

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»  
Директор інституту(декан факультету)  
Наталія ГРЕГІРЧАК  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

«До захисту допущено»  
Завідувач кафедри  
Віктор СТАБНІКОВ  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова,  
харчова, природоохоронна»  
на тему: Біосинтез лізину *Corynebacterium glutamicum*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2

Павлієнко Дарина Петрівна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

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

Консультанти \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2022 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

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

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

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 2022 року

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

ПАВЛІЄНКО Дарина Петрівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез лізину *Corynebacterium glutamicum*»

керівник роботи СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Corynebacterium glutamicum*

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми біосинтезу. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва – 1 аркуш формату А1.

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	04.04.2022 – 08.04.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	09.04.2022 – 13.04.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	14.04.2022 – 20.04.2022	
4	Біосинтез цільового продукту	21.04.2022 – 26.04.2022	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	27.04.2022 – 03.05.2022	
6	Специфікація обладнання	04.05.2022 – 13.05.2022	
7	Опис технологічної схеми біосинтезу	14.05.2022 – 19.05.2022	
8	Контроль виробництва	20.05.2022 – 25.05.2022	
9	Оформлення пояснювальної записки	26.05.2022 – 01.06.2022	
10	Виконання графічної частини проекту	26.05.2022 – 01.06.2022	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

Дарина ПАВЛІЄНКО  
(ім'я та прізвище)

Тетяна СУЛЕЙКО  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Дана дипломна робота присвячена розробленню технологічної схеми виробничого біосинтезу лізину за допомогою *Corynebacterium glutamicum* ZL-92, для використання в якості кормової добавки для сільськогосподарських тварин.

Здатність до синтезу  $\epsilon$ -лізину виявлена у представників роду *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, та *Escherichia* [7]. Проте найкращі синтезувальні властивості були притаманні штаму *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 [9], оскільки синтезував максимальну концентрацію лізину – 201,6 г/л, при мінімальній вартості поживного середовища.

Технологія виробництва лізину містить допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних агентів, попередня підготовка бурякової патоки, приготування та стерилізація розчину вітамінів, приготування та стерилізація підживлювальних розчинів, приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу і для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup>) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту)

Дипломний проект складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (47 найменувань), апаратурної та технологічної схеми (2 листа формат А1). Загальний обсяг роботи – 58 сторінок, 1 рисунок, 14 таблиць.

**Ключові слова:** *Corynebacterium glutamicum* ZL-92, лізин, глюкоза, бурякова патока, амінокислота, *Corynebacterium*, виробничий біосинтез.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	5
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	7
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	7
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	12
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента..	14
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	14
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	15
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	15
3.2. Розрахунок річної потреби.....	17
3.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	18
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	23
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	23
4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	24
4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	25
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	30
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	33
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	46
7.1. Мікробіологічний контроль.....	46
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	47
7.2.1. Концентрація біомаси.....	47
7.2.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	47
7.2.3. Концентрація цільового продукту.....	48
ЛІТЕРАТУРА.....	53
Додатки.....	59

## ВСТУП

На сьогодні біотехнологія є одним із головних науково-практичних напрямів XXI ст., що визначають рівень світової цивілізації. Також слід зазначити, що на перше місце серед різних біотехнологій виходить мікробіологічна промисловість. Незважаючи на велику різноманітність агентів, що здійснюють біотехнологічні маніпуляції, основними об'єктами в наш час є мікроорганізми, які використовуються для біосинтезу практично важливих метаболітів. [1]

Протягом останніх років на ринку агрохімікатів посилені інтересом користуються препарати, що містять амінокислоти. Особливо ефективно застосування таких препаратів шляхом позакореневого підживлення, а також для передпосівного обробітку насіння та в краплинному зрошенні. Лізин сприяє подоланню сольового стресу у рослин та розвитку кореневої системи. [2]

Велику увагу викликає дана амінокислота і в медицині, адже вона виконує багато функцій в організмі.

Вивчення шляхів виробництва лізину є актуальним і доцільним на сьогоднішній день, адже дана амінокислота необхідна для нормального функціонування людського організму, виконує багато важливих функцій у рослинних організмах, а також має унікальні властивості, які здійснюють істотний вплив на зростання тваринництва в Україні.

**Новизною роботи**, є оптимізація виробництва лізину за допомогою високопродуктивного штаму *Corynebacterium glutamicum* ZL-92, який за відносно низької вартості поживного середовища синтезує високу концентрацію амінокислоти (201,6 г/л).

## РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

**Органолептичні показники:** Лізин - амінокислота, що входить до складу білків. Завдяки наявності  $\omega$ -аміногрупи має позитивний заряд у нейтральних розчинах. Лізин належить до незамінних амінокислот, багатоклітинними тваринами не синтезується. Відомі два основні шляхи біосинтезу лізину: через  $\alpha$ -аміноадипінову кислоту та через діамінопімелінову кислоту.

**Хімічні властивості:** брутто-формула  $C_6H_{14}N_2O_2$ , молярна маса – 146 г/моль, температура плавлення - 260 ° С, температура кипіння - 368°С. Здатний добре розчинятись у воді - 14,87 г / 100 мл (20°С), також є слабо розчинним в етанолі та не розчинним в етиловому ефірі [3].

Лізин входить до складу багатьох білків та пептидів, особливо багато їх в гістонах (білки, які виконують дві основні функції: беруть участь в упаковці ниток ДНК та регуляції таких процесів, як транскрипція та трансляція).

**Сфера застосування.** Дана амінокислота відіграє дуже важливу роль в організмі людини. Головна її роль – бути субстратом для синтезу оксиду азоту. NO – вільнорадикальна сполука, що здатна руйнувати пухлинні клітини; також NO сприяє сповільненню розвитку остеопорозу та ущільненню кісток.

Бере участь в детоксикації та виведенні аміаку з організму. Активує процеси регенерації в посттравматичному періоді, при загоєнні переломів, опіках.

Лізин збільшує секрецію інсуліну, стимулює вивільнення гістаміну, який сприяє звуженню судин; сприяє знешкодженню аміаку в печінці, перетворенню аміаку в сечовину, зв'язує токсичні йони амонію, що утворюються при катаболізмі білків [4].

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.22 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Характеристика цільового продукту	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Павлієнко Д.П.</i>						6	96
<i>Керівник</i>	<i>Силейко Т.Л.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
							7	

Добова потреба організму в даній амінокислоті у дітей складає 4 г, у дорослих - 6 г. Джерелом слугують такі продукти як гарбузове насіння, горіхи, рис (нешліфований), горох, риба, молоко, куряче філе і т.д.

Симптомами дефіциту лізину є підвищення артеріального тиску, порушення мозкової діяльності, ризик розвитку цукрового діабету, передчасне старіння організму. Якщо ж навпаки, амінокислота в організмі знаходиться в надлишку, людина буде страждати від кропивниці, тремору кінцівок, зниження артеріального тиску, це буде супроводжуватись роздратованістю, що переходить в агресію. [5]

В аптеках лізин представлений у вигляді розчину для ін'єкцій та у вигляді капсул.

Розчин для ін'єкцій застосовується при такі показаннях:

- печінкова енцефалопатія, прекома і кома, що супроводжується гіперамоніємією;
- стан гострого алкогольного отруєння середнього і важкого ступеня у тому числі енцефалопатія і кома. Постінтоксикаційні розлади, спричиненні вживанням алкоголю;
- ускладнення у III триместрі вагітності: пізній гестоз, включаючи складні його форми, фетоплацентарна недостатність, хронічні патології гепатобіліарної системи у вагітних, у тому числі стани, що супроводжуються гіперамоніємією.

Протипоказаннями є підвищена чутливість до діючої речовини або до інших компонентів препарату та пропасниця. [6]

## РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

Лізин - це  $\alpha$ -амінокислота, яка використовується в біосинтезі білків. Організм людини не може синтезувати лізин, який необхідний, тому він повинен бути отриманий з їжею. На сьогоднішній день для промислового виробництва L-лізину використовують різні види мікроорганізмів, такі як: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium lilium*, *Brevibacterium divaricatum* та *Escherichia coli* [7]. У таблиці 2.1 наведено характеристику найбільш відомих продуцентів лізину.

*Corynebacterium glutamicum* ZL-92 – мікроорганізм, який створений шляхом генної модифікації геному для підвищення концентрації лізину. Штам володіє високими показниками синтезу лізину 201,6 г/л, і має невеликий час культивування - 40 год. [8]

*Corynebacterium glutamicum* K-8 – має доволі високу концентрацію продукту порівняно з іншими представниками – 221,3 г/л, має однаковий час культивування (40 год) та росте майже на схожому поживному середовищі з *C. glutamicum* ZL-92. [9]

*Brevibacterium* sp.90 - даний продуцент має найменшу концентрацію продукту порівняно з іншими представниками – 12,6 г/л, та найбільший час культивування. [10]

Розглянувши порівняльну характеристику продуцентів лізину (табл. 2.1), можна одразу вилучити *Brevibacterium* sp.90 з подальшого порівняння оптимальних продуцентів лізину через значно меншу концентрацію цільового продукту в порівнянні з іншими біологічними агентами. Враховуючи концентрації цільового продукту у *C. glutamicum* ZL-

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.22 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Павлієнко Д.П.</i>						6	96
<i>Керівник</i>	<i>Сцлейко Т.Л.</i>					<i>Кафедра БТМ 9</i>		
<i>Н. канд</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

92 та *C. glutamicum* К-8 (201,6 г/л та 221,3 г/л, відповідно), однаковий час культивування (40 год), але через незначну різницю в складі поживного середовища не можна точно визначити найкращого біологічного агента, тому в подальшому порівнянні розглянемо вартість поживних середовищ для культивування обраних біологічних агентів.

У таблиці 2.2 наведено вартість компонентів поживного середовища для продуцентів лізину.

## Порівняльна характеристика продуцентів лізину

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу культивування	Література
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ZL-92	Глюкоза - 80; бурякова патока – 40; кукурудзяний екстракт – 30; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 45; MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 1,5; KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 1; FeSO <sub>4</sub> – 0,02; MnSO <sub>4</sub> – 0,02; нікотинамід – 8 мг; біотин – 850 мкг; тіамін-НCl – 850 мкг.	201,6	40	pH – 6,9; t = 30 °C,	Xu, J.-Z., Yu, H.-B. Metabolic engineering of glucose up take systems in <i>Corynebacterium glutamicum</i> for improving the efficiency of l-lysine production. <i>Journal of Industrial Microbiology &amp; Biotechnology</i> . 2019. doi:10.1007/s10295-019-02170-w
<i>Brevibacterium sp.90</i>	М'яса – 160 Дріжджовий екстракт- 5; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 15; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,5; MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O – 0,25; MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O – 0,01; FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O – 0,01; ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O — 0,001; CuSO <sub>4</sub> — 0,2; NiCl <sub>2</sub> — 0,02.	12,6	60	pH – 7,0; t = 30 °C; Шв. перемішув. – 600 об/хв; Дробне внесення глюкози починаючи з 60г ПС	Ауксотрофність продуцентів лізину [Електронний ресурс] // Режим доступу: АУКСОТРОФНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ ЛІЗИНУ Г. С. Андріяш Г. М. Заболотна ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України, Київ С. М. Шульга
<i>Corynebacterium glutamicum</i> K-8	Глюкоза – 80; бурякова патока – 40; кукурудзяний екстракт – 30; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 50; KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 1,5; MgSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O – 1; FeSO <sub>4</sub> – 0,02; MnSO <sub>4</sub> – 0,02; метіонін – 0,5; гліцин бетаїн – 0,05; біотин – 2,4 мг; тіамін-НCl – 400 мкг.	221,3	40	pH 6,9; t = 30 °C	Xu, J.-Z., Ruan, H.-Z. Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in <i>Corynebacterium glutamicum</i> for improving the efficiency of l-lysine production from mixed sugar. <i>Microbial Cell Factories</i> . 2020, 19(1). doi:10.1186/s12934-020-1294-7

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування  
*Corynebacterium glutamicum* ZL-92 та *Corynebacterium glutamicum* К-8**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ZL-92	Глюкоза – 80	23	1,84	1
	Бурякова патока – 40	18	0,72	2
	Кукурудзяний екстракт – 30	30	0,9	3
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 45	21	0,9	4
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 1,5	28	0,042	5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1	60	0,06	6
	FeSO <sub>4</sub> – 0,02	2,4	0,00004	7
	MnSO <sub>4</sub> – 0,02	45	0,0009	8
	нікотинамід – 8 мг	3,86 (грн/г)	0,03	9
	біотин – 850 мкг	2,4 (грн/мг)	2,04	10
	тіамін-НCl – 850 мкг	18,6 (грн/г)	0,015	11
	Вартість 1 л середовища – 6,58грн.			
<i>Corynebacterium glutamicum</i> К-8	Глюкоза – 80	23	1,84	1
	Бурякова патока – 40	18	0,72	2
	Кукурудзяний екстракт – 30	30	0,9	3
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 50	20	1	4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,5	120	0,18	6
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – 1	14,25	0,014	5
	FeSO <sub>4</sub> – 0,02	2,4	0,00004	7
	MnSO <sub>4</sub> – 0,02	45	0,0009	8
	метіонін – 0,5	3 (грн/г)	0,0015	12
	гліцин бетаїн – 0,05	9,2 (грн/г)	0,00046	13
	біотин – 2,4 мг	2,4 (грн/мг)	5,76	10
	тіамін-НCl – 400 мкг	18,6 (грн/г)	0,00744	11
Вартість 1 л середовища – 10,43грн.				

Примітка: \* - Ціни вказано станом на січень 2021 р. :

- <https://prom.ua/ua/p755976288-glyukoza-pischevaya.html?>
- <https://harkov.flagma.ua/uk/melyasa-malyas-patoka-buryakova-o3412141.html>
- <https://bigl.ua/p1310282824-ekstrakt-kukuruznyj-litrov>
- <https://harkiv-torg.com.ua/ua/p740948461-sulfat-ammoniya-ammoniumsulfate.html>
- <https://centrbio.com.ua/ua/p619214348-sulfat-magniya.html>

6. <https://prom.ua/ua/p151620028-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
7. <https://dnepropetrovsk.flagma.ua/uk/zhelezny-kuporos-o1098352.html>
8. [https://www.covalent.com.ua/shop/manganese\\_sulfate/](https://www.covalent.com.ua/shop/manganese_sulfate/)
9. <https://biovit.ua/nikotinamid/nikotinamid-niacinamide-500-mg-100-kapsul>
10. <https://belok.ua/natrol-biotin-10000-mcg-fast-dissolve-1/>
11. [https://biotus.com.ua/ua/tiamin-vitamin-v1-vitamin-b-1-now-foods-100-mg-100-tabletok.html?gclid=CjwKCAiAmrOBBhA0EiwArn3mfLx3u2xf4cVL4HtbI10ctyAC95FHXzuUm3DXZUu3-vlnIT4fxp-n\\_BoCeSYQAvD\\_BwE](https://biotus.com.ua/ua/tiamin-vitamin-v1-vitamin-b-1-now-foods-100-mg-100-tabletok.html?gclid=CjwKCAiAmrOBBhA0EiwArn3mfLx3u2xf4cVL4HtbI10ctyAC95FHXzuUm3DXZUu3-vlnIT4fxp-n_BoCeSYQAvD_BwE)
12. <https://www.add.ua/ua/metionin-0-25-50-tabletki.html>
13. <https://forhealth.com.ua/products/betain-hcl--betaine-hcl-kal-100-tabletok>

З даних, наведених в табл. 2.2, зрозуміло, що *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 має меншу ціну за 1 л поживного середовища (6,58 грн) що в приблизно в 1,6 разів менше ніж у *Corynebacterium glutamicum* К-8 (10,43 грн), проте продуктивність синтезованого лізину у *Corynebacterium glutamicum* К-8 краща в порівнянні з *C. glutamicum* ZL-92 тому отриманих даних не достатньо для остаточного вибору продуцента.

Для того, щоб повністю бути впевненими, що обраний мікроорганізм є кращим біологічним агентом, необхідно розрахувати умовну вартість 1 г цільового продукту і кількість утвореного лізину.

Порівняння вартості 1 г лізину у *Corynebacterium glutamicum* ZL-92, та *Corynebacterium glutamicum* К-8 наведено в таблиці 2.3.

**Умовна вартість 1 г цільового продукту лізину при культивуванні  
*Corynebacterium glutamicum* ZL-92 та *Corynebacterium glutamicum* K-8**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація лізину, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного лізину за годину, г/год
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ZL-92	6,58	201,6	<b>0,0326</b>	40	<b>5,04</b>
<i>Corynebacterium glutamicum</i> K-8	10,43	221,3	<b>0,0471</b>	40	<b>5,53</b>

Підсумовуючи, можна зазначити, що серед розглянутих продуцентів лізину, не зважаючи на меншу концентрацію цільового продукту оптимальним біологічним агентом буде *C. glutamicum* ZL-92 через меншу умовну вартість 1 г цільового продукту (0,0326 грн/г) що майже в 1,5 рази менше ніж у *C. glutamicum* K-8 (0,0471 грн/г), отже в якості основного продуцента лізину буде використовувати *C. glutamicum* ZL-92

### 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Біомаса – 18,9 г/л

Лізін – 201,6 г/л

#### *Визначення вмісту вуглецю*

Для визначення необхідної кількості вуглецю необхідно розрахувати яка кількість витрачається на синтез лізину та біомаси.

В біомасі кількість вуглецю ставить 50 %, отже:

$$18,9 / 2 = 9,45 \text{ г}$$

Враховуючи холосте окислення на яке витрачається половина вуглецю, розраховану вище кількість необхідно збільшити в двічі:

$$9,45 \times 2 = 18,9 \text{ г}$$

Для синтезу лізину необхідно розглянути її формули та молекулярну масу

$C(C_6H_{14}N_2O_2) - 201,6 \text{ г/л}$

$M(C_6H_{14}N_2O_2) - 146 \text{ г/моль}$

$M(C) - 72 \text{ г/моль}$

$$\frac{M(C) \times C(C_6H_{14}N_2O_2)}{M(C_6H_{14}N_2O_2)} = \frac{72 \times 201,6}{146} = 99,42 \text{ г}$$

Отже сумарно для синтезу лізину та біомаси необхідно  $(99,42 + 18,9) = 118,32 \text{ г}$  вуглецю. Розрахуємо яку кількість глюкози необхідно для даного значення:

$$\frac{M(C) \times C_6H_{12}O_6}{M(C_6H_{12}O_6)} = \frac{72 \times X}{180} = 118,32$$

$$X = \frac{180 \times 118,32}{72} = 295,8$$

В нашому випадку концентрація глюкози з підживлювальним розчином становить  $298 \text{ г/л}$ . Отже за вуглецем поживне середовище споживаються оптимально.

#### *Визначення вмісту азоту*

Для визначення необхідної кількості азоту необхідно розрахувати яка кількість витрачається на синтез лізину та біомаси.

В біомасі кількість азоту ставить  $10 \%$ , отже:

$$18,9 \times 0,1 = 1,89 \text{ г}$$

$$\frac{M(N_2) \times (NH_4)_2SO_4}{M((NH_4)_2SO_4)} = \frac{28 \times X}{132} = 1,89$$

$$X = 8,91$$

В нашому випадку концентрація амоній сульфату з підживлювальним розчином становить  $41,7 \text{ г/л}$ . Отже за азотом поживного середовища вистачає на синтез біомаси, також необхідна велика кількість азоту необхідна для синтезу лізину, враховуючи що в нашому випадку використовуються компоненти в яких наявний азот але складно визначити яка там кількість і той факт що концентрація амоній сульфату в надлишку (тобто після використання на синтез біомаси залишається велика кількість) можна зробити висновок що середовище підібрано оптимально.

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

*C. glutamicum* ZL-92 – прямі або увігнуті тонкі палички з загостреними або булавоподібними кінцями, розмірами 0,3-0,8 \* 1,5-8,0 мкм. Розташовуються поодиноці або попарно в V-подібній конфігурації, грампозитивні, нерухливі, неспороутворювальні. Всередині клітин, як правило, містять гранули метакроматину. Утворюють опуклі напівпрозорі колонії з матовою поверхнею на сироваткових і кров'яних поживних середовищах (рис. 2.1). Факультативні анаероби, хемоорганотрофи з метаболізмом бродильного типу, каталазопозитивні. Утворюють кислоту з глюкози, фруктози, манози, мальтози, сахарози, трегалози без газу. Гідролізують сечовину, желатин, здатні до відновлення нітрату [11].

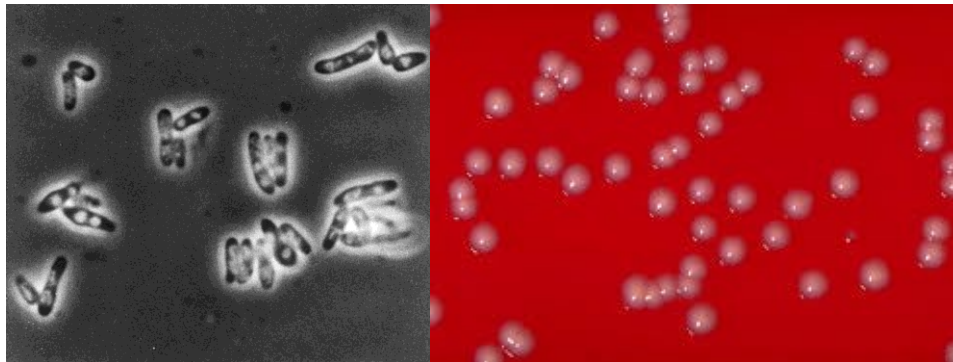


Рис. 2.1. Морфологічні (зліва) та культуральні (справа) ознаки *Corynebacterium glutamicum* ZL-92

### 2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Таксономічне положення *C. glutamicum* ZL-92 [12]:

Домен	<i>Bacteria</i>
Відділ	<i>Actinobacteria</i>
Клас	<i>Actinobacteria</i>
Порядок	<i>Mycobacteriales</i>
Родина	<i>Corynebacteriaceae</i>
Рід	<i>Corynebacterium</i>
Вид	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Штам	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ZL-92

## РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

### 3.1 Потреба у цільовому продукті

Лізин – це органічна хімічна сполука з групи білкових амінокислот, для людини це незамінна амінокислота, оскільки вона не синтезується в організмі і повинна надходити з їжею [1].

Через широкий спектр біологічних властивостей лізин відіграє важливе значення для організму людини, дана амінокислота в великих кількостях міститься в колагені, який забезпечує міцність м'язів, хрящів, зв'язок і сухожилів, побічно лізин зміцнює кістки, так як сприяє абсорбції кальцію з кишківника, при його нестачі може розвиватися остеопороз (підвищена ламкість кісток), також лізин грає важливу роль в імунній системі, оскільки необхідний у великих кількостях для продукції антитіл (імуноглобуліну) та входить до складу гормонів і ферментів, які регулюють метаболічні процеси організму.

Зважаючи на властивості лізину, він має широкий спектр застосувань, використовується для зняття синдрому занепокоєння і може без шкоди для організму позбавляти депресивного стану (L-лізин поводить як антагоніст рецептора серотоніну) [2]. Його широко використовують в бодібілдингу, додають в спортивне харчування та БАДи (дозволяє прискорити відновлення м'язів після силових тренувань), також вживання лізину пов'язують з поліпшенням засвоєння кальцію, що вкрай важливо для людей з ризиком розвитку остеопорозу, але на сьогоднішній день не існує досліджень, які змогли б підтвердити зв'язок між лікуванням остеопорозу і вживанням лізину.

Проте велику частину виробленого L-лізину використовують в кормових добавках (для свиней та домашньої птиці), щоб значно підвищити поживну цінність натурального корму (зерна) з низьким вмістом L-лізину (додавання

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.22 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Техніко-економічне обґрунтування	<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Павлієнко Д.П.</i>						6	96
<i>Керівник</i>	<i>Силейко Т.Л.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
								17

лізину дозволяє використовувати більш дешевий рослинний білок (наприклад, кукурудзу, а не сою), зберігаючи при цьому високі темпи зростання [13].

Розглянувши можливе застосування лізину і беручи до уваги статистичні дані поголів'я сільськогосподарських тварин, а саме підвищення поголів'я свиней та зменшення поголів'я корів і курей [14], перспективним напрямком є промислове виробництво лізину в якості кормової добавки для свиней.

Додавання лізину в харчовий раціон тварин відбувається в достатньо малих кількостях, різні виробники рекомендує різну кількість, але це приблизно 1-2% від кількості денного споживання корму, також спостерігається поділ за віком тварини (під час відгодування свиней необхідна більша кількість). Через це розглянемо середню добову норму споживання корму свиней в залежності від віку, яке наведено в таблиці 3.1 [15].

*Таблиця 3.1*

**Середньодобове споживання корму свинею в залежності від віку**

Вік	Денна норма корму на добу	Всього (г)
<b>Молочний період</b>		
До 14 днів	25 г	350
порося віком 30 днів	350 г	5 600
двомісячна свиня	850 г	25 500
<b>Дорощування</b>		
3 місяці	1 050 г	31 500
4 місяці	1 500 г	45 000
<b>Відгодування</b>		
5 місяців	2 250 г	67 500
6 місяців	2 550 г	76 500
7 місяців	3 200 г	96 000
8 місяців	3 350 г	100 500
За весь цикл життя приблизно – 448,45 кг (I + II етап – 107,95 кг , III етап – 340,5 кг)		

Для розрахунків будемо використовувати кількість поголів'я свиней які знаходяться в Закарпатській області станом на 1 листопада 2021 року, а саме

329,1 тис. голів [16]. Припустивши, що з даної кількості приблизно 90 % вирощуються на забій (врахуємо приблизну кількість свиноматок в кількості 10 %), будемо використовувати дані показники для наступних розрахунків.

$$329,1 \text{ тис} \times 90 \% = 296,2 \text{ тис голів}$$

### 3.2. Розрахунок річної потреби

Розрахувавши приблизну кількість свиней, які вирощуються на забій і проходять повний цикл – від народження до забою приблизно за 6-8 місяців – прийmemo, що за рік можна виростити потомство, тобто кількість корму необхідна для вирощування даної кількості свиней буде становити:

$$296,2 \text{ тис} \times 107,95 \text{ кг} = 31\,974\,790 \text{ кг (кількість корму для I + II етапу)}$$

$$296,2 \text{ тис} \times 340,5 \text{ кг} = 100\,856\,100 \text{ кг (кількість корму для свиней на відгодуванні)}$$

Згідно з середньої статистики виробників кормових добавок з вмістом лізину під час годування поросят необхідно вносити в раціон 1,5 – 2,5 % кормової добавки від загальної кількості спожитого корму, а в період відгодівлі 1,0 – 1,5%, для більш точних розрахунків будемо використовувати найменші значення цих показників

$$31\,974\,790 \text{ кг} \times 1,5 \% = 479\,621,85 \text{ кг}$$

$$100\,856\,100 \text{ кг} \times 1,0 \% = 1\,008\,561 \text{ кг}$$

Зважаючи на те, що в кормових добавках вміст лізину не всі 100 %, а приблизно 80-99 % від загального об'єму, то для даної кількості необхідно виробити наступну кількість лізину:

$$(479\,621,85 + 1\,008\,561) \times 90 \% = 1\,339\,365 \text{ кг}$$

І зважаючи, що на ринку України представлений великий асортимент кормових добавок з вмістом лізину від різних виробників, від даної кількості прийmemo 10 % від загального обсягу.

$$1\,339\,365 \text{ кг} \times 10 \% = 133\,936,5 \text{ кг (лізину необхідно виробити за рік)}$$

Розрахувавши річну потребу яка становить 133 936,5 кг прийємо кількість робочих трудоднів  $T_{рд} = 330$  днів.

Розрахуємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = 24 \times T_{рд} / T_{цф} = 24 \times 330 / 47 = 168,51, \text{ прийємо } N_{цк} = 169$$

де  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (40 год) та час підготовки ферментера до роботи (7 год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій  $K_1 = 1,3$ . Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість продукту за цикл, л/цикл:

$$V_{цк} = V_{нт} / N_{цк} = 133\,936,5 \text{ кг} / 169 = 792,52$$

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

$$V_{кр} = K_1 \times V_{цк} \times P_{гп} / P_{кр} (1 - E_{св}) = 1,1 \times 792,52 \times 99 / 20,16 \times 0,8 = 5\,351,3$$

Визначаємо робочий об'єм ферментера,  $V_{ф}$ , л:

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 5\,351,3 / 0,9 = 5\,945,9$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, л:

$$V_{пф} = V_{ф} / K_{ф} = 5\,945,9 / 0,6 = 9\,909,8$$

Вибираємо найближчий стандартизований за об'ємом ферментер,  $m^3$

$$V_{гф} = 10 \text{ м}^3$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення  $K_{уф}$ , частка:

$$K_{уф} = V_{ф} / V_{гф} = 5\,945,9 / 10\,000 = 0,59$$

### 3.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримуємо  $V_{шт} = 5\,351,3$  л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини враховуємо її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{ф}$ ), які становлять 10%.

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

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1-E_{\text{ф}}} = \frac{5\,351,3}{1-0,1} = 5\,945,9 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6$  розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{\text{ф}}$ ), що становить:

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{5\,945,9}{0,6} = 9\,909,8 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{ф}} = 10 \text{ м}^3$ , та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{ф}}} = \frac{5\,945,9}{10\,000} = 0,59$$

### Розрахунок підживлення

Кінцева кількість культуральної рідини  $V_{\text{р}} = 5\,945,9$  для зручності розрахунку візьмемо 5 946 л

Кінцева концентрація джерела вуглецю  $C_{\text{к}} = 380 \text{ г/л (кг/м}^3\text{)}$

Початкова концентрація джерела вуглецю  $C_{\text{п}} = 120 \text{ г/л (кг/м}^3\text{)}$

Концентрація розчину підживлення  $C_{\text{ж}} = 600 \text{ г/л (кг/м}^3\text{)}$

Кількість етапів підживлення  $n = 6$

1. Розрахунок початкового об'єму культуральної рідини і розчину підживлення (за правилом хреста)

600            260 – 13 частин – розчину підживлення

380

120            220 – 11 частин – початкове поживне середовище

(600-380 = 220, 380-120 = 260)

Співвідношення початкового об'єму культуральної рідини до розчину підживлення 11:13

1 частина культуральної рідини становить  $5\,946 / (11+13) = 247,75 \text{ л}$

Об'єм розчину підживлення  $V_{\text{ж.сум.}} = 13 \cdot 247,75 = 3\,220,7 \text{ л}$

Початковий об'єм культуральної рідини  $V_{\text{п.кр.}} = 11 \cdot 247,75 = 2\,725,3 \text{ л}$

2. Розрахунок об'єму розчину підживлення та маси джерела вуглецю на одноразове підживлення

$V_{\text{ж}} = V_{\text{ж.сум.}} / n = 3\,220,7/6 = 0,53678 \text{ м}^3 = 536,78 \text{ л}$

$$m_{ж} = V_{ж} \cdot C_{ж} = 0,53678 \cdot 600 = 322,07 \text{ кг}$$

3. Перевірка розрахунку за сумарною кінцевою масою джерела вуглецю

$$m_{к} = V_{р} \cdot C_{к} = 5\,946 \cdot 380 = 2\,259,48 \text{ кг}$$

$$m_{к} = V_{п.кр.} \cdot C_{п} + n \cdot V_{ж} \cdot C_{ж} =$$

$$= 2,7253 \cdot 120 + 6 \cdot 0,53678 \cdot 600 = 327,04 + 1\,932,4 = 2\,259,44 \text{ кг}$$

Провівши розрахунок підживлення ми отримали початкове значення поживного середовища (2 725,3 л), в подальшому всі розрахунки будуть відбуватись для даної кількості ПС.

Кількість посівного матеріалу для ферментера ( $E_{\phi 1}$ ) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1+E_{\phi 1}} = \frac{2\,725,3}{1+0,1} = 2\,477,5 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 2\,725,3 - 2\,477,5 = 247,8 \text{ л}$$

Для одержання 247,8 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{\phi 2}$ ), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = \frac{V_{пм1}}{1-E_{\phi}} = \frac{247,8}{1-0,1} = 275,3 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап} = 0,6$  розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{\phi}$ ), що становить:

$$V_{\phi 1} = \frac{V_{роб.2}}{K_{зап}} = \frac{275,3}{0,6} = 458,8 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\phi 1} = 0,5 \text{ м}^3$ , та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = \frac{V_{роб.2}}{V_{\phi 1}} = \frac{275,3}{500} = 0,55$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ( $E_{\phi 2}$ ) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{пс2} = \frac{V_{роб.2}}{1+E_{ф2}} = \frac{275,3}{1+0,1} = 250,3 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 275,3 - 250,3 = 25 \text{ л}$$

Для одержання 25 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{ф3}$ ), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.3} = \frac{V_{пм2}}{1-E_{ф3}} = \frac{25}{1-0,1} = 27,8 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап} = 0,6$  розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{ф}$ ), що становить:

$$V_{ф2} = \frac{V_{роб.3}}{K_{зап}} = \frac{27,8}{0,6} = 46,3 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{ф2} = 50 \text{ л}$ , та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = \frac{V_{роб.3}}{V_{ф2}} = \frac{27,8}{50} = 0,56$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ( $E_{ф3}$ ) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.3}}{1+E_{ф3}} = \frac{27,8}{1+0,1} = 25,3 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 27,8 - 25,3 = 2,5 \text{ л}$$

Для одержання 2,5 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{ф4}$ ), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.4} = \frac{V_{пм3}}{1-E_{ф4}} = \frac{2,5}{1-0,1} = 2,8 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап} = 0,6$  розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{ф}$ ), що становить:

$$V_{\phi 4} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{2,8}{0,6} = 4,7 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\phi 3} = 5 \text{ л}$ , та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\phi 4}} = \frac{2,8}{5} = 0,56$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ( $E_{\phi 4}$ ) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1+E_{\phi 3}} = \frac{2,8}{1+0,1} = 2,54 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 2,8 - 2,54 = 0,26 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора  $V_{\text{пм4}} = 0,26 \text{ л}$  можна одержати культивуванням *S. glutamicum* ZL-92 у колбах на качалці. Для цього використовуємо качалочні колби об'ємом  $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$  та коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зк}} = 0,2$ .

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становить:

$$N = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}} = \frac{260}{750 * 0,2} = 1,7$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 2 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу лізину у ферментері об'ємом  $10 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,6 відбуватиметься у чотири етапи (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

#### Узагальнені дані розрахунку техніко-економічного обґрунтування

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}$ , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$ , частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$ , л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$ , л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$ , л
1	0,750	0,2	0,15	0,26	0,026
2	5	0,56	2,8	2,54	0,26
3	50	0,56	27,8	25,3	2,5

4	500	0,55	275,3	250,3	25
5	10 000	0,59	5 946	2 478	247,8

## Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

### 4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

#### Вибір умов і способу культивування

За типом дихання *C. glutamicum* ZL-92 є факультативними анаеробами. За типом живлення - гетеротрофні організми, засвоюють вуглець з органічних сполук. Оптимальними умовами для культивування є температура 30 °С та рН – 6,9. При таких умовах наявний ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами, тому в даному випадку необхідно забезпечити відповідні умови для чистоти ведення процесу шляхом стерилізації обладнання і комунікацій, компонентів поживного середовища, аераційного повітря, та усіх компонентів і речовин, які потрапляють в середину ферментаційного обладнання. Для запобігання контамінації у ферментер подається стерильне аераційне повітря.

Таким чином, вищенаведене обумовлює культивування *C. glutamicum* ZL-92 глибинним способом. Незважаючи на всі переваги безперервного культивування, біосинтез лізину буде відбуватись у періодичному процесі, так як максимальне утворення амінокислот відбувається в стаціонарній фазі

Також враховуючи необхідну високу концентрацію джерела вуглецю та джерела азоту необхідну для синтезу біомаси та лізину, необхідно передбачити приготування та стерилізацію підживлювальних розчинів.

#### Вибір типу ферментера

Ферментер – герметичний вертикальний циліндричний апарат зі сферичними кришкою і днищем.

1. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою та датчиком температури.
2. Для забезпечення інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.22 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>		<i>Павлієнко Д.П.</i>			Обґрунтування вибору технологічної схеми	<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Силейко Т.Л.</i>					6	96
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						
					26			

пристрій з частотою обертання 250 об/хв.

3. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН [17].

Ферментер такого типу можна замовити в компанії Biotron (Південна Корея).

Компанія випускає серію ферментерів Bio P об'ємом від 2 до 30 м<sup>3</sup>. Конструкції прості в обслуговуванні. У ферментерах даного виробника передбачена автоматична система мийки та стерилізації; вбудовані блоки управління, що здійснюють контроль температури, показників рН, швидкості обертання мішалки.

Отже, обираємо ферментер Bio P на 10 м<sup>3</sup>, оснащений всіма деталями, вказаними вище [18].

#### **4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря**

*C. glutamicum* ZL-92 є факультативним анаеробом, тому необхідно передбачити стадію підготовки аераційного повітря. Підготовка аераційного повітря буде здійснюватися в окремих будівлях (компресорних відділеннях), оскільки витрати повітря будуть великі.

Стадії підготовки аераційного повітря такі:

- Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці Н ~ 16 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 2, висота поверхів – 12 м, разом з косим дахом будівлі (+2 м) – 14, відбір повітря повинен відбуватися на 2-3 метри вище найвищої точки), де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;
- очищення повітря від пилу ( $\delta > 50$  мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- стиснення повітря в компресорах або турбоповітродувках (при цьому повітря нагрівається до температури 120 – 200°C);
- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси» для конденсації вологи;

- видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері, який також зменшує пульсації руху повітря, які можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;
- стабілізація тиску та температури підігріванням до 45–50 °С парою у відповідних теплообмінниках;
- очищення в головних ємнісних набивних фільтрах, установлених поблизу ферментаційних відділень, до ступеня очищення  $E=95\%$ ;
- очищення в індивідуальних фільтрах ( $E=99,99\%$ ), установлених на ферментері, повітря до яких подається безпосередньо від головних фільтрів через трубопроводи (колектори).

Повітря в боксах і лабораторіях, де працюють з посівною культурою, стерилізують за допомогою УФ-ламп.

#### **4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

Максимальний синтез лізину (201,6 г/л) досягається за умов росту мікроорганізму *C. glutamicum* ZL-92 на поживному середовищі з наступним складом (г/л):

Глюкоза – 80

Бурякова патока – 40

Кукурудзяний екстракт – 30

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 45

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,5

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1

$\text{FeSO}_4$  – 0,02

$\text{MnSO}_4$  – 0,02

нікотинамід – 8 мг

біотин – 850 мкг

тіамін-НСІ – 850 мкг

Відповідно до розрахунків, які наведені в розділі 3, виробничий біосинтез відбувається в ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup>. Інокулят отримують у

чотири етапи: у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 5 л, 50 л та 500 л.

В поживному середовищі наявні компоненти кількісний склад яких дуже малий тому для легшого приготування компонентів буде відбуватись окремо на весь виробничий процес (до окремої композиції винесемо нікотинамід, біотин та тіамін-НСІ).

*Таблиця 4.1*

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

Компонент середовища, мг/л	Стадії підготовки поживного середовища, л					Всього:
	0,26 л	2,54 л	25,3 л	250,3 л	2 478 л	
нікотинамід – 8 мг	2,08	20,32	202,4	2 002,4	19 824	22 051,2 мг
біотин – 0,85 мг	0,221	2,159	21,505	212,755	2 106,3	2 342,94 мг
тіамін-НСІ – 0,85 мг	0,221	2,159	21,505	212,755	2 106,3	2 342,94 мг

Також на виробничий біосинтез передбачено приготування двох підживлювальних розчинів, в перший входять компоненти на внесення додаткового джерела вуглецю (глюкоза та бурякова патока), а в другий входять компоненти для внесення додаткового джерела азоту ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Також в поживному середовищі наявна бурякова патока для якої необхідно передбачити попередню підготовку, за допомогою освітлення та центрифугування, після попередньої підготовки патока направляється на приготування поживного середовища і стерилізація буде відбуватись з термолабільними компонентами.

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

В якості поживного середовища для вирощування початкового посівного матеріалу використовують середовище яке зазначено раніше. Стерилізація буде відбуватись в автоклаві, через невеликий об'єм поживного середовища. Поділ компонентів поживного середовища на композиції буде відбуватись в залежності від режимів стерилізації компонентів і буде виглядати наступним чином:

*Композиція А:* глюкоза, бурякова патока та кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

*Композиція Б:*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

*Композиція В:*  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Розчин глюкози, бурякової патоки та кукурудзяного екстракту (композиція А) є термолабільним і потребує м'якого режиму стерилізації. Солі композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

#### **4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах**

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л*

Для даної стадії необхідно приготувати 2,54 л поживного середовища, ділимо його на наступні композиції, в залежності від режиму стерилізації окремих його складових:

*Композиція А:* глюкоза, бурякова патока та кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

*Композиція Б:*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

*Композиція В:*  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв).

Розчин глюкози, бурякової патоки та кукурудзяного екстракту (композицію А) готують і стерилізують в автоклаві за наступних режимів: 112°С, 0,05 МПа упродовж 30 хв. Солі композиції В стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 50 л*

Для цієї стадії необхідно 25,3 л поживного середовища, поділ композицій відбувається, як і для попередньої стадії тільки дві композиції солей об'єднують в одну. Композицію А готують і стерилізують в окремому

реакторі-змішувачі. Композицію Б готують в окремому реакторі, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації), процес стерилізації відбувається при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

По закінченню стерилізації композицій в інокулятор подають композицію А і доводять рН до 6,9 за допомогою внесення 6%-ого розчину натрій гідроксиду.

#### *Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 500 л*

Для цієї стадії необхідно 250,3 л поживного середовища, поділ композицій відбувається, як і для попередньої стадії. Композицію А готують і стерилізують в окремому реакторі-змішувачі. Композицію Б готують в окремому реакторі, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності контамінації), процес стерилізації відбувається при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

По закінченню стерилізації композицій в інокулятор подають композицію А і доводять рН до 6,9 за допомогою внесення 6%-ого розчину натрій гідроксиду.

#### **4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу**

Для виробничого біосинтезу необхідно 2 478 л поживного середовища, поділ композицій відбувається, як і для попередньої стадії. Композицію А готують і стерилізують в окремому реакторі-змішувачі. Композицію Б готують в окремому реакторі, а стерилізують в ферментері (для зменшення ймовірності контамінації), процес стерилізації відбувається при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

Виробничий біосинтез відбувається з внесенням підживлювальних розчинів джерела вуглецю та азоту, тому слід передбачити приготування та стерилізацію даних розчинів.

Після приготування та стерилізації компонентів поживного середовища вони подаються в ферментер до простерилізованого розчину солей та доводять рН до 6,9 за допомогою внесення 6%-ого розчину натрій гідроксиду.

#### 4.3.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Розглянувши компоненти поживного середовища можна зазначити, що серед компонентів відсутні речовини, які виступають піноутворюючими компонентами, то внесення і попереднє приготування піногасника непотрібне.

Враховуючи поділ компонентів поживного середовища і об'єднання солей в одну композицію необхідно передбачити приготування титрувальних агентів: 6% розчину NaOH та 6% розчину HCl.

Для приготування поживного середовища необхідно простерилізувати композиції, з яких буде складатися ПС. Для запобігання випадіння осадів фосфорних солей магнію, феруму та мангану, під час нагрівання розчину солей в апараті, необхідно перед стерилізацією внести 6 %-ий розчин хлоридної кислоти, і, враховуючи, що оптимальне рН для *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 знаходиться на рівні 6,9, необхідно перед внесенням посівного матеріалу підлужити поживне середовище за допомогою 6 %-го розчину NaOH.

Таблиця 4.2

#### Розрахунок вмісту та особливості приготування розчинів та стабілізації рН середовища

Об'єм середовища, л	NaOH (6%)		HCl (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,26	-	-	-	-
2,54	-	-	-	-
25,3	50,6	у реакторі змішувачі об'ємом 10 л	50,6	у реакторі змішувачі об'ємом 10 л
250,3	500,6		1,09 л	
2 478	4,955 л		4,955 л	

## Розділ 5. Специфікація обладнання

Таблиця 5.1

### Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу лізину.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр панельний ФВП-99-48-G4, фільтрувальний матеріал – хімоволокно (поліестер), зафіксований на сітці, знаходиться в рамці з товщиною 48 мм; продуктивність – 7600 м <sup>3</sup> /год; Е = 90 % [19]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий Comrag F-3710; продуктивність 5,5 м <sup>3</sup> /хв, робочий тиск – 10 бар, габарити: 1400*1000*1500 мм; потужність приводу – 37 кВт [20]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач RDX 65, продуктивність 6,5 м <sup>3</sup> /хв, робочий тиск 14 бар, потужність приводу – 1,1 кВт [21]
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 6000/8, об'єм – 6 м <sup>3</sup> , сталь, робочий тиск – 0,8 МПа [22]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник AVS 160, габарити: 265x290x304 мм; продуктивність 430 м <sup>3</sup> /год, оцинкована сталь, потужність 7,46 кВт [23]
Ф-7	Фільтр головний	1	Фільтр комірковий ФВК-3-592-592-(300/600)-6-(F9); фільтрувальний матеріал – Meltblown, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; продуктивність – 3400 м <sup>3</sup> /год; Е = 95 % [24]
Р-8	Реактор-змішувач	1	Об'єм апарату – 2 м <sup>3</sup> ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання турбінної мішалки – 200-400 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» [25]
Н-9 Н-37 Н-40	Насос відцентровий	3	Відцентровий насос ВРС 32/12-220; Продуктивність до 7000 л/год [26]
Ц-10	Центрифуга	1	Центрифуга TDZ1000. Ємність 155 літрів, макс. швидкість 1000 об/хв [27]
ФІ-11 ФІ-18 ФІ-24 ФІ-38	Фільтр індивідуальний	4	Фільтр МКР-305x305x78-Н14, фільтрувальний матеріал – поліестер, зшитий у вигляді комірок, в оцинкованій рамці; площа фільтрування – 2,6 м <sup>2</sup> , продуктивність – 130 м <sup>3</sup> /год; Е = 99,995 % [28]

<i>НУХТ БТЕК 04.01.22 КР ПЗ</i>				
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата
Розробник		Павлієнко Д.П.		
Керівник		Сцлейко Т.Л.		
Н. конто				
Консульт				
Зав. каф.		Стадніков В.П.		
Специфікація обладнання			Літера	Аркцш
				6
			Кафедра БТМ	
			33	

Продовження табл. 5.1

ПА-12	Інокулятор	1	Об'єм апарату – 5 л; матеріал – бромсилікатне скло та нержавіюча сталь 316L; висота – 410 мм, діаметр – 160 мм; перемішування забезпечується механічною мішалкою; обладнаний датчиками температури, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [29]
Н-13	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос МР-3035.6 Максимальний тиск – до 1.4 бар, продуктивність 16 л/год [30]
Р-14 Р-15 Р-16	Реактор-змішувач	3	Реактор сталевий емальований об'ємом 10 л, виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); довжина – 420 мм; висота - 500 мм; ширина – 350 мм; оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв; потужність двигуна 0,75 кВт [18]
Р-17	Реактор-змішувач для розчинення розчину солей	1	Реактор з нержавіюча сталь 316L об'ємом 5 л; виробник – Тирит; діаметр 450 мм, висота 1430 мм; оснащений сорочкою та якірною мішалкою [31]
ПА-19	Інокулятор	1	Об'єм апарату – 50 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; модель - ХС-50L; висота – 1700 мм, діаметр - 460; витримує тиск до – 0,1 МПа; перемішування забезпечується турбінною мішалкою, швидкість перемішування 50-600 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [32]
ДЗ-20 ДЗ-22	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор ваговий автоматичний. Мінімальна межа дозування – 0,2 кг, максимальна – 50 кг. Розміри: 870*870*2100 мм; дискретність відліку 0.005 г. [33]
Р-21	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання якірної мішалки – 50 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 930 мм, висота – 2800 мм; вироблений на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) [18]
Р-23	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Реактор сталевий емальований об'ємом 25 л, виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); довжина – 520 мм; висота - 650 мм; ширина – 450 мм; оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв; потужність двигуна 0,75 кВт [34]

Закінчення табл. 5.1

ПА-25	Інокулятор	1	Об'єм апарату – 500 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виробник - SYSBIOTECH; висота – 3260 мм, діаметр - 1438; витримує тиск до – 0,3 МПа; перемішування забезпечується механічною мішалкою, швидкість перемішування 10-600 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [35]
ДЗ-26 ДЗ-29 ДЗ-32	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий автоматичний АД-200-БЖ. Мінімальна межа дозування – 60 кг, максимальна – 200 кг. Розміри: 1260*1100*2000 мм; дискретність відліку 0.1 кг. [36]
Р-27	Реактор-змішувач для приготування підживлювального розчину	1	Об'єм апарату – 5,0 м <sup>3</sup> ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання турбінної мішалки – 320 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 2220 мм, висота – 4555 мм; виробник – ООО «Дзержинськиммаш-Комплект» [37]
Н-28 Н-31 Н-34	Насос перистальтичний	3	Перистальтичний насос MS1. Максимальний тиск – до 15 бар, продуктивність 7500 л/год (4,0 м <sup>3</sup> за 32 хв) [38]
Р-30	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації підживлювального розчину	1	Об'єм апарату – 400 л; матеріал – нержавіюча сталь; частота обертання якірної мішалки – 50 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 1380 мм, висота – 2550 мм; вироблений на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) [34]
Р-33	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Об'єм апарату – 630 л; матеріал – нержавіюча сталь; частота обертання якірної мішалки – 50 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 1380 мм, висота – 2790 мм; вироблений на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) [34]
ДЗ-35	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий автоматичний ДВМ-50. Мінімальна межа дозування – 5 кг, максимальна – 100 кг. Розміри: 1800x940x1950 мм. [39]
Р-36	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Об'єм апарату – 250 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; частота обертання якірної мішалки – 50 об/хв.; витримує тиск – 0,6 МПа; діаметр – 700 мм, висота – 2578 мм; виробник – ТД Красный Октябрь [40]
Ф-39	Ферментер	1	Об'єм апарату – 10 м <sup>3</sup> ; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна); висота – 7297 мм, діаметр - 2750; витримує тиск до – 0,6 МПа; перемішування забезпечується механічною мішалкою, швидкість перемішування 200-400 об/хв; обладнаний датчиками, тиску, рН, кисню, піни, стерильний відбір проб забезпечується спеціальним пробовідбірним клапаном [34]

## Розділ 6. Опис технологічної схеми

Технологічна схема синтезу лізину штамом *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 включає в себе допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація титрувальних агентів, попередня підготовка бурякової патоки, приготування та стерилізація розчину вітамінів, приготування та стерилізація підживлювальних розчинів та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну та апаратурну схему біосинтезу амінокислоти наведено у графічній частині проекту.

### **ДР 1. Підготовка аераційного повітря**

#### *ДР 1.1. Забір атмосферного повітря*

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником (ПЗ-1) у найвищій точці  $H = 16$  м.

#### *ДР 1.2. Очистка від грубих домішок*

Попередню очистку повітря здійснюють на тканинному фільтрі грубого очищення (Ф-2). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю  $E = 90\%$ , затримуються частинки  $\delta > 50$  мкм.

#### *ДР 1.3. Компресювання повітря*

Для забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря стискають у компресорі (К-3), відбувається нагрівання до  $120-200$  °С, тиск становить  $1,0$  МПа.

#### *ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи*

Стиснене повітря (від ДР 1.3) необхідно охолодити в теплообміннику-осушувачі (Т-4) до температури  $25-30$  °С для видалення надлишкової вологи. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Рс-5), де

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.22 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Опис технологічної схеми	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Павлієнко Д.П.</i>						6	96
<i>Керівник</i>	<i>Силейко Т.Л.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							
						<i>Кафедра БТМ</i>		
						36		

усуваються пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

#### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

Повітря (від ДР 1.4) нагрівають до температури 45-50 °С у теплообміннику-нагрівачі (Т-6). Вологість повітря має становити 50%.

#### *ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі*

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить на головний фільтр (Ф-7), установлений біля ферментаційних відділень. Ступінь очищення повітря має становити 95%.

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

Повітря (від ДР 1.6) подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ФІ-11, ФІ-18, ФІ-24, ФІ-38) кожного біореактора (ТП 7.5, ТП 7.6, ТП 7.7, ТП 8.1). Ступінь кінцевої очистки повітря становить  $E = 99,995\%$  та КУО = 0.

### ***ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів***

*ДР 2.1. Приготування 6-% розчину хлоридної кислоти на весь технологічний процес*

Для того, щоб приготувати 5,506 л 6%-ї хлоридної кислоти, в реактор-змішувач (Р-14) об'ємом 10 л вносять 4,588 л питної води і додають при постійному перемішуванні 918 мл 36%-ї НСІ, відміряної мірним циліндром.

*ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6-% розчину їдкого натрію на весь технологічний процес*

Для приготування 5,506 л розчину 6%-го розчину натрій гідроксиду на терезах зважують 330 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в реактор-змішувач (Р-15) об'ємом 10 л і додають 5,506 л питної води, перемішують до повного розчинення та стерилізують безпосередньо в реакторі при 131°C (0,15 МПа) впродовж 50 хв.

### ***ДР 3. Попередня підготовка бурякової патоки***

*ДР 3.1. Освітлення патоки*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора у реактор (Р-8) об'ємом 2 м<sup>3</sup> подають 468,3 кг бурякової патоки та додають 936,6 л питної води. Для кращого розчинення патоки у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв. Після розчинення патоки рівень рН доводять до 4,0 за допомогою внесення сульфатної кислоти. Отриманий розчин подають за допомогою насоса (Н-9) на наступну стадію.

### *ДР 3.2. Центрифугування патоки*

Після освітлення патоки потрібно відділити осад сульфату кальцію, відділити осад можна за допомогою центрифуги. Отриманий розчин (від ДР 3.1) подають на центрифугу (Ц-10) де його центрифугують за 1000 об/хв упродовж 10 хв.

### *ДР 4. Приготування та стерилізація розчину вітамінів*

#### *ДР 4.1. Приготування та стерилізація розчину вітамінів*

На вагах зважують 22 051,2 мг нікотинаміду, 2 342,94 мг біотину та 2 342,94 мг тіаміну гідрохлориду. Наважки поміщують в колбу об'ємом 1 л, та додають 500 мл питної води та перемішують, після розчинення компонентів розчин переливають в колбу об'ємом 5 л та вносять 2,25 л питної води. Отриманий розчин стерилізують за допомогою ультрафільтраційної установки (діаметр пор фільтраційної мембрани – 0,22 мкм, робочий тиск – 0,5 МПа). Простерилізований розчин подають на стадії вирощування посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

### *ДР 5. Приготування та стерилізація підживлювальних розчинів на виробничий біосинтез*

#### *ДР 5.1. Приготування та стерилізація підживлювального розчину джерел вуглецю*

В якості компонентів підживлювального розчину слугує глюкоза та бурякова патока. За допомогою об'ємно ваговий дозатор (ДЗ-26), у реактор об'ємом 5 м<sup>3</sup> (Р-27), подають 1 546 кг глюкози, 358 кг бурякової патоки та додають 3 000 л питної води. Для кращого розчинення компонентів у сорочку

збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 320 об/хв.

Потім приготовлений розчин стерилізують у цьому ж реакторі при 112°С упродовж 30 хв.

*ДР 5.2. Приготування та стерилізація підживлювального розчину джерела азоту*

Через об'ємно ваговий дозатор (ДЗ-29) у реактор-змішувач об'ємом 400 л (Р-30) подають 136 кг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  і 221 л питної води, реактор-змішувач обладнаний сорочкою. Для кращого розчинення солі у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин солі до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв.

Потім приготовлений розчин стерилізують у цьому ж реакторі при 131°С упродовж 40 хв.

### ***ДР 6. Приготування та стерилізація поживних середовищ***

*ДР 6.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках*

Для вирощування інокуляту потрібно 0,26 л поживного середовища (ПС). Вміст компонентів для приготування ПС об'ємом 0,26 л наведено у таблиці 6.1.

*Таблиця 6.1*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,26 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 0,26 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції V, мл
Глюкоза	80	20,8	А	52
Бурякова патока	40	10,4		
Кукурудзяний екстракт	30	7,8		
Вода		52 мл	Б	50
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	0,26		
Вода		50 мл	В	157,7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45	11,7		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	0,39		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	0,0052		

MnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,02	0,0052		
Вода		157,74 мл		
Розчин вітамінів		0,26 мл	Г	0,26
<b>Усього</b>				<b>260</b>

*ДР 6.1.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 20,8 г глюкози, 10,4 г бурякової патоки та 7,8 г кукурудзяного екстракту, наважки поміщають у колбу об'ємом 100 мл, та додають 52 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевым корком. Приготований розчин стерилізують в автоклаві при t - 112°C 30 хв.

*ДР 6.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 0,26 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл питної води та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, упродовж 40 хв.

*ДР 6.1.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 11,7 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,39 г MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0,0052 г FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0,0052 г MnSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O, наважки поміщають у колбу об'ємом 0,5 л, додають 157,7 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, упродовж 40 хв.

*ДР 6.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 л*

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 5 л (ПА-12), потрібно приготувати 2,54 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено у таблиці. 6.2.

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,54 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 2,54 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	80	203,2	А	0,51
Бурякова патока	40	101,6		
Кукурудзяний екстракт	30	76,2		
Вода		510 мл		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	2,54	Б	0,5
Вода		500 мл		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45	114,3	В	1,528
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	3,81		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	0,0508		
$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	0,0508		
Вода		1 525 мл		
Розчин вітамінів		2,54 мл	Г	2,54 мл
<b>Усього</b>				<b>2,54</b>

*ДР 6.2.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 203,2 г глюкози, 101,6 г бурякової патоки та 76,2 г кукурудзяного екстракту, наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л та додають 0,51 л питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевим корком. Приготований розчин стерилізують в автоклаві при  $t = 112^\circ\text{C}$  30 хв.

*ДР 6.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,54 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 0,5 л питної води та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при температурі  $131^\circ\text{C}$ , упродовж 40 хв.

*ДР 6.2.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 114,3 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3,81 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0508 г  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0508 г  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , наважки поміщають у колбу об'ємом 2,5 л, додають 1,525 л питної води, перемішують. Закривають колбу

ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, упродовж 40 хв.

*ДР 6.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 50 л*

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 25,3 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в таблиці 6.3.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 23 л.

*Таблиця 4.3*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 25,3 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 25,3 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	80	2 024	А	5,1
Бурякова патока	40	1 012		
Кукурудзяний екстракт	30	759		
Вода		5,1 л		
Конденсат		0,51		0,51
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1	25,3	Б	17,9
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	45	1 138,5		
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	1,5	37,95		
FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,02	0,51		
MnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,02	0,51		
Вода		17,9		
Конденсат		1,78		1,78
Розчин вітамінів		25,3 мл	В	25,3 мл
<b>Усього</b>				<b>25,3</b>

*ДР 6.3.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 2 024 г глюкози, 1 012 г бурякової патоки та 759 г кукурудзяного екстракту і переносять у реактор-змішувач об'ємом 10 л (Р-16), доливають 5,1 л питної води, перемішують. Для кращого

розчинення компонентів у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв. Стерилізацію проводять у цьому ж реакторі при 112°С упродовж 30 хв.

*ДР 6.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 25,3 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 138,5 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 37,95 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,51 г  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,51 г  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  і поміщають в реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-17) додають 3,9 л питної води та перемішують, після розчинення компонентів розчин подають самоплином в посівний апарат об'ємом 50 л (ПА-19), додають 14 л питної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо в інокуляторі при 131°С (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

*ДР 6.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 500 л*

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 250,3 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в таблиці 6.4.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 227,3 л.

*Таблиця 6.4*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 250,3 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 250,3 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	80	20 024	А	51
Бурякова патока	40	10 012		
Кукурудзяний екстракт	30	7 509		
Вода		51 л		
Конденсат		5,1		5,1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1	250,3	Б	176,3

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45	11 265		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	375,5		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	5		
$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	5		
Вода		176,3		
Конденсат		17,6		17,6
Розчин вітамінів	0,001	250,3 мл	В	250,3 мл
<b>Усього</b>				<b>250,3</b>

*ДР 6.4.1. Приготування та стерилізація композиції А*

Через об'ємно – ваговий дозатор (ДЗ-20) зважують 20 024 г глюкози, 10 012 г бурякової патоки та 7 509 г кукурудзяного екстракту і переносять у реактор-змішувач об'ємом 100 л (Р-21), доливають 51 л питної води, перемішують. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв. Стерилізацію проводять безпосередньо в цьому ж реакторі при 112°С упродовж 30 хв.

*ДР 6.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-22) зважують 250,3 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 11 265 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 375,5 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 г  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 г  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ . Наважку поміщають в реактор-змішувач об'ємом 25 л (Р-23) додають 16,3 л питної води та перемішують для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей, після розчинення компонентів розчин подають самоплином в інокулятор об'ємом 500 л (ПА-25), додають 160 л питної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо в інокуляторі при 131°С (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

*ДР 6.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup>*

Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup> (Ф-39), потрібно приготувати 2 478 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено у таблиці 6.5.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 2 255 л.

Таблиця 6.5

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2 478 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 2 478 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	80	198 240	А	500
Бурякова патока	40	99 120		
Кукурудзяний екстракт	30	74 340		
Вода		500 л		
Конденсат		50		50
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	2 478	Б	1750
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	45	111 510		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	3 717		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	50		
$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	50		
Вода		1750		
Конденсат		175		175
Розчин вітамінів	0,001	2,48 л	В	2,48 мл
<b>Усього</b>				<b>2 478</b>

*ДР 6.5.1. Приготування та стерилізація композиції А*

Через об'ємно – ваговий дозатор (ДЗ-32) зважують 198 240 г глюкози, 99 120 г бурякової патоки та 74 340 г кукурудзяного екстракту і переносять у реактор-змішувач об'ємом 630 л (Р-33), доливають 500 л питної води, перемішують. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв. Стерилізацію проводять безпосередньо в цьому ж реакторі при 112°С упродовж 30 хв.

*ДР 6.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б*

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-35) зважують 2 478 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 111 510 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 717 г  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 г  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 г

MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O. Наважку поміщують в реактор-змішувач об'ємом 250 л (Р-36) додають 200 л питної води та перемішують для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей, після розчинення компонентів розчин подають самоплином в ферментер об'ємом 10 м<sup>3</sup> (Ф-39), додають 1550 л питної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо в ферментері при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

### ***ТП 7. Підготовка посівного матеріалу***

#### ***ТП 7.1. Підтримання колекційної культури***

Культуру *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 зберігають в холодильнику при температурі + 4 °С на скошеному агарі. Культуру необхідно пересівати через кожні 2 місяці, щоб уникнути пересихання поживного середовища.

#### ***ТП 7.2. Одержання робочої культури***

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з МПА для одержання ізольованих колоній. Культивують в термостаті при t = 30±1 °С (20 год).

#### ***ТП 7.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах***

Отримані ізольовані колонії (від ТП 7.2) пересівають петлею в пробірки зі МПА. Культивують в термостаті при температурі 30 °С упродовж 20 год.

#### ***ТП 7.4. Вирощування культури в колбах на качалках***

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу з композицією В (від ДР 6.1.3) вносять стерильну композицію А (від ДР 6.1.1), композицію Б (від ДР 6.1.2) та розчин вітамінів (від ДР 4.1). Середовище перемішують і розливають по 130 мл в дві качалочні колби на 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2.

У пробірку з робочою культурою, вирощеною на МПА, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем.

Для засіву однієї колби використовують суспензію клітин, одержану з однієї пробірки. Мікроорганізми вирощують у колбах на качалках (250 об/хв) упродовж 20 год при температурі  $30 \pm 1$  °С. Після завершення вирощування здійснюють мікробіологічний контроль в кожній з колб.

*ТП 7.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л*

В інокулятор об'ємом 5 л з колб вносять стерильну композицію А (від ДР 6.2.1), композицію Б (від ДР 6.2.2), композицію В (від ДР 6.2.3) та розчин вітамінів (від ДР 4.1). Вмикають перемішувач (250 об/хв) та подають стерильне повітря (від ДР 1.7) через барботер.

Далі через засівну колбу (від ТП 7.4) вносять посівний матеріал з попередньої стадії. Культивування здійснюють при температурі 30 °С упродовж 20 год. Кожні 8 год відбирають пробу для контролю концентрацій біомаси та мікробіологічного контролю. Кінцева концентрація біомаси – 9,5 г/л.

*ТП 7.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л*

В інокулятор об'ємом 50 л з композицією Б (від ДР 6.3.2) подають самоплином стерильний 6 %-й гідроксид натрію до стабілізації рН до оптимального рівня 6,9 (від ДР 2.2), композицію А (від ДР 6.3.1) та вносять з колби розчин вітамінів (від ДР 4.1). Вмикають перемішувач (250 об/хв) та подають стерильне повітря (від ДР 1.7) через барботер.

Далі через трубу перетискування (від ТП 7.5) подають посівний матеріал з попередньої стадії. Культивування здійснюють при температурі 30 °С упродовж 20 год. Кожні 8 год відбирають пробу для контролю концентрацій біомаси та мікробіологічного контролю. Кінцева концентрація біомаси – 9,5 г/л.

*ТП 7.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 500 л*

В інокулятор об'ємом 500 л з композицією Б (від ДР 6.4.2) подають самоплином стерильний 6 %-й гідроксид натрію до стабілізації рН до оптимального рівня 6,9 (від ДР 2.2), композицію А (від ДР 6.4.1) та вносять з

колби розчин вітамінів (від ДР 4.1). Вмикають перемішуючий пристрій (250 об/хв) та подають стерильне повітря (від ДР 1.7) через барботер.

Далі через трубу перетискування (від ТП 7.6) подають посівний матеріал з попередньої стадії. Культивування здійснюють при температурі 30°C упродовж 20 год. Кожні 8 год відбирають пробу для контролю концентрацій біомаси та мікробіологічного контролю. Кінцева концентрація біомаси – 9,5 г/л.

### **ТП 8. Виробничий біосинтез**

#### **ТП 8.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup>**

У ферментер об'ємом 10 м<sup>3</sup> (Ф-39) з композицією Б (від ДР 6.5.2) подають самоплином стерильний 6 %-й гідроксид натрію до стабілізації рН до оптимального рівня 6,9 (від ДР 2.2), перистальтичним насосом (Н-34) перекачують композицію А (від ДР 6.5.1) та вносять з колби розчин вітамінів (від ДР 4.1). Вмикають перемішуючий пристрій (250 об/хв) та подають стерильне повітря (від ДР 1.7) через барботер. Далі через трубу перетискування (від ТП 7.7) подають посівний матеріал з попередньої стадії.

Культивування здійснюють при температурі 30 °С упродовж 40 годин. Впродовж культивування кожні 6 годин подаються стерильні підживлювальні розчини вуглецю (від ДР 5.1, за допомогою насоса Н-28) та азоту (від ДР 5.2, за допомогою насоса Н-31).

У процесі культивування кожні 8 год відбирають проби культуральної рідини для контролю концентрацій біомаси, джерел вуглецю, азоту, а також для мікробіологічного контролю. Кінцева концентрація лізину має становити 201,6 г/л, кінцева концентрація біомаси – 18,9 г/л.

## Розділ 7. Контроль виробництва

### 7.1. Мікробіологічний контроль

#### 7.1.1. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Мікробіологічний контроль проводиться шляхом висіву зразка на чашку Петрі методом виснажувального штриха або мікроскопіюванням. На виробництві частіше використовують метод мікроскопіювання, бо він не потребує додаткового часу на очікування. Для перевірки мікробіологічної чистоти культуральну рідину розсівають на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій (інкубують 24–48 год за температури  $37\pm 2$  °С), і на чашки з сусло–агаром (СА) для виявлення дріжджів і грибів (інкубують 7 діб за температури  $30\pm 2$  °С) [41].

Мікроскопіюють зразок використовуючи препарат «роздавлена крапля». Готують його наступним чином: на знежирене предметне скло наносять краплину культуральної рідини, накривають покривним скельцем та мікроскопіюють, використовуючи об'єктив 40х. Клітини *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 мають форму прямих або увігнутих тонких паличок з загостреними або булавоподібними кінцями, розмірами 0,3-0,8 \* 1,5-8,0 мкм, розташованих поодиноці або попарно в V-подібній конфігурації. При рості на кров'яному агарі через 72 год утворюють опуклі напівпрозорі колонії з матовою поверхнею [11].

#### 7.1.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Відбирають пробу простерилізованого поживного середовища об'ємом 50 мл, висівають 0,1 мл з цієї кількості на чашки Петрі з сусло-агаром – для виявлення грибів та дріжджів, з м'ясо-пептонним агаром – для виявлення бактерій. Чашки з посівами загортають у папір і поміщають у термостат. Інкубація відбувається за температури 32 °С протягом 1 доби (бактерії) та за

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.22 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Контроль виробництва	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Павлієнко Д.П.</i>						6	96
<i>Керівник</i>	<i>Силейко Т.Л.</i>					<i>Кафедра БТМ</i> 49		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

25 °C протягом 3 діб (гриби, дріжджі). На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [41].

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

### **7.2.1. Концентрація біомаси**

Біомасу визначають за оптичною густиною розведеної клітинної суспензії на фотоелектроколориметрі з довжиною хвилі 562 нм з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка [8].

### **7.2.2 Визначення концентрації джерел вуглецю та азоту**

#### **Визначення концентрації джерела вуглецю**

Джерелами вуглецю в поживному середовищі є глюкоза та бурякова патока. Вміст глюкози визначають глюкозооксидазним методом, суть якого полягає в окисненні глюкози з утворенням пероксиду водню, який у подальшому окиснює ортотолуїдин з утворенням забарвленої сполуки, оптичну густина якої визначають за довжини хвилі 625 нм [42].

Вміст бурякової патоки обчислюють, виходячи із вмісту залишкових редукуючих речовин (глюкоза, фруктоза) колориметричним методом з використанням 3,5-динітросаліцилової кислоти (ДНСК). До 10 мл супернатанту після осадження біомаси додають 10 мл ДНСК, витримують проби 10 хв за 100 °C, потім 5 хв за 0 °C. Після цього вимірюють оптичну густина утвореного розчину за довжини хвилі 540 нм [43].

#### **Визначення концентрації джерела азоту**

Джерелами азоту в поживному середовищі є сульфат амонію та кукурудзяний екстракт. Концентрацію сульфату амонію визначають фотометричним методом з використанням реактиву Несслера, який утворює з іонами амонію важкорозчинну червоно-помаранчеву сполуку. 10 мл супернатанту (отриманого після відділення біомаси), переносять у мірну колбу на 100 мл, доводять до мітки дистильованою водою; далі з утвореного розчину відбирають аліквоту (5-10 мл) у мірну колбу на 100 мл, додають близько 80 мл дистильованої води, 1,0 мл реактиву Несслера і доводять об'єм розчину до мітки. Через 10 хвилин

вимірюють оптичну густину розчину на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 400 нм і товщині шару 1 см. Концентрацію  $\text{NH}_4^+$  визначають за калібрувальним графіком [44].

Вміст кукурудзяного екстракту обчислюватимемо за кількістю амінного азоту (враховуючи, що вміст амінного азоту в кукурудзяному екстракті становить 1,6 % [45]), визначеного мідним способом. Суть даного методу полягає в тому, що до супернатанту (отриманого після відділення біомаси та підлужнення 0,1 М розчином натрію гідроксиду) додають надлишок суспензії ортофосфату міді  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні сполуки, які відділяють від нерозчинного ортофосфату міді фільтруванням. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді. Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину додають йодид калію. В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а отже, і Нітрогену амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію, після чого обчислюють кількість амінного азоту в мг/л, врахувавши, що 1 мл 0,01 М розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту [46].

### 7.2.3. Концентрація цільового продукту

Концентрацію лізину визначають спектрофотометрично, визначаючи оптичну густину розчину помаранчево-червоного кольору, що утворюється в результаті взаємодії досліджуваного супернатанту з розчином 8-гідроксихіноліну в ацетоні та лужним розчином бромиду, за довжини хвилі 500 нм [47].

### Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1

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
ДР 1.1 Забір атмосферного повітря $K_T$	повітрязабірник висота повітрязабірника	–	під час купівлі та встановлення	$H = 16 \text{ м}$
ДР 1.2 Очистка від грубих домішок	повітря після проходження фільтра грубої очистки	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	$E = 90 \%$

К <sub>г</sub>	ступінь очистки			
ДР 1.3 Компресіювання повітря К <sub>г</sub>	<i>стиснене повітря після проходження компресора</i> тиск, температура	манометр, термометр	після проходження через компресор	P = 1,0 МПа t° = 120 – 200 °C

Продовження табл. 7.1

ДР 1.4 Охолодження повітря та видалення вологи К <sub>т</sub>	охолоджене повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після охолодження	t° = 25–30 °C W = 60–70 %
ДР 1.5 Нагрівання повітря К <sub>т</sub>	нагріте повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після нагрівання	t° = 45–50 °C W = 50 %
ДР 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі К <sub>т</sub>	повітря після проходження головного фільтра ступінь очищення	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	E = 95 %
ДР 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі К <sub>т</sub>	повітря після проходження індивідуального фільтра ступінь очищення	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	E = 99,995 %
ДР 2.1 Приготування 6-% розчину хлоридної кислоти на весь технологічний процес К <sub>т</sub> , К <sub>х</sub>	розчин хлоридної кислоти концентрація	за густиною розчину	після приготування розчину	ρ(6 % HCl) = 1,0279 г/мл
ДР 2.2 Приготування та стерилізація 6-% розчину їдкою натрію на весь технологічний процес К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub> , К <sub>х</sub>	розчин натрію гідроксиду концентрація, тиск, час, стерильність	визначення концентрації за густиною розчину, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація – після приготування розчину, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	ρ(6 % NaOH) = 1,0648 г/мл P = 0,15 МПа t = 40 хв стерильність
ДР 3.1 Освітлення потоки К <sub>т</sub> , К <sub>х</sub>	розчин потоки температура, частота обертання мішалки, рН	датчик температури, тахометр, датчик рН	Температура та швидкість перемішування підтримуються автоматично	t° = 40 °C n = 50 об/хв рН = 4,0
ДР 3.2 Центрифугування потоки К <sub>т</sub> , К <sub>х</sub>	розчин потоки частота обертання центрифуги, час центрифугування	тахометр, таймер	Швидкість обертання центрифуги підтримується автоматично	n = 1500 об/хв t = 10 хв
ДР 4.1 Приготування та стерилізація розчину вітамінів К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	розчин вітамінів тиск, діаметр пор ультрафільтраційної мембрани, стерильність	манометр, мікробіологічний контроль	Тиск – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	P = 0,5 МПа d = 0,22 мкм стерильність

<p>ДР 5.1 Приготування та стерилізація підживлювально го розчину джерел вуглецю К<sub>Т</sub>, К<sub>М</sub></p>	<p>розчин джерел вуглецю температура, частота обертання мішалки, час стерилізації, стерильність</p>	<p>датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура розчинення та швидкість перемішування підтримуються автоматично, температура, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t° (розчинення) = 40 °C n = 320 об/хв t° (стерилізації) = 112 °C t = 30 хв стерильність</p>
<p>ДР 5.2 Приготування та стерилізація підживлювально го розчину джерела азоту К<sub>Т</sub>, К<sub>М</sub></p>	<p>розчин джерела азоту температура, частота обертання мішалки, час стерилізації, стерильність</p>	<p>датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура розчинення та швидкість перемішування підтримуються автоматично, частота обертання мішалки, температура, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t° (розчинення) = 40 °C n = 50 об/хв t° (стерилізації) = 131 °C t = 40 хв стерильність</p>
<p>ДР 6.1.1, 6.2.1 Приготування та стерилізація композиції А К<sub>Т</sub>, К<sub>М</sub></p>	<p>композиція А температура, час, стерильність</p>	<p>термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t° = 112 °C t = 30 хв стерильність</p>
<p>ДР 6.1.2, 6.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б К<sub>Т</sub>, К<sub>М</sub></p>	<p>композиція Б температура, час, стерильність</p>	<p>термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t° = 131 °C t = 40 хв стерильність</p>
<p>ДР 6.1.3, 6.2.3 Приготування та стерилізація композиції В К<sub>Т</sub>, К<sub>М</sub></p>	<p>композиція В температура, час, стерильність</p>	<p>термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t° = 131 °C t = 40 хв стерильність</p>
<p>ДР 6.3.1, 6.4.1, 6.5.1 Приготування та стерилізація композиції А К<sub>Т</sub>, К<sub>М</sub></p>	<p>композиція А температура розчинення, частота обертання мішалки, час і температура стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>манометр, датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура розчинення та швидкість перемішування підтримуються автоматично, температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t° (розчинення) = 40 °C n = 50 об/хв t° = 112 °C t = 30 хв стерильність</p>

Продовження табл. 7.1

ДР 6.3.2, 6.4.2, 6.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub> , К <sub>х</sub>	композиція Б рН, температура, тиск, час, стерильність	датчик рН, датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	рН – перед стерилізацією, температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації	рН = 4,5 Р = 0,15 МПа t° = 131 °С t = 40 хв стерильність
ТП 7.1 Підтримання колекційної культури К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	колекційна культура <i>Corynebacterium glutamicum</i> ZL-92 температура, мікробіологічна чистота	датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 2 місяці	t° = 4 °С мікробіологіч на чистота
ТП 7.2 Одержання робочої культури К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	робоча культура <i>Corynebacterium glutamicum</i> ZL-92 на чашках Петрі температура, час, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування	t° = 29–31 °С t = 20 год мікробіологіч на чистота
ТП 7.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	робоча культура <i>Brevibacterium</i> sp. 90 у пробірках температура, час, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування	t° = 30 °С t = 20 год мікробіологіч на чистота
ТП 7.4 Вирощування культури в колбах на качалках К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	датчик температури, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, частота обертання колб підтримується автоматично, мікробіологічний контроль – після культивування	t° = 30 °С t = 20 год n = 250 хв <sup>-1</sup> мікробіологіч на чистота
ТП 7.5, 7.6, 7.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 5 л і 50 л та 0,5 м <sup>3</sup> К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	посівний матеріал рН, температура, час, швидкість перемішування, витрата аераційного повітря, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	датчик температури, датчик рН, годинник, тахометр, ротаметр, фотоелектроколо риметр, мікробіологічний контроль	рН – перед початком процесу, температура, частота обертів мішалки та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси та мікробіологічний контроль – кожні 8 год і після культивування	рН = 6,9 t° = 30 °С t = 20 год v = 1 л/(л*хв) n = 250 хв <sup>-1</sup> X = 9,5 г/л мікробіологіч на чистота

<p>ТП 8.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup> К<sub>т</sub>, К<sub>м</sub></p>	<p>культуральна рідина температура, час, швидкість перемішування, витрата аераційного повітря, рН, концентрація біомаси, концентрація лізину, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, рН, годинник, тахометр, ротаметр, хроматограф, фотоелектроколо риметр, мікробіологічни й контроль</p>	<p>Температура, рН, швидкість перемішування та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси, лізину, мікробіологічний контроль – кожні 8 год</p>	<p>рН = 6,9 t° = 30 °С t = 60 год v = 1 м<sup>3</sup>/(м<sup>3</sup>*хв) n = 220 хв<sup>-1</sup> С(лізину) = 201,6 г/л X = 18,9 г/л мікробіологіч на чистота</p>
--	---	--	--	--

## ЛІТЕРАТУРА

1. Lysine [Электронний ресурс] // Режим доступу: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00123>
2. Северьянова Л. А., Долгинцев М. Е. Современные представления о действии аминокислоты L-лизина на нервную и иммунную регуляторные системы. Человек и его здоровье. 2007, №2, 67-79.
3. ЛИЗИН [Электронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2067/lizin>
4. L-Lysine. [Электронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/15501?lang=en&region=UA&gclid=CjwKCAjwm7mEBhBsEiwA\\_of-TPWL4JWSw4EGrwtExl2Xg3vdaCY5C-rWwsxro5JhqIThczbRfU1J9RoChGkQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/15501?lang=en&region=UA&gclid=CjwKCAjwm7mEBhBsEiwA_of-TPWL4JWSw4EGrwtExl2Xg3vdaCY5C-rWwsxro5JhqIThczbRfU1J9RoChGkQAvD_BwE)
5. 9 Lysine Benefits (Cold Sores) + Foods High In Lysine (dostupné online) [Электронний ресурс] // Режим доступу: <https://selfhacked.com/blog/lysine-health-benefits/>
6. L-ЛИЗИНУ ЕСЦИНАТ ® [Электронний ресурс] // Режим доступу: [http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[9969\]](http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[9969])
7. YangyongLv, Juanjun Liao. Genome Sequence of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, Which Provides Insight into Amino Acid Biosynthesis in Coryneform Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 2012,194(3), 742-743
8. Xu,J.-Z.,Yu,H.B. Metabolic engineering of glucose uptake systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of l-lysine production. *Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology*. 2019. doi:10.1007/s10295-019-02170-w
9. Xu,J.-Z.,Ruan,H.Z. Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of l-lysine production from mixed sugar. *MicrobialCellFactories*. 2020, 19(1). doi:10.1186/s12934-020-1294-7

10. Ауксотрофність продуцентів лізину [Електронний ресурс] // Режим доступу: АУКСОТРОФНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ ЛІЗИНУ Г. С. Андріяш Г. М. Заболотна ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України, Київ С. М. Шульга

11. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 368 с., ил.

12. The Bacterial Diversity Metadatabase. *Corynebacterium glutamicum*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bacdiv.dsmz.de/strain/3092>.

13. Toride Y (2004). "Lysine and other amino acids for feed: production and contribution to protein utilization in animal feeding". Protein sources for the animal feed industry; FAO Expert Consultation and Workshop on Protein Sources for the Animal Feed Industry; Bangkok, 29 April - 3 May 2002. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 978-92-5-105012-5.

14. В Україні упало поголов'є коров и кур, зато выросло число свиней: опублікована статистика [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://economics.segodnya.ua/economics/enews/v-ukraine-upalo-pogolove-korovi-kur-zato-vyroslo-chislo-sviney-opublikovana-statistika-1507729.html>

15. Количество корма для свињи [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://agrovitex.ru/articles/skolko-korma-nuzhno-svine>

16. Кількість свиней в господарствах всіх категорій [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://kurkul.com/news/28589-nazvano-regioni-de-naybilshe-skorotilas-kilkist-sviney>

17. Ю.В. Карлаш. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш - К: НУХТ, 2013. – 143 с

18. Аппараты стальные эмалированные с механическим перемешивающим устройством [Електронний ресурс] // Режим доступу: [http://euromash.kiev.ua/ru/aparati\\_emal\\_mehanicheskim\\_perem\\_ustroystvom\\_ru.php](http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ru.php)

19. [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/gruboy-ochistki/klass-g4-eu4/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-fyap-vp-klass-ochistki-g2-g5-iz-him-volokna/#tabs-tehnicheskie\\_harakteristiki](https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/gruboy-ochistki/klass-g4-eu4/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-fyap-vp-klass-ochistki-g2-g5-iz-him-volokna/#tabs-tehnicheskie_harakteristiki)

20. Винтовой компрессор Comrag F-3710 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.compressortyt.ru/stanciya/kompr/vintovye/comrag/f-3710/>

21. Осушувач rdx-65 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://kms-market.com.ua/p504451339-osushitel-rdx.html>

22. Ресивер для компрессора на 6000 л [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://drobesfera.ru/product/resiver-dlya-kompressora-na-6000-litrov-8-bar-vertikalnyu>

23. Водяные теплообменники Salda [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.realvent.ru/catalog/ventilyaciya/teploobmenniki/vodyanye-nagrevateli/salda/avs-160-71372/>

24. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/tonkoj-ochistki/klass-f9-eu9/filtr-vozdushnyj-karmannyj-fvk-fyak-tonkoj-ochistki-f5-f9-na-lente/>

25. Реакторы химические с перемешивающим устройством [Электронный ресурс] // Режим доступа: [http://euromash.kiev.ua/ru/aparati\\_perem\\_ustroystvom\\_ru.php](http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_perem_ustroystvom_ru.php)

26. Циркуляційний Насос Насосы+ BPS 32/12-220 + гайка [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://f.ua/ua/nasosiy/bps-32-12-220-043-gayka-up-4.html>

27. Центрифуги с верхней разгрузкой и прямым приводом [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://mida.ru/catalog/centrifugi/centrifugi-s-verhnej-razguzkoj-pryamym-privodom/>

28. Фильтр воздушный абсолютной очистки HEPA МКР: класс очистки H11, H13, H14, цена, фото, характеристики [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-absolyutnoj-ochistki/filtr\\_vozdushnyj\\_absolyutnoj\\_ochistki\\_hepa\\_mkr\\_klass\\_ochistki\\_h11\\_h13\\_h14/](https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/filtry-absolyutnoj-ochistki/filtr_vozdushnyj_absolyutnoj_ochistki_hepa_mkr_klass_ochistki_h11_h13_h14/)

29. 5 Liter Bioreactor Assembly [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.broadleyjames.com/product/5-liter-bioreactor-assembly-microbial-fermentation/>

30. Насос перистальтический МР-3 [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://www.vicaqua.com.ua/chemical\\_pumps/peristaltic\\_pumps/mp-3/](https://www.vicaqua.com.ua/chemical_pumps/peristaltic_pumps/mp-3/)

31. Реактор лабораторный [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://tirit.org/reactor\\_him/lab\\_steel\\_gomo.php](https://tirit.org/reactor_him/lab_steel_gomo.php)

32. 50L Pyrolysis Reactor [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://www.alibaba.com/product-detail/30L-50L-Pyrolysis-Reactor-Double-Glass\\_1600423107139.html?spm=a2700.pc\\_countrysearch.main07.43.e6052609QcbpTu](https://www.alibaba.com/product-detail/30L-50L-Pyrolysis-Reactor-Double-Glass_1600423107139.html?spm=a2700.pc_countrysearch.main07.43.e6052609QcbpTu)

33. Вагові дозатори [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://artmash.ua/category/dozatory?utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&keyword=%2B%D0%B2%D0%B0%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%2B%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80&utm\\_campaign=%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80\\_%D1%83%D0%BA%D1%80&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2IkoL7YZVDQaZBCjZ1cSRCfVLsszsHp3nzLlc2GiFSTHOFqvEJb6ny6RoCBKAQAvD\\_BwE](https://artmash.ua/category/dozatory?utm_source=google&utm_medium=cpc&keyword=%2B%D0%B2%D0%B0%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%2B%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80&utm_campaign=%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80_%D1%83%D0%BA%D1%80&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2IkoL7YZVDQaZBCjZ1cSRCfVLsszsHp3nzLlc2GiFSTHOFqvEJb6ny6RoCBKAQAvD_BwE)

34. Аппараты стальные эмалированные с механическим перемешивающим устройством [Электронный ресурс] // Режим доступа: [http://euromash.kiev.ua/ru/aparati\\_emal\\_mehanicheskim\\_perem\\_ustroystvom\\_ru.php](http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ru.php)

35. Industrial-scale bioreactor 500-1000L [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-500-1000l/>

36. Дозатор весовой автоматический [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://vesmaster.com.ua/images/dozators/doz5.html>
37. Аппараты с механическим перемешивающим устройством [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://chimmash.ru/meshalka.htm>
38. МОДЕЛЬНЫЙ РЯД ПЕРИСТАЛЬТИЧЕСКИХ НАСОСОВ MS [Электронный ресурс] // Режим доступа: [https://vaterpass.ua/modelnyj\\_ryad\\_peristalticheskikh\\_nasosov\\_ms](https://vaterpass.ua/modelnyj_ryad_peristalticheskikh_nasosov_ms)
39. Ваговий дозатор ДВМ-50 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://foodbay.com/uk/minsk/search/upakovochnoje-oborudovanije/fasovochno-upakovochnyje-avtomaty/dozatory/vesovoj-dozator-dvm-50-23714.html>
40. Реактор нержавеющей с мешалкой V=0,063 - 0,25 м<sup>3</sup> [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://tdredoctober.com/catalog/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy-v0063-m3-025-m3.html>
41. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
42. Пирог Т.П., Антонюк М.М., Ігнатенко С.В. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 "Біотехнологія" ден. форми навч. — Київ : НУХТ, 2010. — 127 с.
43. Garriga M., Almaraz M., Marchiaro A. Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method). *Actas de Ingenieria*. 2017, 3: 173-179. Режим доступа: <http://fundacioniai.org/actas/Actas3/Actas3.19.pdf>.
44. Метод Неслера [Электронный ресурс]//Режим доступа: <http://uapatents.com/5-57802-sposib-viznachennya-amonijnogo-azotu.html/>.
45. Экстракт кукурудзяний [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://interstarch.com.ua/uk/products/corn-steep-liquor2/corn-steep-liquor>.

46. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» спец. «Технологія продуктів бродіння і виноробства» / Укл.: А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. – К: НУХТ, 2011. – 53 с.

47. Сорочан О.О., Штеменко Н.І. Методи аналізу амінокислот: Навч.-метод. посіб. – Д.: РВВ ДНУ, 2005. – 60 с.\