformants were further confirmed by colony PCR with the primer pair *ilvA-YF/ilvA-YR*. Then the positive transformant was cultured at 37 °C to induce the loss of pDTW109.

#### 2.4. Fermentation

*C. glutamicum* cells were activated on a solid activation plate. To prepare the seed cultures, a ring of colonies from the activation plate were suspended into seed medium (Li et al., 2022). The seed medium were cultured at 30 °C with shaking at 200 rpm for about 16 h. Then, seed culture was transferred into the fermentation medium (120 g/L glucose, 10 g/L corn steep liquor, 30 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 g/L MgSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O, 1.5 g/L FeSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O and 20 g/L CaCO<sub>3</sub>, pH 7.2) to an initial optical density at 562 nm of 1.8, and cultured at 30 °C with shaking at 200 rpm for 72 h. Shake flask cultivation was performed in 500 mL baffled-flask containing 50 mL medium.

#### 2.5. Analytics

To determine the glucose, cell growth, and amino acids, samples were withdrawn from the cultures (Li et al., 2023). First, to quantify cell growth, the samples were measured every 12 h using an UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). To determine the amino acid and glucose concentration, samples were centrifuged at 10,000 x g for 15 min to yield supernatant. The glucose concentration was detected every 12 h by an SBA-40 C biological sensor (Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Shandong, China). SBA-40 biological analyzer consists of an oxidase membrane-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electrode, an enzyme reaction system, and a computer-controll system. The glucose oxidase was immobilized on a polycarbonate membrane, and placed on the sensing area of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electrode. The sample was diluted between 0 and 1 g/L. 25  $\mu$ L of sample was assayed, the response time was 20 s, and the glucose concentration was obtained by the computer system (Feng et al.,

1994). The amino acid concentration was quantified using an Agilent 1200 high-pressure liquid chromatography (HPLC) system (Agilent Technologies, California, USA) with C18 chromatographic column at 338 nm.

### 3. Results

#### 3.1. Destruction of trehalose biosynthesis to improve L-isoleucine production in *C. glutamicum* WM001

Previously, we compared the trehalose-free mutant *C. glutamicum* $\Delta$ *SYA* and *C. glutamicum* ATCC13869, and found that the production of L-glutamate was increased in the *C. glutamicum* $\Delta$ *SYA*. To investigate whether blocking trehalose synthesis enhances L-isoleucine production, the gene *treS*, *treY*, and *otsA* was deleted in an L-isoleucine producing *C. glutamicum* WM001, resulting  $\Delta$ *treS*,  $\Delta$ *treY*,  $\Delta$ *otsA*,  $\Delta$ *treYA*, and  $\Delta$ *treSYA*. Figs. 1 and 2.

The cell growth and glucose consumption in  $\Delta$ *treS*,  $\Delta$ *treY*,  $\Delta$ *otsA*,  $\Delta$ *treYA*, and  $\Delta$ *treSYA* were similar to WM001, respectively, but the mutants produced more L-isoleucine expected for  $\Delta$ *treS* (Fig. 3). In addition, L-lysine is the major by-product in WM001 and mutants. After 72 h, WM001 cells produced 17.78 g/L L-isoleucine and 3.68 g/L L-lysine with consumption of 117.33 g/L glucose. Whereas,  $\Delta$ *treS* cells produced 17.5 g/L L-isoleucine and 3.35 g/L L-lysine with consumption of 117.33 g/L glucose;  $\Delta$ *treY* cells produced 18.75 g/L L-isoleucine and 3.63 g/L L-lysine with consumption of 117 g/L glucose;  $\Delta$ *otsA* cells produced 18.52 g/L L-isoleucine and 3.98 g/L L-lysine with consumption of 117.33 g/L glucose;  $\Delta$ *treYA* cells produced 19.18 g/L L-isoleucine and 4.12 g/L L-lysine with consumption of 115.33 g/L glucose;  $\Delta$ *treSYA* cells produced 20.45 g/L L-isoleucine and 4.45 g/L L-lysine with consumption of 116 g/L glucose. The mutant strain  $\Delta$ *treSYA* produced more L-isoleucine than  $\Delta$ *treYA*. This result indicates that delete *treS* is good for increasing L-isoleucine production. Moreover, We found that  $\Delta$ *treSYA* cells consumes similar levels of glucose and produce more