

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

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

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” листопада 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Нікандрової Дар'ї Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи “Біосинтез треоніну *Escherichia coli*”.

керівник роботи Воронцов Олександр Олександрович,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року № 915-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2024

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Escherichia coli* , цільвий продукт:
треонін

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

5. Перелік графічного матеріалу

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	04.11-14.11.2023	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	15.11-23.11.2023	
3	Техніко-економічне обґрунтування виробництва	24.11-29.11.2023	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	30.11-07.12.2023	
5	Специфікація обладнання	08.12-14.12.2023	
6	Опис технологічної схеми	14.12-20.12.2023	
7	Контроль виробництва	20.12-25.12.2023	
8	Оформлення кваліфікаційної роботи	26.12-30.12.2023	
9	Оформлення графічної частини	26.12-30.12.2023	

Здобувач

_____ (підпис)

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, 9 розділів, списку використаних джерел. Загальний обсяг - 66 сторінок, 8 малюнків, 14 таблиць, 36 бібліографічних найменувань та графічної частини(технологічна схема та апаратурна схема).

Робота присвячена культивуванню амінокислоти треонін бактерією *Escherichia coli*. Серед опрацьованого матеріалу та літератури визначено, чому треонін вигідніше синтезувати саме за допомогою кишкової палички та вибрано штам *E.coli P 2.1 -2901Δ*, який продукує 121,05г/л треоніну за 48 годин. Визначено необхідність м'ясної промисловості України в синтезі треоніну. Представлено опис технологічного процесу, що складається з підготовки приміщень для виробничого процесу, стадії підготовки поживних середовищ, приготування цього середовища та умови самого біосинтезу. Описано мікробіологічні та технічні методи контролю виробництва. Також надана графічна частина проекту, яка являє собою технологічну схему з точками контролю на кожній стадії та апаратурну схему.

Ключові слова: L-треонін, *Escherichia coli*, незамінна амінокислота, біосинтез, ВЕРХ.

ЗМІСТ

<i>РЕФЕРАТ</i>	4
<i>ВСТУП</i>	6
<i>РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту</i>	7
1.1. Фізико-хімічні властивості	7
1.2. Виробництво треоніну	8
1.3. Використання	9
<i>РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного	11
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	16
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки	16
Фізіолого-біохімічні ознаки	Ошибка! Закладка не определена.
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	18
<i>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування</i>	20
<i>РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту</i>	24
4.1. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	24
<i>РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	26
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	27
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	28
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	33
<i>РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання</i>	35
<i>РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми</i>	41
Опис технологічного процесу	41
<i>РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва</i>	51
8.2. Мікробіологічний контроль	55
8.2.1. Концентрація біомаси	56
8.2.2. Концентрація треоніну	57
8.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	58
<i>РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля</i>	60
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на	60
9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	62
9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	63
9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів	63
9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів	63
<i>ЛІТЕРАТУРА</i>	64

ВСТУП

Однією з основних галузей України є м'ясна промисловість, що відноситься до харчової. Завдяки цій галузі здійснюється забезпечення населення в м'ясі птиці, королів та свиней. Особливе місце займає курятина, адже вона у великій кількості йде на експорт, забезпечуючи Україні місце в світовому топі по експорту м'яса птиці. Однак, зараз для забезпечення нормального розвитку та приросту маси тіла курчат звичайних зернових кормів недостатньо, адже вирощуються відселектовані птиці, у яких надзвичайно високий рівень обміну речовин в організмі. Таким чином, стає необхідним використання білкових добавок, до складу яких входять всі незамінні амінокислоти (метіонін, лізин, триптофан, аргінін, валін, гістидин, лейцин, ізолейцин, треонін, гліцину, фенілаланін), кількість яких має строгі пропорції.

Актуальність: треонін є найважливішим активатором росту м'язової тканини і використовується як стимулятор росту у тваринництві. Кожного року обсяги виробництва м'яса в Україні зростають, таким чином і зростає попит на кормові препарати. В Україні виробляють кормові добавки з треоніном та іншими амінокислотами, які надходять за рахунок імпорту. Основними постачальниками амінокислот в Україну є Китай (83,0% від загального обсягу ще за 2017 р), а також Німеччина, Польща. Тому організація виробництва треоніну в Україні доцільно.

Новизною є використання штаму *Escherichia coli* P 2.1 -2901Δ, отриманого за допомогою генної інженерії, завдяки чому в мікроорганізмі, шляхом регуляції експресії ключових метаболічних генів, підвищили синтез L-треоніна на останніх стадіях.

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

1.1. Фізико-хімічні властивості

Треонін (2-аміно-3-гідроксибутанова кислота $C_4H_9NO_3$) – це сполука, яку відносять до незамінних амінокислот. В своєму складі вона містить карбоксильну ($-COOH$) і аміно ($-NH_2$) групи. Так як має два хіральних центра, існує у вигляді чотирьох оптичних ізомерів: L-, D-треонин, L-, D-аллотреонин. Проте, найбільш важливим є L-треонин.

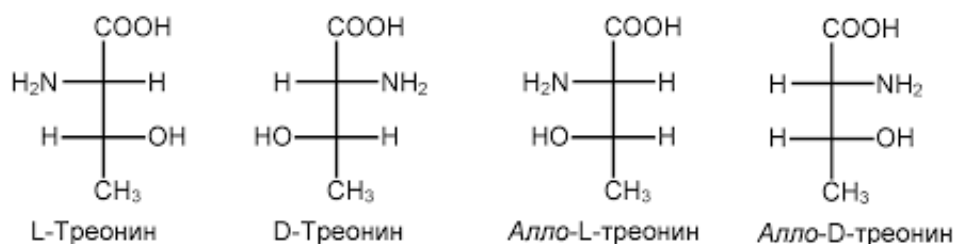


Рис.1.1. Оптичні ізомери треоніну[2].

Являє собою білу кристалічну речовину (Рис.1.2), що добре розчиняється у воді, але погано в органічних розчинниках, молярна маса дорівнює 119,10 моль. Треонін, як і всі амінокислоти, має високу температуру плавлення – 256°C .



Рис.1.2. Треонін продається у вигляді кристалічного порошку.

					НУХТ БТЕК		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Нікандрова Д.А.				Літ.	Арк.	Акрівшів
Перевір.	Воронцов О.О.					4	
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

Треонін виконує багато функцій. Наприклад, він запобігає накопиченню жирів в клітинах печінки, шляхом розщеплення жирних кислот та жирів. Входить до складу антитіл та імуноглобулінів. З продуктів розпаду треоніну синтезуються інші амінокислоти – гліцин та серин, що відповідають за колаген та еластин в м'язовій тканині.

Також, треонін використовують при лікуванні нервових захворювань, депресії та деяких видів склерозу.

Ця амінокислота вважається незамінною по тій причині, що хребетні не здатні її синтезувати. А надходить вона з їжею, особливо велика кількість треоніну міститься в м'ясі [1].



Рис.1.3. Треонін у складі лікарських препаратів.

1.2. Виробництво треоніну

Як вже відомо, треонін не синтезується в організмах людини та тварин, проте синтезується в клітинах мікроорганзмів та рослин.

Існує три шляхи синтезу треоніну: гідроліз природних білків, хімічний синтез з ацетальдегіду і гліцину та мікробіологічний синтез. Однак, перші два методи не задовольняють промислові потреби.

Найпоширенішими продуцентами треоніну є корінебактерії та ентеробактерії. Одним з вагомих мінусів корінебактерій є те, що вони, інтенсивно

продукуючи глютамінову кислоту та лізин, порівняно повільно продукують треонін.

Відомо, що у кишкової палички синтез треоніну відбувається з аспаргінової кислоти. Крім потрібної амінокислоти утворюються також лізин, метіонін та ізолейцин. Які, в свою чергу, йдуть на синтез білків, не заважаючи при цьому синтезу треоніну. Однак, відбувається багато перетворень *E.coli* за допомогою генної інженерії, завдяки яким в клітинах бактерій припиняється або частково припиняється синтез інших амінокислот, при цьому їх необхідно додавати до поживного середовища. Широко розповсюджена також ампліфікація генів, що базується на повторюванні гену в геномі, завдяки чому цільовий продукт синтезується в тій кількості більше, в якій повторюється заданий ген. Так, у кишкової палички за синтез треоніну відповідальний треоніновий оперон, таким чином, збільшуючи у клітинах бактерії треонінові оперони, ми забезпечуємо збільшення виходу треоніну. [8]

1.3. Використання

Треонін широко використовується також у багатьох біотехнологічних процесах. В медичній промисловості ця амінокислота необхідна для одержання деяких напівсинтетичних антибіотиків. Треонін додається у поживні середовища, призначені для культивування клітин.

Треонін є регулятором використання амінокислот у організмі та обміну білка у цілому, і таким чином є найважливішим активатором росту м'язової тканини у курчат. Так, в джерелі [5] експериментально доведено, що при правильному співвідношенні треоніну і триптофану у раціоні бройлерів, їхня маса збільшувалася на 140 г в порівнянні з групою курчат без такого раціону.

Незамінні кислоти, зокрема треонін, забезпечують перетворення нейтральних жирів у фосфоліпідів, які, в свою чергу, забезпечують антиоксидантний захист клітин. Також, він підтримує роботу шлунково-кишкового каналу, приймає участь у процесах метаболізму. Тому, на його основі

роблять різні кормові добавки для домашніх улюбленців, таких як кошки та собаки [7].



Рис.1.4. Треонін у складі сивородки для протеїновх напоїв та протеїнових батончиках.

Тієї кількості, в якій треонін міститься в рослин, що використовують як основу для кормів сільськогосподарських тварин, недостатньо. Традиційні раціони сільськогосподарських тварин та спосіб їх використання мають суттєві недоліки. Існуючі технології у вітчизняному тваринництві настільки застарілі і не відповідають вимогам сьогодення, що не дозволяють досягати високої ефективності використання кормів та підвищення рівня рентабельності тваринницької галузі. Тому стає актуальним підняття теми раціонального використання кормових ресурсів під час відгодівлі свиней, який вже перевірили не одним десятиріччям. При організації годівлі свиней особливу увагу слід звертати на склад кормового протеїну, який вказує на надходження незамінних амінокислот. Від забезпеченості свиней поживними речовинами залежать основні показники їх продуктивності[10].

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

При проведенні дослідження продуцентів незамінних амінокислот аспаратної родини, вчені виокремили такі родини: *C. glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium sp.* Отже, основними бактеріями продуцентами таких амінокислот, як треонін, є *Escherichia coli*, роди *Corynebacterium* та *Brevibacterium*[11].

Як відомо, для досягнення надсинтезу цільового продукту над штамом продуцентом проводять ряд модифікацій. Одним із таких методів одержання штамів є мутагенез із наступною селекцією мутантних клонів. У роботі [12] такі штами продуцентів треоніну *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446 отримали за допомогою ультрафіолетового випромінювання (УФ).

А от у кишкової палички, коли треонін у клітинах накопичується в більшій кількості, ніж потрібн, він пригнічує фермент аспартокіназу, що є причиною зупинки надсинтезу треоніну. Якщо ж пригнічення аспартокінази не припиняє процес і треонін продовжує синтезуватися в надлишку, в силу вступає репресія – інший процес регуляції біосинтезу. [13]. Іншою проблемою постає деградація треоніну треоніндегідрогеназою. Таким чином, перед науковцями стоїть питання про подолання цих процесів зупинки надсинтезу треоніну. Одним з таких способів є транспозонне блокування гену, що кодує треоніндегідрогеназу та подальше використання мутації для досягнення надсинтезу амінокислоти, як це вдалося досягти з *E.coli* K12. Однак, для цього штаму в поживне середовище необхідно додавати треонін та ізолейцин, що роблять таку середу дорожчою[14].

НУХТ БТЕК

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Нікандрова Д.А.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика цільового об'єкту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О.О.					8	
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

В джерелі [15] вказано, що при змінненні експресії ключових генів, що відповідають за синтез треоніну на останніх стадіях, таких як *thrAB*, *thrB* і *thrC*, змінюється кінцевий вихід треоніну. Висока експресія *thrC* одночасно сприяла зростанню та накопиченню L-треоніну. Однак також спостерігалось співвідношення між *thrAB* і *thrC*, коли рівень L-треоніну знижувався через занадто високої кількості *thrC*. Таким чином, після проведення низки досліджень, результати показали, що при експресії *thrC* вище, ніж *thrAB*, продукування L-треоніну було вищим. Але коли експресія *thrC* набагато вища, рівень L-треоніну знижувався. Тож, було виведено, що найвигіднішим співвідношенням було відношення *thrAB:thrC* як 3:5.

При експресії вищезазначених генів збільшується продукування ацетату, що також може знижувати синтез треоніну. Таким чином, продуктивність треоніну також підвищили шляхом зменшення синтезу надлишку ацетату завдяки делеції *ptsG*. З отриманим штамом проводили дослідження щодо поведінки при культивуванні треоніну в велих ферментерах протягом довгого часу. Після проведення розрахунків стосовно цін поживного середовища для культивування різних штамів бактерій, робимо висновок, що штам *Escherichia coli P 2.1 -2901Δ* є найвигіднішим.

Порівняння процентів треоніну

Таблиця 2.1

Назва продуценту	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація треоніну, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана лігература
	Компонент	концентрація, г/л				
<i>Escherichia coli</i> <i>TWF083</i>	глюкози дріжджевого екстракту (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ – 2 MgSO ₄ · 7H ₂ O FeSO ₄ · 7H ₂ O O MnSO ₄ · 4H ₂ O	30 3 20 2 2 0,005 0,005	48	116,6	Культивування проводять ферментері при 37°C, pO ₂ =30,0%, pH=6,9. 200 об/хв.	Lei Zhao, Ying Lu, Jun Yang, Yu Fang, Lifei Zhu, Zhixiang Ding, Chenhui Wang, Wenjian Ma, Xiaoqing Hu & Xiaoyuan Wang. Expression regulation of multiple key genes to improve L-threonine in <i>Escherichia coli</i> // <i>Microbial Cell Factories</i> volume. – 2020. P. 23. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01312-5
<i>Escherichia coli</i> <i>THRD</i>	Глюкоза Кукурудзяни екстракт (рідкий) Дріжджевий екстракт Пептон Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ × 7H ₂ O FeSO ₄ MnSO ₄ × H ₂ O Бетаїн	30 15 мл 6 6 0,5 20 2 0,6 50 мг 50 мг 0,5	48	117,1	Культивування проводять ферментері при 36°C, pO ₂ =30,0%, pH=7. 200 об/хв	Electronic Journal of Biotechnology Volume 39, May 2019, Pages 67-73. Betaine supplementation improved l-threonine fermentation of <i>Escherichia coli</i> THRD by upregulating zwf (glucose-6-phosphate dehydrogenase) expression. Yanjun Li, Dezhi Zhang, Ningyun Cai, Chao Han, Qian Mao, Ting Wang, Qian Zhou, Ning Chen, Xixian Xie. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.03.004

<p><i>Escherichia coli</i> P 2.1 -2901A <i>ptsG</i></p>	<p>Глюкоза Дріжджевий екстракт KH₂PO₄ MgSO₄×7H₂O FeSO₄·7H₂O (NH₄)₂SO₄ MnSO₄·H₂O Бетаин</p>	<p>20 3 2 2 0,005 20 0,005 0,5</p>	<p>48</p>	<p>121,05</p>	<p>Культивування проводили в ферментері 37°C, pO₂=30%, pH=6,8, 200 об/хв.</p>	<p>Dynamic and balanced regulation of the thrABC operon gene for efficient synthesis of L-threonine. Ruxin Hao, Sumeng Wang, Xin Jin, Xiaoya Yang, Qingsheng Qi, Quanfeng. Front Bioeng Biotechnol. 2023: doi: 10.3389/fbioe.2023.1118948</p>
---	---	--	-----------	---------------	--	--

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>Escherichia coli TWF083</i>	глюкози	30	54	1,62	1
	дріжджевого екстракту	3	14	0,042	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	20	25	0,5	1
	KH ₂ PO ₄ – 2	2	58	0,116	2
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2	11	0,022	2
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,0005	15	0,00000075	2
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,0005	39	0,0000195	3
	Вартість 1 л середовища – 2,3 грн				
<i>Escherichia coli THRD</i>	Глюкоза	30	54	1,62	1
	Кукурудзяни екстракт (рідкий)	15 мл	30	0,45	2
	Дріжджевий екстракт	6	14	0,084	2
	Пептон	6	1500	9	
	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	0,5	55	0,0275	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	20	25	0,5	1
	KH ₂ PO ₄	2	58	0,116	2
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,6	11	0,0066	2
	FeSO ₄	0,05	15	0,00075	2
	MnSO ₄ × H ₂ O	0,05	39	0,00195	3
	Бетан	0,5	180	0,09	4
	Вартість 1 л середовища – 11,89 грн				
<i>Escherichia coli P 2.1 - 2901Δ ptsG</i>	Глюкоза	20	54	1,08	1
	Дріжджевий екстракт	3	14	0,042	2
	KH ₂ PO ₄	2	58	0,116	2
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	2	11	0,022	2
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,005	15	0,000075	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	20	25	0,5	1
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,005	39	0,000195	3
	Бетан	0,5	180	0,09	4
Вартість 1 л середовища – 2,05 грн					

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Обраний штам *E.coli* для синтезу треоніну використовує глюкозу.

Необхідно розрахувати, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 121,05 г треоніну. Молекулярна маса треоніну $[\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3]$ становить 119. Отже, у 119 г треоніну міститься 48 г Карбону, а в 121,05 г треоніну $(48 \times 121,05) / 119 = 48,8$ г Карбону. Далі розрахуємо, у скількох грамах вуглеводів міститься 48,8 г Карбону. Якщо вміст Карбону у глюкозі становить майже 40% (41,2), то у 100 г вуглеводів міститься 40 г Карбону. Відповідно, 48,8 г Карбону міститься у $(48,8 \times 100) / 40 = 122$ г вуглеводів. Слід пам'ятати, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах (таких, як глюкоза), близько 50% окиснюється до CO_2 для одержання енергії. Таким чином, необхідний вміст глюкози в середовищі повинен дорівнювати – $(122 \times 0,5) + 122 = 183$ г.

Потреби С для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 61 г біомаси становить $61 \times 0,5 = 30,5$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(30,5 \times 100) / 40 = 76,25$ г вуглеводів. Розраховуючи холосте окиснення, отримаємо $(76,25 \times 0,5) + 76,25 = 114,4$ г/л глюкози необхідної для синтезу біомаси. Тоді загальний вміст глюкози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (61 г/л) та треоніну (121,05 г/л), становить $183 + 114,4 = 297,4$ г ~ 30%

Розрахунок глюкозного підживлення. Як відомо, глюкозу в такій кількості, як 297,4 г одразу вносити до середовища не можна, а слід окремими порціями. Якщо час культивування дорівнює 48 год, початкова кількість глюкози – 20 г/л, а підживлення відбувається з інтервалом у 8 годин, то: $(48 - 8) \div 8 = 5$ год. Тоді, через кожні 5 години буде вноситися підживлення в розмірі $(297,4 - 20) \div 8 = 35$ г/л глюкози.

Таким чином, кількість Карбону задовольняє потреби мікроорганізму для синтезу треоніну.

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

E. coli являє собою паличку довжиною близько 1 мкм та шириною 0,35 мкм. Однак, нещодавні дослідження показали, що деякі бактерії здатні вирости до 750 мкм у довжину із-за мутацій[16]. Найчастіше клітини розташовані поодинокі, спори не утворюють (Рис.3.1). Мають пілі(фімбрії) та джгутики, що розташовані перитрихіально (Рис.3.2). За Граммом фарбуються в рожевий колір, тобто є грам негативними. Добре культивуються на простих поживних середовищах. На м'ясо-пептонному агарі (МПА) утворюють невеличкі колонії з рівними краями, сіро-білого кольору. В рідких середовищах при рості можна побачити помутніння, іноді – осад [17].

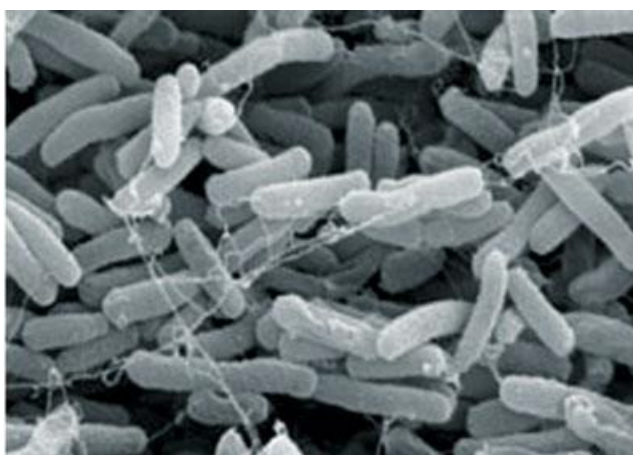


Рис.2.1. *E. coli* під електронним мікроскопом [17].

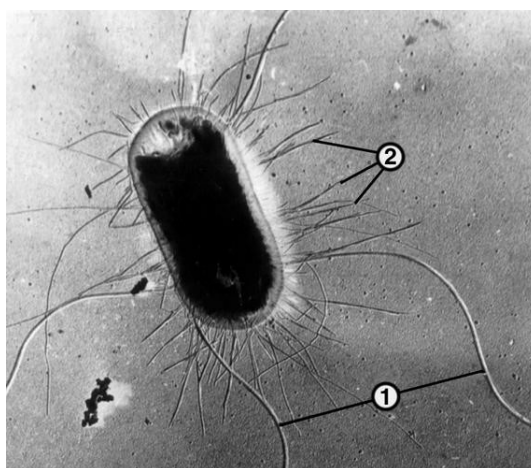


Рис.2.2. Електронна мікрофотографія клітини кишкової палички: 1 – джгутики, 2 – пілі [17].

Escherichia coli є факультативним аеробом(здатна до дихання в присутності кисню та до бродіння за його відсутності) та здатна активувати або пригнічувати метаболічні процеси в залежності від рівня кисню ,ауксотроф по ізолейцину [16,17]. Оптимальною температурою є 35-37°C. Досить стійкі до зовнішніх умов. Так, за 60°C гинуть через 15 хв, а за 100° – одразу. Кишкова паличка складається приблизно з 55% білка, 25% нуклеїнових кислот, 9% ліпідів, 6% клітинної стінки, 2,5% глікогену та 3% інших метаболітів, що є важливим для біотехнологічних досліджень, оскільки дослідження потоку вуглецю та зміни в ньому допомагають покращити метаболічний шлях чи створити новий[16]. В ґрунті чи воді живуть декілька місяців, в молоці більше 30 діб, а в дитячих сумішах більше 3-х місяців. Пряме сонячне світло викликає загибель бактерій вже через декілька секунд. Чутливі до дезінфікуючих речовин та антибіотиків, проте, дуже швидко виробляють імунітет до таких речовин за рахунок R-плазмід [17].

E. coli не мають фермента цитохромоксидазу, проте здатні зброджувати лактозу до кислоти та газу, та утворювати індол на середовищі с триптофаном[18].

Також, виявлена здатність продукувати ряд ендо- та екзотоксинів. Найбільш вивченими і маючими значення є екзотоксини термолабільний (LT), що викликає діарею, ьрмостабільний токсин (ST) може модулювати вроджені імунні реакції, шигаподібний токсин(Stx) здатен викликати імунну відповідь, апоптоз чи аутофагію [19].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Escherichia coli* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [21].

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Proteobacteria*

Клас – *Gammaproteobacteria*

Родина – *Enterobacteriaceae*

Рід – *Escherichia*

Вид – *Escherichia coli*

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

Треонін – амінокислота, що використовується як добавка в комбікормах для курчат-бройлерів.

Виробництво м'яса птиці у 2022 році склало близько 1,27 млн тонн, що на 8% менше, ніж роком раніше[22]. Так, в Україні за офіційними даними Держстату у 2022 р. споживали 53,1 кг м'яса на 1 особу, з яких м'ясо птиці складало 26 кг або 49%[23,24].

На жаль, для задоволення в потребах для комбікормів треонін необхідно імпортувати з інших країн, так як в Україні виробництво амінокислот майже відсутнє.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Треонін додають до комбікормів курчат-бройлерів в різній кількості на різних етапах розвитку (Таблиця 1.1). Так, курча готове до забиття вже на 40-43 добу, коли досягає в вазі 2,5-2,8 кг.

Таблиця 3.1[3]

Потреба в треоніні залежно від доби розвитку курчат

Доба	Жива маса, г	Добове споживання корму, г	Вміст треоніну в кормі, г
1	2	3	4
0-10	261	10	0,042
11-20	774	100	0,72
21-30	1565	168	1,2
31-40	2558	200	1,44

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК			
Розроб.		Нікандрова Д.А.			РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Воронцов О.О.					4	
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

За даними Державної служби статистики виробництво м'яса птиці у 2022 році склало близько 1,27 млн тонн. В Україні на 2022 рік проживало 43,79 млн українців, з яких, згідно джерелу [25] 4,5 млн є вегетаріанцями і ще 800 тис. є веганами. Якщо враховувати, що кожна людина в Україні споживає 26 кг курячого м'яса, то потреба в ньому дорівнює $(43,79-5,3)*26=1\ 000\ 740$ тонн, тобто українці споживають приблизно 1 млн тонн курятини щорічно, все інше в середньому йде на експорт до Нідерландів, Саудівської Аравії та інших країн.

Треонін до комбікормів додають в різній кількості залежно від доби вирощування курчат, збільшуючи кількість приблизно кожні 7-9 днів.

Розрахуємо, скільки потрібно треоніну для забезпечення здорового приросту маси на протязі усього циклу вирощування курча(40 днів). Виходячи з даних таблиці 1.1 кількість треоніну дорівнює 34 г на одну голову(2,6 кг).

Якщо одна людина в Україні потребує 26 кг курячого м'яса в рік, розрахуємо кількість голів. Вихід м'яса при забої птиці — 61,4; субпродукти — 8,5; жир — 1,8; голова й ноги — 7,5; пух, пір'я — 6,0; кров технічна — 4,2; сировина для кормової продукції — 7,5; втрати й відходи — 3,1. Одне курча 2,6 кг, то кінцевий вихід м'яса дорівнює 1,56 кг. Тобто, на один кг куриці необхідно $34\text{г}/1,56=21,6$ г треоніну, тобто на задоволення потреб українців в курячому м'ясі необхідно $1\ 000\ 740*0,0000218/0,001=21816132$ кг треоніну в рік. Це дуже велика кількість сировини, тож, порахуємо, скільки треоніну необхідно виготовити для забезпечення приблизно 1% від усієї суми, тобто кількість необхідного треоніну становить 218 161 кг на рік.

М'ясне виробництво, а особливо м'ясо птиці, є однією з провідних галузей виробництва в Україні, на відміну від виробництва треоніну, що надходить з таких країн як Китай, Німеччина та інші.

Оскільки вихід треоніну при культивуванні *Escherichia coli* P 2.1 -2901A ptsG (концентрація у культуральній рідині) дорівнює 121 г/л= 121 кг/м³л, то розрахуємо об'єм культуральної рідини за рік[26]:

$$V_{\text{кр}}^{\text{річ}}=218\ 161 /121 = 1\ 802\ \text{м}^3.$$

Окрім цього, нам необхідно врахувати втрати, які можуть виникнути в процесі виробництва, вони становлять 30%, отже, з урахуванням втрат річний об'єм культуральної рідини становитиме:

$$V_{\text{кр}}^{\text{річ}} = 1\,802 + 1\,802 \times 0,3 = 2\,342 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Приймаємо кількість робочих днів на рік – 300.

Ефективний фонд робочого часу $Neф.$ = $300 \times 24 = 7200$ год.

Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 48 + 14 = 62 \text{ (год)}, \text{ де}$$

$T_{\text{ф}}$ – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{\text{др}}$ – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (4 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (1 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість циклів за рік становитиме:

$$n_{\text{ц}} = \frac{Neф}{T_{\text{цф}}} = \frac{7200}{62} = 116$$

Об'єм культуральної рідини, який треба одержати за цикл:

$$V_{\text{кр}}^{\text{н}} = V_{\text{кр}}^{\text{річ}} / n_{\text{ц}} = 2\,342 / 116 = 20,19 \text{ м}^3 \quad 144/116 = 1,24 \text{ м}^3$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера $V_{\text{пф}}$

$$V_{\text{пф}} = 20,19 / 0,6 = 33,65 \text{ м}^3$$

З таблиці обираємо найближчий об'єм – 40 м³.

6. Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{\text{уз}}$, частка

$$K_{\text{уз}} = V_{\text{рф}} / V_{\text{гф}} = 20,19 / 40 = 0,5$$

Перевірене значення $K_{\text{уз}}$ відповідає вибраному діапазону для ферментера з аерацією - 0,5 - 0,65

Обираємо ферментер об'ємом 40 м³ з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{з}} = 0,6$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Для вирощування продуцентів треоніну використовують ферментери загальним об'ємом 40 м^3

Визначаємо кількість стадій підготовки посівного матеріалу, для приготування $20,19 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Кількість посівного матеріалу становить близько 10 % від загального об'єму поживного середовища.

1) Для приготування $20,19 \text{ м}^3$ культуральної рідини, потрібно: $20,19 \times 0,1 = 2,019 \text{ м}^3$ посівного матеріалу. Таку кількість посівного матеріалу можна приготувати у ферментері об'ємом 4 м^3 .

2) Щоб приготувати $2,019 \text{ м}^3$ культуральної рідини, потрібно: $2,019 \times 0,1 = 0,2019 \text{ м}^3$ посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна приготувати у ферментері об'ємом $0,4 \text{ м}^3$.

3) Щоб приготувати $0,2019 \text{ м}^3$ культуральної рідини, потрібно: $0,2019 \times 0,1 = 0,02019 \text{ м}^3$ ($20,19 \text{ л}$) посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна приготувати у ферментері об'ємом $0,04 \text{ л}$.

4) Щоб приготувати $20,19 \text{ л}$ культуральної рідини, потрібно: $20,19 \times 0,1 = 2,019 \text{ л}$ посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна приготувати у ферментері об'ємом 4 л .

5) Щоб приготувати $2,019 \text{ л}$ культуральної рідини, потрібно: $2,019 \times 0,1 = 0,2019 \text{ л}$ посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна отримати при вирощуванні у колбах на качалках.

Таким чином, процес підготування поживного середовища проходитиме у п'ять етапів, шостим етапом буде сам процес біосинтезу.

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

4.1. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Біологічний агент *Escherichia coli* здатен використовувати як джерело вуглецю глюкозу, вона ж і є основним джерелом. Також, бактерія здатна зброджувати лактозу, мальтозу, галактозу та арабінозу [17,18]. Схему метаболізму глюкози наведено згідно даних KEGG [20].

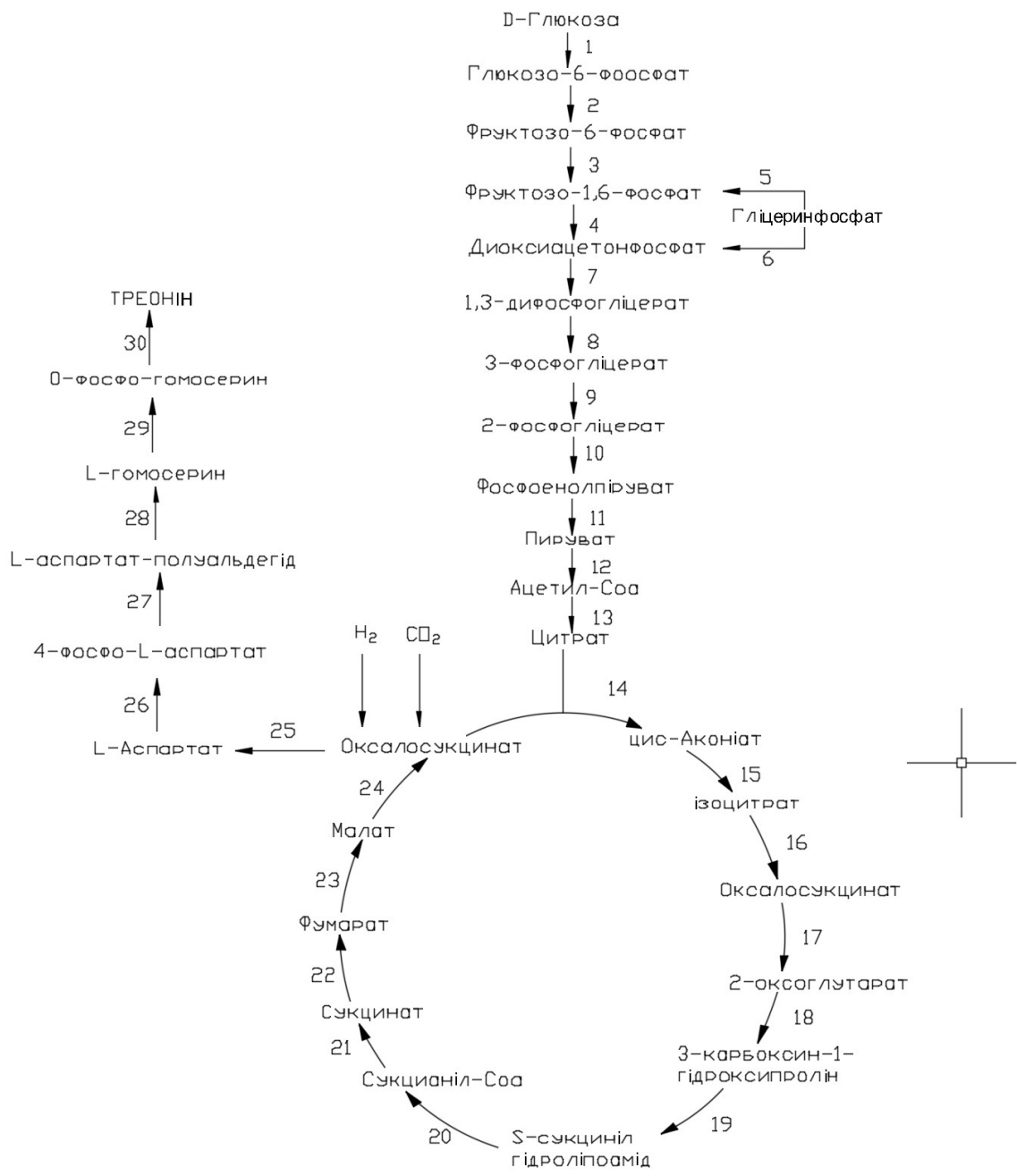
Схема біотрансформації ростового субстрату в цільовий продукт

Ферменти:

1,2 - глюкозо-специфічний фермент (КФ. 2.7.1.199); 3 – глюкоза-6-фосфатізомераза(КФ. 5.3.1.9); 4 – 6-фосфоглюкофруктокіназа (КФ. 2.7.1.11)/ фруктозо-1,6-дифосфотаза (КФ. 3.1.3.11); 5 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ. 4.1.2.13); 6 – триозофосфатізомераза (КФ. 5.3.1.1); 7 – гліцеральальдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ. 1.2.1.12); 8 - фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 9 – 2,3-дифосфогліцерат залежна фосфогліцератмутаза (КФ. 5.4.2.11)/ 2,3-дифосфогліцерат незалежна фосфогліцератмутаза (КФ. 5.4.2.12); 10 – енолаза (КФ. 4.2.1.11); 11 – піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40).

12- флаводоксиноксидоредуктаза(КФ. 1.2.7.1);13 - цитратсинтаза (КФ. 2.3.3.1); 14, 15 - аконіататгідратаза (КФ. 4.2.1.3); 16,17 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ. 1.1.1.42); 18 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа(КФ. 1.2.4.2); 19, 20 – дигідороліполтранссукцинілаза (КФ. 2.3.1.61); 21 – бута-сукциніл-СоА-синтаза (КФ. 6.2.1.5); 22 – фумаратредуктаза (КФ. 1.3.5.4)/(КФ. 1.3.5.1); 23 – фумаратгідротаза (КФ. 4.2.1.2); 24 – малатдегідрогеназа (КФ. 1.1.5.4); 25 - аспаратамінотрансфераза (КФ. 2.6.1.1); 26 - гомосериндегідрогеназа (КФ. 1.1.1.3); 27 – аспаратполуальдегід-дегідрогеназа (КФ. 1.2.1.11); 28 – біфункціональна аспартокіназа (КФ. 2.7.2.4); 29 – гомосеринкіназа (КФ. 2.7.1.39); 30 – треонінсинтаза (КФ. 4.2.3.1).

					НУХТ БТЕК			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Нікандрова Д.А.			РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Воронцов О.О.					2	
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						



РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування продуценту може здійснюватися глибинним, або поверхневим способами, також виділяють аеробний та анаеробний способи. Культивування треоніну бактерією *Escherichia coli* відбувається за температури 30-37°C та за нейтрального рН. При таких умовах стає можливим потрапляння сторонньої мікрофлори і її розвиток (контамінація). Для запобігання цього доцільно обрати глибинне культивування, так як при такому способі можливо забезпечити асептичні умови, а також, як того потребує мікроорганізм, здійснювати підживлення. Для асептичних умов необхідним є стерилізація комунікацій, обладнання, поживного середовища, піногасників, а також аераційного повітря, адже синтез треоніну відбувається за аеробних умов. Це є дуже важливим фактором, адже синтез треоніну відбувається одночасно з ростом біомаси і після зупинки її росту синтез треоніну сповільнюється і поступово припиняється[9]. Для культивування *E.coli* та отримання великої кількості треоніну(більше 100 г/л) необхідна висока концентрація субстрату (джерела вуглецю). Задля попередження осмотичного шоку, одразу вносити високу концентрацію вуглецю(глюкози) не можна, тому обираємо культивування з підживленням. Культивування кишкової палички для синтезу треоніну відбувається за аеробних умов, тому у ферментера повинен бути присутній барбатер для подачі стерилізованого чистого повітря, а також датчики рО₂. Для збільшення поверхні контактування фаз та покращення масообмінних процесів біосинтез відбувається при швидкості обертання перемішуючого пристрою до 220 об/хв.

					НУХТ БТЕК			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Нікандрова Д.А.			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Воронцов О.О.					9	
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Так як бактерії *E.coli* досить малі та не утворюють міцелій, оберемо звичайну лопатеву мішалку, яка забезпечить високу швидкість масопередачі кисню і економію потужностей. Сталу температуру в ферментері забезпечує сорочка, тому вона повинна бути присутній, а також датчик температури. До поживного середовища під час культивування не вносять піногасник, тому ферментер має бути обладнаний механічними піногасником. Обов'язковим є присутність датчика рН. Хоча культивування й проходить при нейтральному рН, але стерилізація і приготування поживного середовища відбувається в ферментері.

Усім зазначеним характеристикам відповідає ферментер біореактор BioFlo Pro від німецької фірми New Brunswick Scientific [27].

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

При культивуванні *E.coli*, які є аеробами, для їх нормального розвитку в процесі культивування необхідним є стерильне повітря в достатній кількості. Повітря після культивування може містити спори чи клітини мікроорганізму, що культивується, тому необхідним є очищення перед викидом у навколишнє середовище. Таким чином, очищається як повітря, що подається, так і використане повітря.

Стерилізація повітря через фільтрування за допомогою волокнистих або зернистих фільтруючих матеріалів є широко використовуваною технікою у мікробіологічній промисловості.

Всі фільтруючі матеріали можна розділити на три групи: матеріали для попереднього очищення повітря, матеріали для стадії грубого очищення (головні фільтри) і матеріали для стерилізації повітря (індивідуальні фільтри).

Стадія попереднього очищення або знепилювання повітря: На етапі передочищення або знепилювання повітря відбувається видалення основної маси великих часток пилу, розмір яких становить 5-10 мікрометрів. В фільтрах для передочищення використовуються різні фільтруючі матеріали, такі як багат шарові дротяні сітки, наповнення зі стружок металів, полімерні матеріали, грубі мінеральні і синтетичні волокна, а також губчасті фільтри. До цього класу

фільтрів включають масляні або вісцинові фільтри з промасленими металевими сітками. Масло сприяє осіданню часток пилу на фільтрі і їхньому утриманню.

Попередня очистка повітря в головному фільтрі: Очищення повітря від пилу та мікроорганізмів (частинки розміром більше 1 мікрметра) відбувається у основному фільтрі. Цей фільтр має форму циліндричної ємності із сферичним дном та кришкою. Усередині фільтра розташовані дві решітки, між якими знаходиться фільтруючий матеріал. Заміну матеріалу для фільтрування проводять двічі на рік. У випадку забруднення, зволоження або інфікування фільтруючого матеріалу, виконують його позачергову заміну.

Стадія тонкого очищення повітря: Використовують індивідуальні фільтри, які встановлюються перед кожним ферментатором і мають забезпечувати очищення повітря від часток діаметром 0,3 мікрметра на рівні 99,999%. Специфічним вимогам до фільтруючих матеріалів, застосовуваних на даній стадії очищення, є необхідність періодичної стерилізації їх гострою парою разом із усім обладнанням технологічної лінії. Фільтруючі матеріали, які використовуються на етапі тонкого очищення, поділяються на різні групи, включаючи тонковолокнисті матеріали у формі матів, картону та паперу, зернисті тверді фільтруючі перегородки (керамічні, металокерамічні, з полімерних матеріалів) і мембранні фільтри. У промислових фільтрах для тонкого очищення повітря найчастіше використовуються тонковолокнисті фільтруючі матеріали.

Після компресорів повітря повинно надходити у холодильник, адже при стисненні дуже нагрівається. Повітря охолоджують до температури нижче крапки роси задля видалення зайвої вологи. Щоб вирівняти тиск та забезпечити рівномірне надходження повітря на фільтри, перед ними встановлюють ресивер, інколи систему невеликих посудин. [28]

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Щоб обрати мийний та дезінфікувальний засіб, необхідно врахувати його вартість та витримати на оброблюванню потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м² затрачається 100 мл робочого розчину мийного

чи дезинфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 № 502).

Обладнання та комунікації необхідно мити після кожного виробничого циклу. Так, підлогу миють кожного робочого дня; стіни, вікна, та двері раз на місяць.

Каустична сода (натрій гідроксид):

Переваги: Каустична сода може бути ефективною для очищення органічних залишків, які часто зустрічаються в біотехнологічних комунікаціях. Вона добре розчиняє жири, гідролізує білки, розщеплює вуглеводи.

Недоліки: Однак, важливо бути обережним у використанні, оскільки каустична сода може мати корозійний ефект на деякі матеріали та потребує врахування впливу на обладнання та безпеку працівників(відноситься до високонебезпечних речовин).

Кальцинована сода (кальцій гідроксид або вапняк):

Переваги: Кальцинована сода може використовуватися для нейтралізації кислот та дезінфекції біотехнологічних комунікацій. Вона також може мати властивості відбілювання.

Недоліки: Однак, для більш забруднених поверхонь цей засіб може бути не таким ефективним, також, засіб відносять до третього класу небезпеки за за ГОСТ 2263-79.

Хлорне вапно (вапняковий хлорид):

Переваги: Хлорне вапно є дезінфікуючим засобом, що може бути корисним для контролю мікроорганізмів у біотехнологічних системах.

Недоліки: Важливо враховувати його можливий вплив на обладнання та пристосування, а також врахувати, що він може взаємодіяти з іншими хімічними речовинами[29,30].

«Дезактін» - це засіб для дезінфекції, який використовується для очищення і миття твердих поверхонь у приміщеннях, а також для обробки предметів, обладнання та комунікацій. Препарат представляє собою порошок від білого до злегка жовтого кольору і має помірний запах хлору. Робочі розчини «Дезактіну»

не завдають шкоди оброблюваним поверхням, не залишають забруднення на обладнанні, легко змиваються і не залишають нальоту[30].

«Хлорантоїн» є дезінфекційним засобом із миючим ефектом, який має залишається стабільним при зберіганні протягом трьох років (згідно з ТУ У 22902465.004-95). Препарат представляє собою сипучий порошок світлого кольору із слабким запахом хлору. Антимікробна дія включає бактерицидну, туберкульозну, спороцидну та фунгіцидну властивості (в тому числі відносно кандидозів, дерматомікозів і цвілевих грибів). Важливо відзначити [30].

Висновок: ці два засоби належать до четвертого рівня небезпеки, що означає, що їх можна використовувати за присутності персоналу. Виходячи

Рекомендується чергувати дезінфікуючі та антисептичні засоби кожні 1-3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких варіантів мікроорганізмів [29].

Висновок: вибір оптимального моючого засобу залежить від конкретних потреб та вимог біотехнологічних систем. Каустична сода може бути більш вдалим вибором для видалення органічних забруднень, але потребує обережного використання. Кальцинована сода та хлорний вапняк можуть бути менш агресивними, але менш ефективними для важких забруднень. При виборі слід враховувати матеріали комунікацій, вплив на екосистему та технічні особливості системи. Також важливо дотримуватися безпеки та стандартів використання хімічних засобів у біотехнологічних процесах. Згідно з даними про вартість та ефективність, можемо зробити висновок, що хлорне вапно є дешевшим та більш дієвим засобом(Таблиця 2.1). Серед дезактину та хлорантоїну обираємо хлорантоїн, він є більш дешевшим за однакового використання.

Порівняння миючих засобів для комунікацій та підлоги

Назва де-засобу та вироб-ник.	Склад	Спектр дії	Кількість для обробки 1 м ² , л	Термін зберігання.	Степінь безпеки
1	2	3	4	5	6
Каустична сода, ТОВ «РЕКТЕ», Польща	NaOH 99% Na ₂ CO ₃ 0,7% NaCl 0,1 % Fe ₂ O ₃ 0,01%	Використовують для миття підлоги та комунікацій. Також використовують для знезараження приміщень.	0,5	1 рік з моменту виготовлення	Відноситься до 2 класу небезпеки, тому при використанні необхідно дотримуватися запобіжних заходів.
вартість 49 грн/кг					
Кальцинована сода, Продавець ООО "Харьковпромхим"	воду (<1,5 %); натрій хлористий (<0,5 %); сульфати (<0,1 %); кальцій (<0,1 %); магній (<0,1 %); залізо (<0,004 %).	Використовують для миття підлоги та комунікацій. Також використовують для знезараження приміщень.	0,5	2 року з моменту виготовлення	Відноситься до 2 класу небезпеки, тому при використанні необхідно дотримуватися запобіжних заходів.
вартість 40 грн/кг					
	Ca(ClO) ₂ , CaCl ₂ і Ca(OH) ₂	Використовується для обробки і дезінфекції поверхонь приміщень	0,5	3 роки з моменту виготовлення	Відноситься до 2 класу небезпеки, тому при використанні необхідно дотримуватися запобіжних заходів.
вартість 38 грн/кг					

Порівняння миючих засобів для ферментерів і біореакторів

Назва деззасобу та вироб-ник.	Склад	Спектр дії	Необхідна кількість для обробки 1 м ²	Термін зберігання.	Степінь безпеки
1	2	3	4	5	6
Дезактин, ООО «Делана» (Україна)	Дихлорангін - 21,0-23,0; 5,5-диметилгідантоїн - 12,4-16,4; диспергатор - 9,0-12,0; аніонні поверхневоактивні речовини - 3,2-5,0; інгібітор корозії 10,0	Засіб володіє бартеричидною (в т.ч. туберкулоцидні), віруліцидні (включаючи парентеральні і вірусні гепатити, ВІЛ-інфекцію, ротавіруси), фунгіцидні (в т.ч. гриби роду <i>Candida</i>) властивості	Норма витрати 100 мл робочого розчину на 1 м ² оброблюваної площі. Проти бактеріальних і вірусних інфекцій в 0,1-0,2% при експозиції 60 хв, грибкових інфекціях і туберкульозі в 1% при експозиції 60-90 хв.	Термін зберігання - 3 роки. Термін зберігання роботи розчинів - до 3-х днів.	Належать до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки) при введенні в шлунок та до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас небезпеки).
Вартість – 0,389 грн/л(0,1% розчин)					
Хлорантоїн, виробник "Новохім"(Україна)	1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн (дихлорангін) - 21,5-23,5 (діюча речовина), 5,5-диметилгідантоїн - 12,5-16,5; диспергатор - 9,0-12,5; Аніонні поверхневоактивні речовини - 3,2-5,0; Інгібітор корозії - до 10,0;	проявляє високу антимікробну активність стосовно грамнегативних і грампозитивних бактерій(включаючи збудників туберкульозу), вірусів (включаючи збудників поліомієліту, рота- і коронавірусної	Для дезінфекції поверхні - 0,1% - 60 хв.; 0,2% - 30 хв. Для інструментів (дезінфекція + передстерилізація йне очищення) - 0,2% - 60 хв.; 0,5% - 30 хв.	36 місяців у вигляді порошку, 14 днів у вигляді розчину	Належать до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки) при введенні в шлунок та до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас небезпеки).
Вартість – 0,350 грн/л(0,1% розчин)					

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Спочатку відбувається вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, необхідний об'єм культуральної рідини – 0,2019 л або 201,9мл. На цьому етапі до середовища ще не додають бетаїн, тому наважку глюкози 9,6 г та 0,48 г дріжджевого екстракту змішують в колбі на 750 мл з додаванням 50 мл води. Стерилізують цю композицію при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв) аби уникнути карамелізації, оскільки дані компонент є термолабільними. Солі: натрію цитрат, калій фосфорнокислий одно заміщений, амоній фосфорнокислий двозаміщений стерилізують в автоклаві при температурі $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, тиску 0,15 атм. Протягом 40 хв. Для запобігання випадання осаду, що може утворитися при взаємодії фосфорних солей з катіонами магнію, слід магній сульфат семи водневий стерилізувати окремо, при температурі $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, тиску 0,15 атм протягом 40 хв [31].

На наступній стадії до поживного середовища додається бетаїн до складу першої композиції з глюкозою та дріжджовим екстрактом, які стерилізуються в автоклаві 1 л при температурі $112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв). Розчин солей вже можна стерилізувати разом в інокуляторі за рахунок додавання розчину HCl задля запобігання утворення осаду. Для цього передбачаємо реактор-змішувач об'ємом 3 л перед інокулятором.

Для приготування 20,19 л середовища, в реактор-змішувач об'ємом 40 л поміщаємо наважку 0,48 кг глюкози, 0,072 кг екстракту дріжджів та 0,012 бетаїну та заливають водою 4,8 л. Розчин солей стерилізуємо безпосередньо у посівному апараті місткістю 20 л, попередньо довівши значення рН до 4,5 для попередження випадіння осаду.

Для приготування 201,9 л середовища, в реактор-змішувач об'ємом 201,9 л поміщаємо наважку 4,8 кг глюкози, 0,72 кг екстракту дріжджів та 0,12 бетаїну та заливають водою 48 л. Розчин солей стерилізуємо безпосередньо у посівному апараті місткістю 60 л, попередньо довівши значення рН до 4,5 для попередження випадіння осаду.

Для приготування 2019 л середовища, в реактор-змішувач об'ємом 4000 л поміщаємо наважку 48 кг глюкози, 7,2 кг екстракту дріжджів та 1,2 бетаїну та заливаємо водою 480 л. Розчин солей стерилізуємо безпосередньо у посівному апараті, попередньо довівши значення рН до 4,5 для попередження випадіння осаду.

Для виробничого ферментера об'єм середовища становить 20,19 м³. З економічної точки зору доцільніше для стерилізації такої кількості поживного середовища застосовувати установку безперервної стерилізації. Її використання дозволяє зменшити витрати води, пари, теплової енергії і скоротити час обробки поживного середовища. Розчин усіх компонентів поживного середовища (глюкоза, дріжджовий екстракт, бетаїн) готується в одному реакторі-змішувачі.

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
3-1	Збірник для приготування розчину дезактину	1	Збірник для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Н-1	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
3-2	Збірник для приготування розчину NaOH	1	Збірник для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Н-2	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
3-3	Збірник для приготування розчину HCl	1	Збірник для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Н-3	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF

НУХТ БТЕК				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
		Нікандрова Д.А.		
		Воронцов О.О.		
		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання				
			Літ.	Арк.
			6	Акрушів
Кафедра БТМ				

З-4	Збірник для приготування підживлюючого розчину	1	Збірник для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Н-4	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-1	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр F 0010 DF Матеріал картриджа – керамічний. Пропускна здатність - 1170 л/хв Різьба, вхід / вихід - 1/2 дюймаЕ=90%. Виробник “ОМІ” (Італія)
К-1	Компресор	2	Компресор 10HP 7.5KW Потужність - 1 м³/хв Робочий тиск – 13 атм Виробник – Італія
Т-1	Теплообмінник-охолоджувач	1	Титановий теплообмінник-охолоджувач (нагрівач) МНТА-15 Продуктивність 47 кВт Виробник – Китай
Р-1	Ресивер	1	Ресивер ARIACOM SV 200-11P Об’єм – 200 л Робочий тиск – 11 атм Виробник – “ARIACOM” (Італія)
Т-2	Теплообмінник-нагрівач	1	Пластинчастий теплообмінник розбірний теплової потужності від 5 кВт до 30 МВт. Виробник - Тепло-Поліс, Україна.
Ф-2	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтри тонкої очистки типу ХЕПА. Виробник - ВЕНТ-ФІЛЬТР, Україна.

Н-5	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
Р-1	Реактор-змішувач	1	Ємність для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Н-6	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
Р-2	Реактор-змішувач	1	Ємність для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
І-1	Інокулятор	1	Інокулятор для розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Ф-3	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтри індивідуальної очистки типу F7-F9. Виробник - Alter Air, Україна.
Р-3	Реактор-зішувач	1	Ємність для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Н-7	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF

Р-4	Реактор-змішувач	1	Ємність для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Н-8	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
І-2	Інокулятор	1	Інокулятор для розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Ф-4	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтри індивідуальної очистки типу F7-F9. Виробник - Alter Air, Україна.
Р-5	Реактор-зішувач	1	Ємність для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Н-9	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
Р-6	Реактор-змішувач	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
Н-10	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF

I-3	Інокулятор	1	Інокулятор для розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
Ф-5	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтри індивідуальної очистки типу F7-F9. Виробник - Alter Air, Україна.
I-4	Інокулятор	1	Інокулятор для розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
P-7	Реактор-змішувач	1	Ємність для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
H-11	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
P-8	Реактор-зішувач	1	Ємність для приготування розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.
H-12	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
I-5	Інокулятор	1	Інокулятор для розчинів, обладнаний мішалкою, сосрочкою та датчиками тиску. Виробник - Europrod mash, Україна.

Н-13	Насос	1	Відцентровий насос, AISI 304 насос нержавіючий. Продуктивність (max), 7.2 м.куб / год. Виробник - JEFF
Ф-6	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтри індивідуальної очистки типу F7-F9. Виробник - Alter Air, Україна.
ФР-1	Ферментер	1	Ферментер біореактор BioFlo Pro. Виробник - New Brunswick Scientific, Німечинна.

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми

Технологічна схема біосинтезу треоніну культивуванням *E. coli* представлена у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва являє собою підготовку виробничих приміщень, персоналу та технологічного устаткування.

ДР 1.1. Підготовка персоналу: весь персонал перед початком роботи забор'язан пройти медогляд. Робота проходить в спецодязі, з дотриманням усіх санітарних норм (миття рук та дезинфекція). Персол проходить навчання та інструктаж, без якого не буде допущено до роботи.

ДР 1.2 Підготовка приміщень: здійснюється завдяки щоденному(миття та дезинфекція устаткування та полів) та генеральному прибиранню. В останнє входить миття та дезинфекція всіх поверхонь(в тому числі, стіни, підлога) та проводиться один раз на місяць. Усе прибирання здійснюється в спеціальному одязі.

ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття обладнання, ополіскування технічний огляд, перевірка герметичності, стерилізація

ДР 1.4. Приготування та стерилізація розчину NaOH (режим стерилізації: 141 °С, 40 хв).

ДР 1.5. Приготування 6-% розчину HCl.

Опис технологічного процесу.

ДР 2. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 2.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК			
Розроб.		Нікандрова Д.А.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Воронцов О.О.					10	
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 201,9 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 201,9 г середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
глюкоза	40	8,0		50,475
			I	
Дріжджовий екстракт	2	0,40		
Вода		42		
(NH ₂) ₂ SO ₄	15	3,0	II	100,95
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	0,20		
FeSO ₄	0,02	0,004		
Вода		97,7		
KN ₂ PO ₄	2	0,40	III	25,2375
Вода		24,8		
CaCo ₃	20	4,0	IV	25,2375
Вода		21,2		
Разом				201,9

ДР 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції I.

На технічних вагах зважують 8 г глюкози, 0,40 г екстракту дріждів. Наважку поміщають у колбу об'ємом 750 мл, доливають 42 мл питної води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують при температурі 112 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 30 хв.

ДР 2.1.2. Приготування та стерилізація композиції II.

На технічних вагах зважують 3,0 г сульфат амонію($(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$), 0,20 г магній сульфату(MgSO_4),). В якості FeSO_4 та MnSO_4 готуємо 1% розчин солей, використовуючи 0,5 мг FeSO_4 та 0,5 мг MnSO_4 , які додаємо в колбу на 1 л і додаємо воду до мітки. Наважки переносять у колбу об'ємом 1 л, доливають 97,7 мл води питної. Закривають колбу ватномарлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 2.1.3. Приготування та стерилізація композиції III

На технічних вагах зважують 0,40 г дигідрофосфату калію (KH_2PO_4), переміщують в колбу і додають 24,8 мл води. Закривають колбу ватномарлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 2.1.4. Приготування та стерилізація композиції IV.

На технічних вагах зважують 4,0 г карбонат кальцію (CaCO_3), переміщують в колбу і додають 21,2 мл води. Закривають колбу ватномарлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C

ДР 2.2. Вирощування інокуляту в посівному апараті на 4 л

Таблиця 7.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,019 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2,019 л середовища, кг	Композиція	Композиція, л
глюкоза	20	0,04	I	0,67
Дріжджовий екстракт	3	0,006		
Бетаїн	0,5	0,001		
Вода		0,55		
Конденсат		0,067		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	0,004	II	1,35
FeSO_4	0,005	0,00001		
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,005	0,00001		

KH ₂ PO ₄	2	0,004	Продовження таблиці 7.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	0,04	
Вода		1,17	
Конденсат		0,135	
Разом			

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції I.

На технічних вагах зважують 0,04 кг глюкози, 0,006 кг екстракту дріжджів та 0,001 бетаїну. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 1 л, доливають 0,55 л питної води і стерилізують при температурі 112 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 30 хв.

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції II.

На технічних вагах зважують 0,04 кг сульфат амонію, 0,004 кг магній сульфату(MgSO₄), 0,004 дигідрофосфат калію(KH₂PO₄). В якості FeSO₄ та MnSO₄ готуємо 1% розчин солей, використовуючи 0,5 мг FeSO₄ та 0,5 мг MnSO₄, які додаємо в колбу на 1 л і додаємо воду мітки. Наважки переносять у ферментер об'ємом 3 л, доливають 1,17 л води. Стерилізують в ферментері при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 2.3. Вирощування інокуляту в посівному апараті на 40л

Таблиця 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 20,19 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 20,19 л середовища, кг	Композиція	Композиція, л
глюкоза	20	0,40	I	6,73
Дріжджовий екстракт	3	0,06		
Бетаїн	0,5	0,01		
Вода		5,58		
Конденсат		0,673		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2	0,04	II	13,46

FeSO ₄	0,005	0,0001	Продовження таблиці 7.3
MnSO ₄ •H ₂ O	0,005	0,0001	
KH ₂ PO ₄	2	0,04	
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	0,4	
Вода		11,63	
Конденсат		1,346	
Разом			20,19

ДР 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції I.

На технічних вагах зважують 0,4 кг глюкози, 0,06 кг екстракту дріжджів та 0,01 бетаїну. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 10 л, доливають 5,58 л питної води і стерилізують при температурі 112 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 30хв.

ДР 2.3.2. Приготування та стерилізація композиції II.

На технічних вагах зважують 0,4 кг сульфат амонію, 0,04 кг магній сульфату(MgSO₄), 0,04 дигідрофосфат калію(KH₂PO₄), 0,0001 кг ферум сульфату (FeSO₄) та 0,0001 кг магній сульфату (MnSO₄). Наважки переносять у ферментер об'ємом 25 л, доливають 11,63 л води. Стерилізують в ферментері при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 2.4. Вирощування інокуляту в посівному апараті на 0,4 м³

Таблиця 7.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 201,9 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 201,9 л середовища, кг	Композиція	Композиція, л
глюкоза	20	4,0	I	67,3
Дріжджовий екстракт	3	0,6		
Бетаїн	0,5	0,1		
Вода		55,8		
Конденсат		6,73		

MgSO ₄ ·7H ₂ O	2	0,4	II	Продовження таблиці 7.4 134,6
FeSO ₄	0,005	0,001		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,005	0,001		
KH ₂ PO ₄	2	0,40		
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	4,02		
Вода		116,31		
Конденсат		13,46		
Разом				201,9

ДР 2.4.1. Приготування та стерилізація композиції I.

На технічних вагах зважують 4 кг глюкози, 0,6 кг екстракту дріжджів та 0,1 бетаїну. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 100 л, доливають 55,8 л питної води і стерилізують при температурі 112 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 30 хв.

ДР 2.4.2. Приготування та стерилізація композиції II.

На технічних вагах зважують 4,02 кг сульфат амонію, 0,4 кг магній сульфату (MgSO₄), 0,4 дигідрофосфат калію (KH₂PO₄), 0,001 кг ферум сульфату (FeSO₄) та 0,001 кг магній сульфату (MnSO₄). Наважки переносять у ферментер об'ємом 250 л, доливають 116,31 л води. Стерилізують в ферментері при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 2.5. Вирощування інокуляту в посівному апараті на 4 м³

Таблиця 7.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2019 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2019 л середовища, кг	Композиція	Композиція, л
глюкоза	20	40,38	I	673
Дріжджовий екстракт	3	6,0		
Бетаїн	0,5	1,0		

Вода		558,25		
Конденсат		67,3		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2	4,0	II	1346
FeSO ₄	0,005	0,01		
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,005	0,01		
KH ₂ PO ₄	2	4,04		
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	40,38		
Вода		1162,92		
Конденсат		134,6		
Разом				2019

ДР 2.5.1. Приготування та стерилізація композиції I.

На технічних вагах зважують 40,38 кг глюкози, 6 кг екстракту дріжджів та 1 кг бетаїну. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 1 м³, доливають 558,25 л питної води і стерилізують при температурі 112 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 30хв.

ДР 2.5.2. Приготування та стерилізація композиції II.

На технічних вагах зважують 40,38 кг сульфат амонію, 4 кг магній сульфату(MgSO₄), 4 дигідрофосфат калію(KH₂PO₄), 0,01 кг ферум сульфату (FeSO₄) та 0,01 кг магній сульфату (MnSO₄). Наважки переносять у ферментер об'ємом 2,5 м³, доливають 1162,92 л води. Стерилізують в ферментері при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 2.6. Вирощування інокуляту в посівному апараті на 40м³

Таблиця 7.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 20 190 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 20190 л середовища, кг	Композиція
глюкоза	20	403,8	I

Дріжджовий екстракт	3	60,57	II
Бетаїн	0,5	10	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2	40,38	
FeSO ₄	0,005	0,1	
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,005	0,1	
KH ₂ PO ₄	2	40,38	
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	403,8	
Вода	16202,37		
Конденсат	3028,5		
Разом	20190		

ДР 2.6.1. Приготування та стерилізація середовища в УБС.

ДР 2.7. Змішування компонентів.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 3.1. Зберігання музейної культури *Escherichia coli* P 2.1 -2901Δ: запаяні пробірки з культурою зберігаються при -40°C.

ТП 3.2. Розморожування культури

ТП 3.2. Одержання культури на агаризованих середовищах:

Штами *Escherichia coli* з розмороженої культури висівали на чашках LB і культивували при 37 °C протягом 24 годин. МК контроль. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП.3.3. Вирощування інокуляту в пробірках.

Отриману культуру з ТП.3.2 *Escherichia coli* висівали скошене середовище LB в пробірках і культивували при 37 °C протягом 24 годин. МК контроль. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 3.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках.

З окремо розташованих колоній (від ТП 3.3) роблять пересів петлею в колби, що містить композиції I, II, III та IV (отриманих від Др 2.1.). Культивування проводили за рН 7, при 37 °С зі швидкістю 220 об/хв, 48 годин. МК контроль. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 3.5. Вирощування посівного матеріалу в посівних апаратах 4 л.

В інокулятор об'ємом 4 л, що містить композиції I об'ємом 0,67 л і II об'ємом 1,35 л (отриманих від Др 2.1.) вносять посівний матеріал 201,9 мл (від ТП 3.4) через засівний пристрій, після чого включають аерацію, перемішуючий пристрій (лопатева мішалка), в сорочку інокулятора подають пару та холодну воду для підтримки температури середовища. Культивування проводили за рН 7, при 37 °С зі швидкістю 220 об/хв, 48 годин. При чому, на цій стадії стає необхідним внесення 6% розчину соляної кислоти для забезпечення рН 4-4,5 при стерилізації компонентів, що входять до композиції II, для уникнення осаду.

ТП 3.6. Вирощування інокуляту в посівному апараті 40 л.

В інокулятор об'ємом 40 л, що містить композиції I об'ємом 6,73 л і II об'ємом 13,46 л (отриманих від Др 2.1.) вносять посівний матеріал 2,019 л (від ТП 3.5) через засівний пристрій, після чого включають аерацію, перемішуючий пристрій (лопатева мішалка), в сорочку інокулятора подають пару та холодну воду для підтримки температури середовища. Культивування проводили за рН 7, при 37 °С зі швидкістю 220 об/хв, 48 годин. При чому, на цій стадії стає необхідним внесення 6% розчину соляної кислоти для забезпечення рН 4-4,5 при стерилізації компонентів, що входять до композиції II, для уникнення осаду.

До культури додавали 40 г/л глюкози, коли концентрація глюкози становила менше 15 г/л.

ТП 3.7. Вирощування інокуляту в посівному апараті 400 л.

В інокулятор об'ємом 400 л, що містить композиції I об'ємом 67,3 л і II об'ємом 134,6 л (отриманих від Др 2.1.) вносять посівний матеріал 20,19 л (від ТП 3.6) через засівний пристрій, після чого включають аерацію, перемішуючий пристрій (лопатева мішалка), в сорочку інокулятора подають пару та холодну воду для підтримки температури середовища. Культивування проводили за рН 7, при 37

°C зі швидкістю 220 об/хв, 48 годин. При чому, на цій стадії стає необхідним внесення 6% розчину соляної кислоти для забезпечення рН 4-4,5 при стерилізації компонентів, що входять до композиції II, для уникнення осаду.

До культури додавали 40 г/л глюкози, коли концентрація глюкози становила менше 15 г/л.

ТП 3.8. Вирощування інокуляту в посівному апараті 4 м³.

В інокулятор об'ємом 4 м³, що містить композиції I об'ємом 673 л і II об'ємом 1346 л (отриманих від Др 2.1.) вносять посівний матеріал 201,9 л (від ТП 3.7) через засівний пристрій, після чого включають аерацію, перемішуючий пристрій (лопатева мішалка), в сорочку інокулятора подають пару та холодну воду для підтримки температури середовища. Культивування проводили за рН 7, при 37 °C зі швидкістю 220 об/хв, 48 годин. При чому, на цій стадії стає необхідним внесення 6% розчину соляної кислоти для забезпечення рН 4-4,5 при стерилізації компонентів, що входять до композиції II, для уникнення осаду. Через кожні 5 години вноситься підживлення в розмірі 35 г/л глюкози.

ТП 4. Виробниче культивування:

Вирощування інокуляту в посівному апараті 40 м³.

В ферментер об'ємом 40 м³, що містить композиції I об'ємом 6730 л і II об'ємом 13460 л (отриманих від Др 2.1.) вносять посівний матеріал 2019 л (від ТП 3.8) через засівний пристрій, після чого включають аерацію, перемішуючий пристрій (лопатева мішалка), в сорочку інокулятора подають пару та холодну воду для підтримки температури середовища. Культивування проводили за рН 7, при 37 °C зі швидкістю 220 об/хв, 48 годин. До культури додавали 40 г/л глюкози, коли концентрація глюкози становила менше 15 г/л.

ТП 4.1. Концентрацію амінокислот визначають методом ВЕРХ.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

Таблиця 8.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна Характеристика показника, що визначається
Кт 1.3.1 Миття обладнання та стерилізація	Температура миючого розчину, чистота. Тиск, температура пари,	Термометр технічний	Тиск визначається безперервно під час проведення операції	$T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,28\text{ МПа}$ т = 1 год, $t = 130^{\circ}\text{C}$ відсутність мікробіоти
Кт 1.4 Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH	Розчин NaOH	Годинник, термометр технічний	Температура визначається безперервно під час стерилізації,	$t = 40\text{ хв}$, $t = 141\text{ }^{\circ}\text{C}$,
Кт, Км 2.1.1 Приготування та стерилізація композиції I	Композиція I , температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час пастерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05\text{ МПа}$, т = 30 хв, $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіоти

					НУХТ БТЕК		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Нікандрова Д.А.			Літ.	Арк.	Акрівів
Перевір.		Воронцов О.О.				10	
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва					51		

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км 2.1.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний - ний контроль	Тиск визначається безперервно під час пастерилізації, мікробіологічний - ний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 40 хв, t = 131 °C, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.1.3 Приготування та стерилізація композиції III	Композиція III, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний - ний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний - ний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 40 хв, t = 131 °C, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.1.4 Приготування та стерилізація композиції IV	Композиція IV, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний - ний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний - ний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 40 хв, t = 131 °C, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.1 Приготування та стерилізація композиції I	Композиція I, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний - ний контроль	Тиск визначається безперервно під час пастерилізації, мікробіологічний - ний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 30 хв, t = 112 °C, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мк	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 40 хв, t = 131 °C, відсутність мікробіоти

Кт, Км 2.2.3 Приготування та стерилізація композиції III	Композиція III, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологіч - ний контроль	Тиск визначається безперервно під час пастерилізації, мікробіологіч - ний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 30 хв, t = 112 °C, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.3.1 Приготування та стерилізація композиції I	Композиція I, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологіч - ний контроль	Тиск визначається безперервно під час пастерилізації, мікробіологіч - ний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 30 хв, t = 112 °C, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.3.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 40 хв, t = 131 °C, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.3.3 Приготування та стерилізація композиції III	Композиція III, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологіч - ний контроль	Тиск визначається безперервно під час пастерилізації, мікробіологіч - ний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 30 хв, t = 112 °C, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3 Одержання робочої культури	Поживне середовище, Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Мікроскопіювання – після вирощування культури на чашках петрі	t = 37 °C, τ=24 год

Кт, Км 3.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках та посівному апараті	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури в колбах	t = 37 °C, τ=12 год, ω = 220 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.3 Вирощування інокуляту в посівному апараті на 4 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів, рН мікробіологічна чистота культури	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, Датчик рН мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання після вирощування в інокуляторі	t = 37 °C, τ=48 год, ω = 220 об/хв, рН=7 відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.3 Вирощування інокуляту в посівному апараті на 40 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів, рН мікробіологічна чистота культури	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, Датчик рН мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання після вирощування в інокуляторі	t = 37 °C, τ=48 год, ω = 220 об/хв, рН=7 відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.3 Вирощування інокуляту в посівному апараті на 400 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів, рН мікробіологічна чистота культури	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, Датчик рН мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання після вирощування в інокуляторі	t = 37 °C, τ=48 год, ω = 220 об/хв, рН=7 відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 3.4.	Поживне	Манометр	Температура і	t = 37 °C, τ=48

Вирощування культури у посівному апараті 4 мЗ	середовище в інокуляторі, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, рН мікробіологічна чистота культури	технічний, годинник, термометр технічний, Датчик рН Датчик кисню мікробіологічний контроль	швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, підтримання рівня кисень автоматично Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в інокуляторі	год, $\omega = 220$ об/хв, рН=7 рівень кисню 30% відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 4 Виробниче культивування	Поживне середовище в ферментері, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, рН мікробіологічна чистота культури	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, Датчик рН Датчик кисню мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, підтримання рівня кисень автоматично Мікроскопіювання – під час вирощування культури у ферментері Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	t = 37 °C, $\tau=48$ год, $\omega = 220$ об/хв, рН=7 рівень кисню 30% Культивували доки густина не відповідала 1,7 г/л клітин відсутність сторонньої мікробіоти

8.2. Мікробіологічний контроль

Проби готового посівного матеріалу або культуральної рідини розсіюють методом виснажувального штриха на поживне середовище в чашках Петрі. Для визначення дріжджів проводять пряме мікроскопіювання з підрахунком колоній.

Пряме мікроскопіювання: мікроскопіювання зразків із культуральної рідини[32]. При відсутності посторонньої мікрофлори на МПА кишкова паличка утворює середнього розміру колонії, сіро-білого кольору, блискучі та гладенькі

краплинки з рівними краями(Рис. 1.а). В мікроскопі ми повинні побачити невеликі палички, що розташовані поодинокі, а іноді попарно [17].



Рис.8.1. Посів ізольованих колоній *E.coli* на середовище LB.

8.2.1. Концентрація біомаси

В джерелі [33] зазначено, що оптична густина пропорційна концентрації дисперсної фази, тобто оптична густина пропорційна сухій масі клітин для одноклітинних мікроорганізмів. Таким чином, замість звичного методу підрахунку клітин, концентрацію біомаси можна визначати виміром оптичної густини.

Однак, слід пам'ятати, що при досить високій концентрації клітин є можливість отримання некоректних результатів. Щоб запобігти цьому необхідно проводити вимірювання, коли оптична густина не перевищує 0,5, або робити розведення.

Вимірювання проводили на спектрофотометрі «UNICO 2800UV/VISSPECTROPHOTOMETR».

Необхідні матеріали та реактиви: мірні колби на 50 см³, кювети, автоматична піпетка з регулюванням об'єму 20-100 мл.

Метод проведення виміру: вносили культуральну рідину об'ємом, залежним від розведення (густина 0,2-0,5), вимірювання проводили при довжині хвилі 600 нм. Записували і опрацьовували результат – показник приладу множили на розведення. Щоб отримати точні результати використовують стандарту для кожного мікроорганізму криву відношення оптичної густини до підрахунку клітин та підрахунком по сухій масі клітин [33].

8.2.2. Концентрація треоніну

Визначення концентрації треоніну методом ВЕРХ.

При визначенні концентрації амінокислот найчастіше використовують метод високоефективної рідинної хроматографії. Якщо зразок містить кілька амінокислот, перед аналізом проводять градієнтне елюювання. Після проведення розділення, відбувається процес визначення концентрації треоніна в культуральній рідині на хроматографі DionexUltiMate-3000 HPLC, що має програмне забезпечення Chromeleon7 (використовується для управління насосом, детектором, автосемплером). Перед проведенням визначення концентрації необхідно відділити клітини від культуральної рідини центрифугуванням, потім зруйнувати клітини, залишки яких також необхідно відділяти центрифугуванням. Для руйнування клітин можна використати ультразвук, прес Френча або кульовий млин. Отриману рідину необхідно очистити від залишків клітинних компонентів, до яких відносять нуклеїнові кислоти та залишки капсули.

Градієнтне елюювання. Аналізовані проби розчиняють у воді, в автосемплері зразок змішується з розчином ортофталевого альдегіда, а потім автоматично відправляється до інжекторного клапана. Розділення проходить на колонці C18 за використанням флуоресцентного детектора, фосфатний буферний розчин, що містить метанол, 2-пропанол, ацетонітрил та деіонізовану воду, використовується як елюент(рН 3,0-3,05).

ВЕРХ. На аналітичних терезах в колбу місткістю 100 см³ вносили приблизно 0,2000 г культуральної рідини з точністю до 4 знаків після коми. В цю ж колбу додавали 5 см³ внутрішнього стандарту – орнітину, доводили до позначки дистильованою водою. Розчин перемішували і фільтрували мікрофільтром 45 мкм. Відібрану частину зразка хроматографували [24].

Умови хроматографування:

Колонка: нержавіюча сталь

Предколонка: 4×3 мм

Рухома фаза: елюент – фосфатний буфер (рН 3,03,05), розчинник ВЕРХ, 2-пропанол, ацетонітрил, вода.

Швидкість потоку: 0,425 мл/хв.

Температура колонки: 40°C

Флуоресцентний детектор, довжина хвилі: 340 та 440 нм

Об'єм проби: 3 мкл

Час реєстрування хроматографи: 10-15 хв

Базова система ВЕРХ Thermo UltiMate3000

Забезпечує високу ефективність та продуктивність. Як і всі системи UltiMate™ 3000, вона сумісна з УВЕРХ, а також із традиційною ВЕРХ. Базові автоматизовані системи UltiMate 3000 поєднують автосамплер та відсік колонок в одному модулі. Система та програмне забезпечення легко адаптуються до нових завдань за допомогою додаткових модулів UltiMate 3000. Відповідає всім умовам хроматографування треоніну [34].

8.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Джерелом Карбону для культивування *E.coli* є глюкоза. Для виміру концентрації глюкози можна використати автоматичний аналізатор «Ензискан-22 ультра».

Суть методу. В суть методу вимірювання глюкози цим приладом покладено амперометричне вимірювання концентрації перекису водню, що

утворюється при розщепленні глюкози(ферментом глюкозооксидазою). Тобто, кількість перекису водню пропорційна кількості глюкози в досліджуваній пробі. Струм, що утворився при окисненні перекису водню, перетворюється в постійну напругу, після чого вимірюється аналогово-цифровим перетворювачем.

Необхідні матеріали та реактиви:

Автоматична піпетка з регульованим об'ємом 100-1000 мл

Центрифуга з пробірками Епендорф

Мірні колби на 10 см³

Буферний розчин(pH=7,2-7,4)

Перед початком роботи необхідно відкалібрувати прилад по калібровочному розчину глюкози з відомою концентрацією(10 ммоль/дм³). Далі культуральну рідину центрифугували, отриманий фільтрат(центрифугат) аналізували. У випадку високої концентрації глюкози (>25 ммоль/дм³) в пробах необхідно робити розведення в 20 раз: в мірну колбу на 10 см³ вносять 0,5 см³ проби і доводять до мітки водою. Отриману розведену пробу за допомогою дозатора вводять в прилад. Результати автоматично виводяться на дисплей.

Так як результати отримують в ммоль/дм³, існує формула для переведення в г/дм³:

$$C = C_m * 180 * n / 1000$$

Де n – розведення; C_m – показання приладу, ммоль/дм³; 180 – молярная масса глюкози [17].

Визначення концентрації азоту методом Несслера

Суть методу полягає в утворенні колоїдного розчину, що має червоно-бурий колір, при взаємодії аміаку з реактивом Несслера – лужний розчин K₂(HgI₄). Далі отриманий розчин аналізують за допомогою спектрофотометра за

довжиної хвилі 400-425 нм(для 0,2 мг і менше NH₃) або 500-580 нм (приблизно 1 мг) [33].

РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля

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

*Тривалість процесу отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу складає по 48 год. Для аерації середовища використовують стерильне повітря зі швидкістю аерації – 1,2 л повітря на 1 л культуральної рідини за одиницю часу (хв). У виробничому приміщенні встановлюють ферментаційні апарати 4 л, 40 л, 400 л та 4 м³ з об'ємами поживного середовища 2,019 і 20,19 л, 201,9 та 2019 л відповідно. Розрахуємо об'єм повітря для посівного апарату. Оскільки нам відомо, що аерація проводиться 1,2 л на 1 л культуральної рідини, то з цього вийде:

$$1,2 \cdot 2,019 = 2,4228 \text{ л/хв} * (48*60) \text{ год} = 7 \text{ м}^3$$

$$1,2 \cdot 20,19 = 24,228 \text{ л/хв} * (48*60) \text{ год} = 69,7 \text{ м}^3$$

$$1,2 \cdot 201,9 = 242,28 \text{ л/хв} * (48*60) \text{ год} = 697,76 \text{ м}^3$$

$$1,2 \cdot 2019 = 2422,8 \text{ л/хв} * (48*60) \text{ год} = 6977,6 \text{ м}^3$$

Для ферментера

$$1,2 \cdot 20019 = 24228 \text{ л/хв} * (48*60) \text{ год} = 69776 \text{ м}^3$$

					НУХТ БТЕК					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля					
Розроб.		Нікандрова Д.А.						Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Воронцов О.О.							4	
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.			60					

Таблиця 9.1

Місця емісії, об'єми та шкідливість відходів, що утворюються на проєктованому виробництві

Тип відходів	Назва відходів	Речовини: що входять до складу відходів	Стадія виробництва	Приблизна кількість відходів за 1 цикл виробництва	Клас небезпеки
Газо-подібні	Відпрацьоване повітря з посівного апарату	Діоксид Карбону, клітини кишкової палички	Вирощування посівного матеріалу	7752,06	IV
	Відпрацьоване повітря з ферментеру		виробничий біосинтез	69776	IV
Рідкі	Хлорне вапно	$\text{Ca}(\text{ClO})_2$, CaCl_2 і $\text{Ca}(\text{OH})_2$	дезинфекція поверхонь	0,5 л на 1м3	II
	Хлоратоїн	дихлорантин, діюча речовина, 5,5-діметілгідантоїн, диспергатор, аніонні поверхнево-активні речовини.	миття обладнання	0,5 л на 1м3	IV
	Супернатант після центрифугування культуральної рідини	залишки складових поживного середовища, залишки біомаси	подальші стадії виробництва		IV
Тверді	Пластикова тара для мийних засобів	ПЕ-поліетилен	санітарна підготовка виробництва		IV

	Пакувальні матеріали для компонентів поживного	ПП-поліпропілен	IV
--	--	-----------------	----

9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Одним з актуальних та доступних методів утилізації та очищення стічних вод є їх анаеробне зброджування. Такий метод дає змогу відчищати воду від органічних залишків, в наслідку чого отримується газоподібне паливо. Зазвичай, цей спосіб використовується в комбінації з наступним аеробним очищенням. Основою анаеробного бродіння є перетворення органічних сполук в метан та вуглекислий газ. Для очищення наших стічних вод пропонується використання біореактору фінської фірми „Тампелла”, що використовується для харчових стоків. Інтенсифікація метаноутворення досягається в результаті використання у другій стадії шламу, отриманого в першій, і великої концентрації метаноутворюючих бактерій. Обидві зони можуть бути розміщені в одному вертикальному циліндрі, що розділений горизонтально перегородкою на верхню об’ємом 300 м³ та нижню – 350 м³ зони.

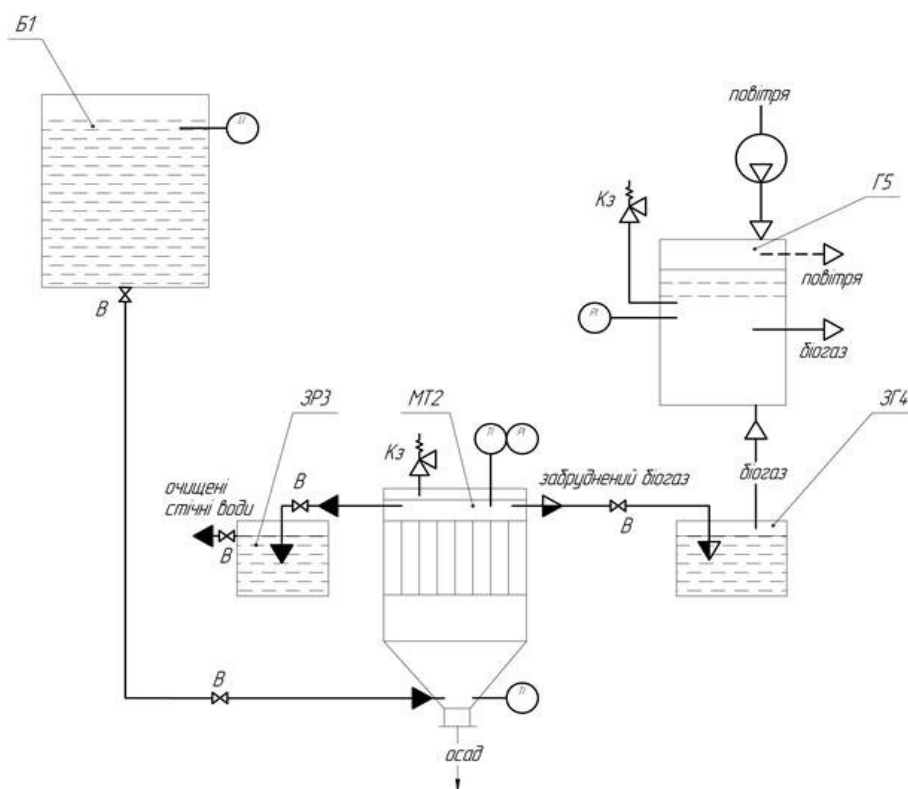


Рис.9.1. Схема установки для анаеробного зброджування стічних вод

Також, після проведення очищення стічних вод необхідним є знезараження вже очищеної води, так як не можна допускати потрапляння кишкової палички в середовище.

9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Перш за все, при закупці миючих засобів слід обирати екологічно чисту тару, яка піддається вторинній переробці, та сортувати сміття. Доречним було б використання пакувальних матеріалів, у яких зовнішній слой виробляють з високоякісної пластмаси, а внутрішній – з відходів пластмас. Після сортування всі відходи слід відвозити в місця прийому вторсировини.[35]

9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Повітря, яке було використане, піддається очищенню у патронних фільтрах, де відбувається утримання часток з розміром більше 0,6 мікрметра, досягаючи ефективності очищення на рівні приблизно 99,995%. Після очищення повітря може випускатися в атмосферу або використовуватися повторно.

9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Одним із заходів заходів щодо зменшення відходів є впровадження схеми замкнутого циклу водопостачання. Суть цієї системи полягає в тому, що підприємство використовує власні очищені стічні води для подальшого виробництва, уникнувши тим самим викидання стічних вод у водойми.

Якщо є можливість, то використовувати пакувальну тару декілька разів чи відправляти її на переробку, завдяки чому отримувати нову тару[36].

ЛІТЕРАТУРА

1. Мигович М. И. Кельман В. А. Исследование спектрально люминесцентных свойств молекулы треонина. Оптика и спектроскопия. 2016, 121(1): 69-74. doi: 10.7868/S0030403416070138.
2. Амінокислоти та їхні властивості: [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ukrdoc.com.ua/text/8597/index-1.html>
5. Кривенюк М.Я. Ільчук І.І. Михальська В.М. Теоретичне обґрунтування співвідношення треоніну і триптофану у раціонах ремонтних курчат. Ukrainian Journal of Ecology. 2017, 7(3): 111-115. doi: 10.15421/2017_57.
7. Сапко С. А. Дослідження щодо ефективності використання кормових добавок для собак та кішок. ВІСНИК Полтавської державної аграрної академії. 2019, 4: 183-190. doi: 10.31210/visnyk2019.04.23
8. Андріяш Г. С. Отримання штамів *brevibacterium* з підвищеними рівнями синтезу лізину та треоніну. Дис.канд.біолог.наук. Київ, 2015. 13-28 с.
9. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. — К.: Фірма «ІНКОС», 2006. — 647 с.
10. Вплив кормових добавок та комбікормів на продуктивність та якість м'яса у свиней: Монографія / Р.А. Чудак, Ю. М. Побережець, В. М. Ушаков, Я. І. Бабков. Видавець ФОП Рогальська І.О., 2021. 202 с. ISBN 978-617-7556-98-4.
11. Кушнір Л. С., Максименко Ю. В. Використання бактерій-продуцентів незамінних амінокислот у біотехнології – Житомир, 2022. – 210-213 с.
12. Гунова О. О., Андріяш Г. С., Бейко Н. Є., Шульга С. М. Філогенетичний аналіз штамів-продуцентів лізину, треоніну та бутанолу. Фактори експериментальної еволюції організмів 2017. Том 21– К.: НАН України, 2017. - 288-291с.
13. Методичні рекомендації до проведення лабораторних робіт. Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. Горбатенко І. Ю., Юлевич О. І., Ковтун С. І., Кот С. П. – Миколаїв, 2020. – 108 с.
14. Дис. Создание продуцентов аминокислот на основе бактерий *corynebacterium glutamicum* и *escherichia coli*; исследование механизмов продукции / Гусятинер М.

М. – М.: Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика, 2017. - 226 ст.

15. Lei Zhao, Ying Lu, Jun Yang, Yu Fang, Lifei Zhu, Zhixiang Ding, Chenhui Wang, Wenjian Ma, Xiaoqing Hu & Xiaoyuan Wang. Expression regulation of multiple key genes to improve L-threonine in Escherichia coli // Microbial Cell Factories volume. – 2020. P. 23. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01312-5>

16. Vargas-Maya Naurú Idalia, Franco Bernardo. Escherichia coli as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. University of Guanajuato, México, 2017. DOI: 10.5772/67306

17. Литусов Н.В. Эшерихии. Иллюстрированное учебное пособие. Екатеринбург: Изд-во УГМА. 2016, ст. 36. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-42-5.

18. Соколов М.С., Соколов Д.М., Тымчук С.Н., Ларин В.Е. Методология и показатели санитарно-микробиологического контроля безопасности почвы. Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». 2014, 6(2): 158-169.

19. Трехов В.И., Тищенко А.С., Степаненко А.В. Экзотоксины патогенных escherichia coli. Ветеринария Кубани. 2020, 5: 3-7. DOI:10.33861/2071-8020-2020-5-3-7.

20. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Pathway Database. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?eco00010

21. Хоулт Дж., Криг Н., Смит П., Стейли Дж., Уильямс С. Определитель бактерий Берджи в 2 томах – М: Мир, 1997. – 746 с.

22.

<https://agrotimes.ua/tvarinnitstvo/vyrobnyctvo-myasa-ptyczi-u-2022-roczni-skrutylosya-na-8/>

23. О.М. Громик, О.В. Семенда. Тенденції споживання м'яса в Україні: реалії та проблеми розвитку. Комунальне господарство міст, 2023, том 5, випуск 179. DOI: <https://doi.org/10.33042/2522-1809-2023-5-179-20-26>

24. Б. К. Кузьменко, С. В. Цап, С. Г. Годяєв. Оптимізація протеїнового живлення у годівлі курчат-бройлерів в товаристві з обмеженою відповідальністю «птахокомплекс дніпровський» нікопольського району дніпропетровської області. 4 25. <https://thepage.ua/ua/politics/vegani-ta-vegetarianci-v-zsu-yak-voni-harchuyutsya>
26. Lei Zhao, Ying Lu, Jun Yang, Yu Fang, Lifei Zhu, Zhixiang Ding, Chenhui Wang, Wenjian Ma, Xiaoqing Hu & Xiaoyuan Wang. Expression regulation of multiple key genes to improve L-threonine in Escherichia coli // Microbial Cell Factories volume. – 2020. P. 23. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01312-5>
27. <https://www.eppendorf.com/de-de/eShop-Produkte/Laborsch%C3%BCttler/Inkubationssch%C3%BCttler/New-Brunswick-Innova-44-44R-p-PF-11020>
28. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня бакалавр спеціальності 162 “Біотехнологія та біоінженерія” освітньо-професійної програми “Біотехнологія” денної та заочної форм навчання – К: УХТ, 2019. – 252 с.
29. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П., Гуляєв В.М. – Кам’янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.
30. Грегірчак Н.М., Тетеріна С.М., Нечипор Т.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР. – К.: НУХТ, 2018. – 274 с.
31. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня бакалавр спеціальності 162 “Біотехнологія та біоінженерія” освітньо-професійної програми “Біотехнологія” денної та заочної форм навчання – К: УХТ, 2019. – 252 с.
32. 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.

33. Картавых А.П. Аналитический контроль в технологии получения треонина: магистр.дис. Белгород, 2019. 27-30 ст. □Електронний ресурс

34. Базова система ВЕРХ Thermo UltiMate3000. Режим доступу:http://dspace.bsu.edu.ru/bitstream/123456789/38057/1/Kartavyx_Analiticheski_j_19.pdf.

35. Абашина К.О.Конспект лекцій з навчальної дисципліни «Утилізація промислових відходів» (для студентів 6 курсу денної форми навчання спеціальності 8.17020201 –Охорона праці (за галузями)) / К.О.Абашина, О.В.Хандогіна;Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім.О.М. Бекетова.–Харків : ХНУМГ ім.О.М. Бекетова, 2016. –58с

36. Попович О.Р, Гавришко М.І, Вронська Н.Ю. Екологічні проблеми харчової галузі. Національний університет «Львівська політехніка», аспірант кафедри екології та збалансованого природокористування інституту сталого розвитку ім. В. Чорновола, Україна.

Flask fermentation and fed-batch fermentation

Escherichia coli strains were streaked from the frozen stock on LB plate and cultured at 37 °C overnight. Then, a loop of bacteria was transferred into a tube containing 5 mL LB medium and cultured at 37 °C for 5 h with 200 rpm shaking. Next, the culture was transferred into a 250-mL flask containing 30 mL LB medium (the initial OD₆₀₀ of 0.05) and cultured at the same growth condition for 6 h. Finally, 5 mL culture was transferred into a 500-mL flask containing 30 mL fermentation medium (2 g/L yeast extract, 2 g/L citric acid, 25 g/L (NH₄)₂SO₄, 7.46 g/L KH₂PO₄, 40 g/L glucose, 2 g/L MgSO₄·7 H₂O, 5 mg/L FeSO₄·7H₂O, 5 mg/L MnSO₄·4 H₂O, and 20 g/L CaCO₃, pH 6.8) [50] at 37 °C with 200 rpm shaking for flask fermentation, or the whole culture was transferred into a quadruple bioreactor (Parallel-Bioreactor, China) containing 1 L fermentation medium (30 g/L glucose, 20 g/L (NH₄)₂SO₄, 3 g/L yeast extract, 2 g/L KH₂PO₄, 2 g/L MgSO₄·7H₂O, 5 mg/L FeSO₄·7H₂O, 5 mg/L MnSO₄·4 H₂O) [6]. Temperature was maintained at 37 °C, the aeration rate at 1.5 vvm, pH was maintained automatically at 6.9 with NH₄OH, and the dissolved oxygen value was maintained below 30%. Biomass was characterized by the OD₆₀₀ value. One unit of OD₆₀₀ corresponds to 1.7 g/L cell wet weight [6]. The amount of amino acids was determined by the 1200 series HPLC system (Agilent Technology, USA), using the orthophthalaldehyde precolumn derivatization method [51].

Acetate, pyruvate and oxaloacetate were quantified by using 1200 Series HPLC system (Agilent Technology, USA) equipped with an amines HPX-87H column (300 × 7.8 mm), and 0.005 M H₂SO₄ was used as a mobile phase with a flow rate of 0.5 mL/Min. The column temperature was maintained at 40 °C and the UV absorption was determined at 210 nm.