

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

Дипломна магістерська робота

на тему: «Застосування *Corynebacterium glutamicum* для отримання
глутамінової кислоти»

Виконав: студент 2 курсу, групи МгЗБТ-20
Спеціальності 162 Біотехнології та
біоінженерія освітньої програми
Біотехнологія високомолекулярних сполук
Євгеній БЄЛКІН

Керівник: к.т.н., доц. Олена ОХМАТ

Рецензент: к.т.н., доц. Ірина ВОЛОШИНА

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології, шкіри та хутра
д.т.н., проф. Олена МОКРОУСОВА

« ____ » _____ 2021 року

ЗАВДАННЯ
НА ДИПЛОМНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Белкіну Євгенію Сергійовичу

1. Тема роботи: **Застосування *Corynebacterium glutamicum* для отримання глутамінової кислоти**

Науковий керівник роботи к.т.н., доц. Олена Анатоліївна Охмат
затверджені наказом вищого навчального закладу від
«04» жовтня 2021 року №286.

2. Строк подання студентом роботи _____

3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломну магістерську роботу; наукова література щодо властивостей *Corynebacterium glutamicum*, технологічні схеми промислового отримання глутамінової кислоти; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

4. Зміст дипломної роботи: вступ, огляд літератури, технологічна частина, контроль якості, висновки, список використаних джерел, додатки.

5. Консультанти розділів дипломної магістерської роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	Олена ОХМАТ, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 2	Олена ОХМАТ, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 3	Олена ОХМАТ, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		

6. Дата видачі завдання 04.10.2021р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної магістерської роботи	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Огляд літератури		
3	Розділ 2 Технологічна частина		
4	Розділ 3 Контроль якості		
5	Висновки		
6	Оформлення дипломної магістерської роботи		
7	Подання дипломної магістерської роботи на кафедру для рецензування		
8	Перевірка дипломної магістерської роботи на наявність ознак плагіату		
9	Подання дипломної магістерської роботи у відділ магістратури для перевірки виконання індивідуального плану		
10	Подання дипломної магістерської роботи на затвердження завідувачу кафедри		

Студент _____ Євгеній БЄЛКІН

Науковий керівник роботи _____ Олена ОХМАТ

Директор НМЦУПФ _____ Олена ГРИГОРЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Євгеній БЄЛКІН. Застосування *Corynebacterium glutamicum* для отримання глютамінової кислоти. – Рукопис.

Дипломна магістерська робота за спеціальністю 162 Біотехнологія та інженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2021 рік.

Дипломну магістерську роботу присвячено вивченню *Corynebacterium glutamicum*, їх властивостей, практичного застосування.

У дипломній роботі обґрунтовано технологію виробництва глютамінової кислоти, отриманої на основі *Corynebacterium glutamicum*. Представлено технологічну схему виробництва глютамінової кислоти, яка передбачає стадії ферментації, осадження надлишкових іонів, концентрування, кристалізації, фільтрування і висушування кристалів глютамінової кислоти. Обґрунтовано вибір технологічного обладнання для реалізації виробництва.

Дипломна робота включає методики контролю стадій виробництва глютамінової кислоти.

Ключові слова: глютамінова кислота, Corynebacterium glutamicum, біосинтез, контроль якості.

ANNOTATION

Yevhenii BIELKIN. Glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum*. - Manuscript.

Master's thesis in specialty 162 Biotechnology and Engineering. – Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2021.

The master's thesis is devoted to the study of *Corynebacterium glutamicum*, their properties, practical application.

The thesis substantiates the technology of production of glutamic acid obtained on the basis of *Corynebacterium glutamicum*. The technological scheme of glutamic acid production is presented, which provides for the stages of fermentation, precipitation of excess ions, concentration, crystallization, filtration and drying of glutamic acid crystals. The choice of technological equipment for the realization of production is substantiated.

Thesis includes methods of controlling the stages of glutamic acid production.

Key words: glutamic acid, Corynebacterium glutamicum, biosynthesis, quality control.

ЗМІСТ

ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1 Властивості глютамінової кислоти.....	12
1.1.1 Загальні властивості глютамінової кислоти.....	12
1.1.2 Способи отримання глютамінової кислоти.....	13
1.2. Препарати, що містять глютамінову кислоту.....	17
1.2.1 Використання глютамінової кислоти у фармацевтичній промисловості.....	17
1.2.2 Використання глютамінової кислоти у харчовій промисловості.....	19
1.2.3 Глутамінова кислота в організмі людини.....	20
Висновки до розділу 1.....	24
РОЗДІЛ 2 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	25
2.1 Характеристика цільового продукту.....	25
2.2 Характеристика біологічного агента <i>Corynebacterium glutamicum</i>	27
2.2.1 Таксономічний статус <i>Corynebacterium glutamicum</i>	28
2.2.2 Морфолого-культуральні властивості <i>Corynebacterium glutamicum</i>	28
2.3 Обґрунтування способу проведення біосинтезу.....	30
2.3.1 Технологічна схема отримання глютамінової кислоти культурою <i>Corynebacterium glutamicum</i>	30
2.3.2 Приготування поживного середовища.....	31
2.3.3 Приготування вихідної та посівної культур.....	34
2.3.4 Вирощування продуцента.....	34
2.3.5 Характеристика етапів відділення глютамінової кислоти.....	36
2.3.6 Обґрунтування вибору технологічного обладнання для отримання глютамінової кислоти.....	37
Висновки до розділу 2.....	45

РОЗДІЛ 3 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ	46
3.1 Контроль на стадії біосинтезу.....	46
3.2 Контроль готового продукту.....	49
3.3 Екологічна складова.....	52
Висновки до розділу 3.....	53
ВИСНОВКИ	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	55
ДОДАТКИ	58

ВСТУП

Актуальність теми. Відомо, що глютамінова кислота (α -аміноглутарова) є однією з найважливіших амінокислот рослинних і тваринних білків. Вперше глютамінова кислота була виділена у 1866 році Рітгаузенем з клейковини пшениці, а в 1890 р. – синтезована Вольфом. На сьогодні виробництво і споживання глютамінової кислоти швидко зростають, і в даний час у світі її виробляють близько сотні тисяч тонн на рік, оскільки вона має широке застосування.

Глутамінова кислота не відноситься до числа незамінних, проте, тим не менш, служить основою для синтезу багатьох фізіологічно активних сполук, необхідних для нормальної життєдіяльності людського організму. Важливою особливістю глютамінової кислоти є здатність служити захисним фактором при різних отруєннях печінки і нирок, посилювати фармакологічну дію одних і послаблювати токсичність інших лікарських засобів, підтримувати поряд з іншими амінокислотами постійну реакцію середовища. На цих властивостях і засноване лікування ряду захворювань шляхом введення в організм глютамінової кислоти. В медицині та фармацевтичній промисловості використання глютамінової кислоти обумовлене її широким спектром дії на організм людини. Зокрема, у клінічній практиці застосування цієї кислоти викликає поліпшення стану хворих при інсуліновій гіпоглікемії, при судомах, при синдромі Дауна, при поліомієліті, астенічних станах, у разі м'язово-дистрофічних захворювань тощо [1].

У харчовій промисловості вона відома як харчова добавка E620, яку використовують як підсилювач смаку в ряді продуктів, наряду з солями глютамінової кислоти (глутаматами). Її додають у різні напівфабрикати, продукти швидкого приготування, кулінарні вироби, концентрати бульйонів тощо, оскільки ця кислота надає їжі приємний м'ясний смак. Також її використовують для збагачення продуктів спортивного харчування, зокрема, з метою збільшення м'язової маси. У хлібопекарській діяльності наявність даної амінокислоти не тільки впливає на смакові та ароматичні властивості хліба, а й

на діяльність основних представників бродильної мікрофлори житніх заквасок – дріжджів і молочнокислих бактерій [1, 2].

У ветеринарній практиці глутамінова кислота у великих кількостях використовується в якості кормової добавки у складі комбікормів, оскільки її введення до складу комбікормів скорочує витрату дефіцитних білків тваринного походження.

Найбільш перспективним і широко використовуваним способом виробництва глутамінової кислоти є мікробіологічний синтез.

Отже, актуальність теми кваліфікаційної роботи обумовлена широкою практикою застосуванням глутамінової кислоти, що, враховуючи комерційну цінність, є актуальними для різних галузей промисловості України.

Наукова новизна роботи полягає в аналізі властивостей *Corynebacterium glutamicum* та опрацюванні технології реалізації і контролю біосинтезу глутамінової кислоти.

Мета теоретично-аналітичної роботи полягає у використанні високопродуктивного штаму *Corynebacterium glutamicum* для промислового виробництва глутамінової кислоти.

Об'єктом дослідження є технологія отримання глутамінової кислоти.

Предмет дослідження – властивості *Corynebacterium glutamicum* та їх застосування для отримання глутамінової кислоти.

Завдання роботи:

1. Вивчити властивості та проаналізувати застосування глутамінової кислоти у різних галузях промисловості та охорони здоров'я.
2. Вивчити властивості *Corynebacterium glutamicum* та їх придатність до виробництва глутамінової кислоти.
3. Визначити склад поживного середовища для виробничого біосинтезу глутамінової кислоти.
4. Обґрунтувати вибір та апаратурне забезпечення технологічної схеми виробництва глутамінової кислоти.
5. Обґрунтувати методи контролю на виробництві.

Апробація. Результати магістерської роботи оприлюднено на I Міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (ХНУ, Харків, 25 березня 2021 року). Участь у конференції підтверджена сертифікатом учасника (Додаток А).

Публікації. За темою дипломної роботи опубліковано тези доповіді конференції міжнародного рівня (Додаток Б).

Белкін Є. С. Глутамінова кислота та її вплив на організм людини. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології : матеріали I Міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф. (Харків, 25 березня 2021 року). Харків : НФУ, 2021. С. 80-81.

Структура та обсяг дипломної магістерської роботи. Дипломна магістерська робота викладена на 57 сторінках друкованого тексту, містить 3 розділи, висновки та список використаної літератури з 39 джерел, 2 додатка.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Властивості глутамінової кислоти

Глутамінова кислота (Glutamic acid, α -аміноглутарова кислота; Glu, E) – аліфатична α -амінокислота. Зустрічається у всіх організмах у вільному вигляді (в плазмі крові разом з глутаміном становить близько 1/3 всіх вільних амінокислот) та у складі білків. Була вперше виявлена у глютені пшениці, через що і отримала свою назву. *In vivo* глутамінова кислота синтезується із α -оксоглутарової кислоти – проміжного продукту циклу Кребса [1].

Природними джерелами глутамінової кислоти є соя, м'ясо, птиця, риба, яйця і молочні продукти (особливо сир), зелений горошок, буряк, кукурудза, морква, цибуля, шпинат і ін.

1.1.1 Загальні властивості глутамінової кислоти

Глутамінова кислота (рис. 1.1) та її солі (глутамати натрію, калію, амонію, магнію; диглутамат кальцію) використовуються як підсилювачі смаку в багатьох харчових концентратах і консервах [2].

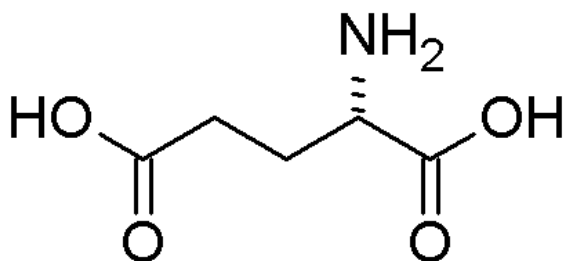


Рис. 1.1. Глутамінова кислота

Молекулярна формула – $C_5H_9NO_4$; Молярна маса – 147,13 г/моль;

Зовнішній вигляд – біла кристалічна пудра або кристали;

Густина – 1,4601 г/л (20 °С); Розчинна у воді.

Температура плавлення –199 °С.

За хімічними властивостями глютамінова кислота – аліфатична α -амінокислота. При нагріванні утворює 2-пірролідон-5карбонову, або піроглютамінову кислоту, з Cu і Zn – нерозчинні солі. В утворенні пептидних зв'язків бере участь головним чином α - карбоксильна група, в деяких випадках, наприклад у природного трипептида глутатіона – γ -аміногрупа. У синтезі пептидів з L-ізомерів поряд з α -NH₂-групою захищають γ -карбоксильну групу, для чого її етерифікують бензиловим спиртом або отримують третбутиловий ефір дією ізобутилену в присутності кислот. γ -групу -COOH залишків глютамінової кислоти в білках модифікують так само, як у аспарагінової кислоти [3].

Глутамінова кислота входить до складу речовин: міозину, казеїну, β -лактоглобуліну і т.д. Найбільше глютамінової кислоти знаходиться у білках мозку, злаках. Глутамінову кислоту синтезують при сольволизі білкових з'єднань. Міозин, казеїн, α -лактоглобулін містить до 20% глютамінової кислоти.

1.1.2 Способи отримання глютамінової кислоти

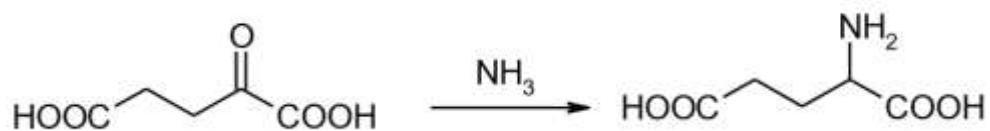
Відомо [4 - 6] декілька способів отримання глютамінової кислоти: гідроліз білків, синтез хімічний, синтез ферментативний з α -кетоглутарової кислоти і синтез мікробіологічний.

Мікробіологічний синтез – найбільш перспективний і використовуваний спосіб виробництва глютамінової кислоти. Промислове значення для отримання глютамінової кислоти мають бактеріальні культури *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*. Це головним чином паличкоподібні, грам позитивні, нерухомі бактерії, що не утворюють спор. Специфічною для них є обов'язкова потреба в біотині або в біотині і тіаміні. Сировиною для отримання глютамінової кислоти крім традиційних вуглеводів (глюкоза, сахароза) можуть бути вуглеводні природного газу (метан, етан), парафін, ароматичні сполуки (бензиловий спирт, пірокатехін та ін.). Для виробництва можуть бути використані газойль, оцтова, аміномасляна, фумарова кислоти і ряд інших продуктів [7].

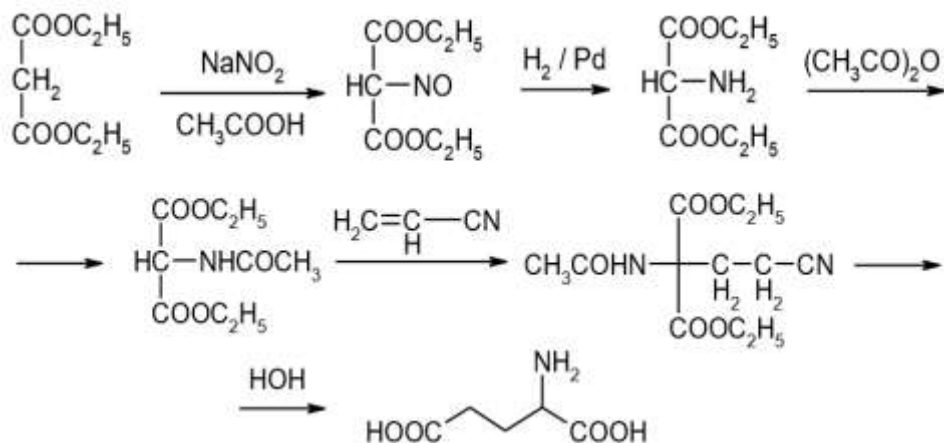
Реактиви	Продукти	Ферменти
Глютамін + H ₂ O	→ Glu + NH ₃	GLS, GLS2
NAcGlu + H ₂ O	→ Glu + Ацетат	N-ацетил- глутаматсинтаза
α-кетоглутарат + НАДПН + NH ₄ ⁺	→ Glu + НАДП ⁺ + H ₂ O	GLUD1, GLUD2 ^[15]
α-кетоглутарат + α-амінокислота	→ Glu + α-кетокислота	трансамінази
1-піролін-5-карбоксилат + НАД ⁺ + H ₂ O	→ Glu + NADH	ALDH4A1
N-формаміно-L-глутамат + FH ₄	→ Glu + 5-форміміно- FH ₄	FTCD
НААГ	→ Glu + NAA	GCPII

Рис. 1.2. Біосинтез глютамінової кислоти [8]

Промисловий метод одержання глютамінової кислоти передбачає **мікробіологічний синтез** з α-кетоглутарової кислоти за схемою, аналогічною біосинтезу:



Глютамінову кислоту можна отримати з акрилонітрилу й ацетиламіномалонового ефіру:



Отримання глютамінової кислоти **гідролізом** білків передбачає використання тваринних і рослинних білків: казеїну молока, клейковини пшениці, кукурудзяного глютену, відходів м'ясокомбінатів, відходів буряково-цукрових (сепараційний луг), відходів спиртових заводів (барда). Комплексна переробка м'яса дозволяє отримати не тільки високоякісні цукрові сиропи, а ще й глютамінову кислоту, бетаїн, холін та інші цінні продукти [9].

Метод гідролізу малопродуктивний і досить дорогий через значне утворення побічних продуктів і необхідності ретельного очищення синтезованої глютамінової кислоти.

Серед методів **хімічного синтезу** найбільш перспективним є метод з використанням в якості вихідної сировини акрилонітрилу. Згідно цього методу акрилонітрил в результаті реакції гідроформілювання перетворюють у β -формілпропіонітрил, а останній через стадію утворення α -аміноглутардинітрилу переводять у D- і L-глютамінову кислоту. Хімічна реакція синтезу представлена на рисунку 1.3.

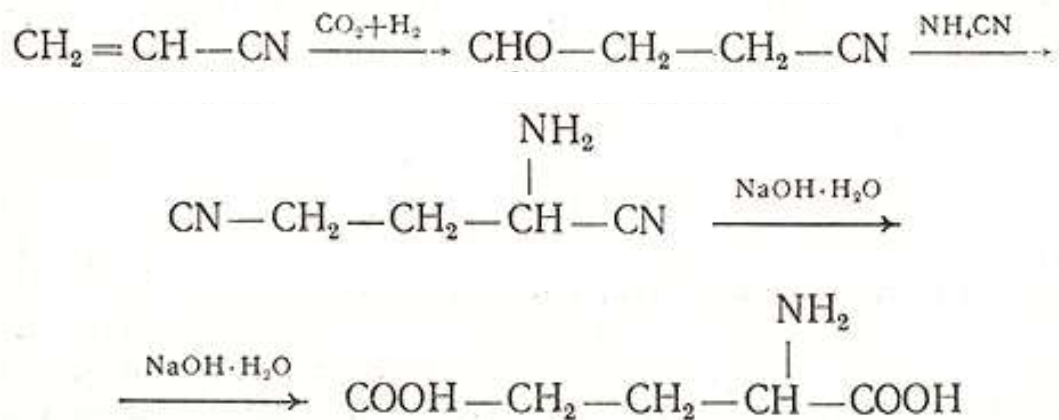


Рис. 1.3. Хімічна реакція синтезу глютамінової кислоти

Основним недоліком хімічного синтезу є отримання рацематів амінокислот. Поділ D- і L-ізомерів є досить складною операцією і вимагає великих капітальних витрат [9].

Ферментативний синтез глутамінової кислоти можна здійснити за допомогою ферментів транс амілази або глутаматдегідрогенази з α -кетоглутарової кислоти. Для здійснення різних стадій перетворень необхідні джерела α -кетоглутарової кислоти і відповідної ферментної системи. Перше завдання вирішують за допомогою підбору мікроорганізмів, здатних продукувати значну кількість α -кетоглутарової кислоти з доступних джерел сировини. Продукентами α -кетоглутарової кислоти можуть виступати *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Kluyverd citrophila*. При культивуванні останнього продуцента можна досягти 57 % виходу α -кетоглутарової кислоти. Дріжджі роду *Candida* при вирощуванні на парафіні продукують α -кетоглутарову спільно з пірвіноградною кислотою у співвідношенні 6:1 відповідно. Економічний коефіцієнт процесу біосинтезу при цьому досягає 90 % від кількості спожитих вуглеводнів.

У ролі продуцента ферменту трансамідази можуть виступати різні мікроорганізми, наприклад *E. coli*; донором аміногруп – аспарагінова кислота або аланін.

Відновлювальне амінування можна здійснювати за допомогою *Pseudomonas* (застосування *Ps. ovalis*, вихід L-глутамінової кислоти становить 60 %) або *Aeromonas*. Деякі штами вищевказаних мікроорганізмів в якості субстрату можуть використовувати D-, L- α -оксиглутарову кислоту, вироблену хімічним синтезом [10].

Мікробіологічний синтез глутамінової кислоти є найбільш перспективним і широко використовуваним способом виробництва. Вперше про можливість отримання L-глутамінової кислоти безпосередньо з вуглеводів за допомогою мікроорганізмів методом глибинного культивування повідомили в 1957 р японські вчені Кіноситу, Асаї.

До теперішнього часу з'ясовано, що здатністю продукувати глутамінову кислоту володіють деякі види дріжджів, мікроскопічні гриби, бактерії. Однак практично тільки бактерії можуть синтезувати глутамінову кислоту з виходом не менше 40 % щодо кількості вихідної сировини (наприклад, цукру).

Сьогодні промислове значення мають бактерії, що відносять до родів *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*. Це, головним чином, грам позитивні, неспороутворюючі, паличкоподібні бактерії.

1.2 Препарати, що містять глутамінову кислоту

Глутамінову кислоту містять лікарські засоби, вітаміни та біологічно-активні добавки (БАДи) [11].

1.2.1 Використання глутамінової кислоти у фармацевтичній промисловості

Лікарські засоби з глутаміновою кислотою на ринку України пройшли процедуру реєстрації. Випускають препарати у формі порошків та таблеток. Засоби можуть призначати у випадках, які включають [12]:

- затримку психічного розвитку у дітей з різною етіологією;
- ДЦП;
- лікування наслідків родових внутрішньочерепних травм;
- синдром Дауна;
- епілепсію;
- шизофренію;
- різного роду психози;
- депресію і психічне виснаження;
- безсоння;
- поліомієліт;
- наслідки енцефаліту і менінгіту;
- прогресуючу міопатію;
- токсичну невропатію;
- нейротоксичні явища, пов'язані з прийомом інших препаратів.

Препарати з глутаміновою кислотою не застосовують у період вагітності або годування груддю. Враховуючи можливий вплив препаратів на нервову

систему, слід з обережністю застосовувати їх при керування автотранспортом або роботі з іншими механізмами.

Фармакодинаміка. Замінна амінокислота, що бере участь у процесах переамінування амінокислот в організмі, у білковому і вуглеводному обміні, стимулює окиснювальні процеси, сприяє знешкодженню та виведенню з організму аміаку, підвищує стійкість організму до гіпоксії. Сприяє синтезу ацетилхоліну та АТФ, перенесенню іонів калію, відіграє важливу роль у діяльності скелетних м'язів. Глутамінова кислота належить до нейромедіаторних амінокислот, що стимулюють передачу збудження у синапсах центральної нервової системи.

Фармакокінетика. Глутамінова кислота добре всмоктується при прийомі внутрішньо. Швидко елімінується з крові, накопичуючись переважно у м'язовій і нервовій тканинах, печінці та нирках, проникає через гематоенцефалічний бар'єр і мембрани клітин. Частково глутамінова кислота під час всмоктування переамінується до утворення аланіну. Під впливом ферменту глутамдекарбоксілази перетворюється у мозку на медіатор – гамма-аміномасляну кислоту. Близько 4 - 7 % її виводиться з сечею у незміненому вигляді, решта – утилізується у процесі метаболічних перетворень.

Протипоказання до застосування глутамінової кислоти включають: гарячкові стани, підвищену збудливість, різко виражені психотичні реакції, печінкову та/або ниркову недостатність, нефротичний синдром, виразкову хворобу шлунка та дванадцятипалої кишки, захворювання органів кровотворення, анемію, лейкопенію.

Під час застосування глутамінової кислоти показане систематичне дослідження сечі та крові; полоскання рота слабким розчином натрію гідрокарбонату після застосування лікарських засобів.

Препарати, що містять глутамінову кислоту, представлено у вільному продажу через аптечні мережі (зареєстровані препарати) та сайти мережі Інтернет [13].

Перелік препаратів, до складу яких входить глютамінова кислота, включає:

- Глутамінова кислота,
- Аминоплазмаль Б. Браун Е 10,
- Аминоплазмаль Б. Браун Е 5,
- Аминоплазмаль Гепа,
- Аминоплазмаль Е 15,
- Глутамевит,
- Кабивен® периферический,
- Кабивен® центральный,
- Квадевит,
- Нутрифлекс 40/80,
- Нутрифлекс 40/80 липид,
- Нутрифлекс 48/150,
- Нутрифлекс 48/150 липид,
- Нутрифлекс 70/180 липид,
- Нутрифлекс 70/240,
- Церебролизат,
- Элтацин®,
- L-Glutamine тощо.

1.2.2 Використання глютамінової кислоти у харчовій промисловості

Глутамінова кислота, в якості біологічно-активної харчової добавки досить часто застосовується у спорті та бодібілдингу. Одна з причин полягає у властивості глютамінової кислоти зв'язувати лактат, який відповідає в організмі людини за почуття м'язового болю. Таким чином, добавка дозволяє спортсменам швидше відновитися після напружених змагань, а бодібілдерам – після виснажливих тренувань. Під час занять спортом процеси азотистого обміну відбуваються активніше, в результаті чого в організмі людини утворюється більша кількість аміаку, який є досить токсичним продуктом азотистого розпаду. Глутамінова кислота здатна перетворювати його у глютамін, який не несе ніякої шкоди здоров'ю людини. Варто також відзначити, що глютамінова кислота здатна при нестачі глюкози в крові замінити її, стаючи, таким чином, «альтернативним» джерелом енергії.

Глутамінова кислота як харчовий підсилювач смаку Е620 – досить популярна добавка, яка є заміником солі. Добавка здатна посилювати смак та аромат. Глутамінова кислота є дозволеною добавкою у продуктах харчування. Але споживання Е620 має не перевищувати 120 мг/кг ваги тіла людини.

Глутамінова кислота (E620) може входити до складу різноманітних кондитерських виробів; бульйонів; продукти швидкого приготування; сумішей спецій та прянощів.

Харчовий підсилювач смаку E620 відомий харчовикам як замітник смаку м'яса навіть тоді, коли продукт м'яса не містить. Додаток є обов'язковим інгредієнтом чіпсів [14].

1.2.3 Глутамінова кислота в організмі людини

Глутамінова кислота є класичною заміною амінокислотою, яка в плазмі крові становить близько третини усіх вільних амінокислот.

Обмін глутамінової кислоти займає ключові позиції в метаболізмі білків, вуглеводів, жирів, азоту і ряду інших речовин організму. Оскільки в організмі існує певна «запасна» кількість глутамінової кислоти, насамперед, ця кількість витрачається у процесах із безпосередньою потребою [15, 16].

Глутамінова кислота є центральним метаболітом азотистого обміну. Її участь безпосередньо характеризується високоактивною утилізацією та знешкодженням токсичного вільного аміаку, а також перенесенням амінного азоту. Аміак становить 80 % всіх азотистих токсинів, що утворюється в організмі в результаті розпаду амінокислот, амінопуріну, аденілових кислот і білків. Механізм його знешкодження полягає в процесі приєднання аміаку до глутамінової кислоти, яка перетворюється в нетоксичний глутамін, який вже бере участь в амінокислотному обміні. Глутамін надходить в кров і переноситься нею в печінку, де використовується для утворення сечовини. Значні кількості глутаміну руйнуються глутаміназою нирок до глутамінової кислоти і аміаку, який зв'язується з іонами водню, тим самим, перетворюючись у іони амонію. Останні виводяться із сечею в обмін на іони натрію, які необхідні для підтримки лужного резерву крові. Знешкоджуюча дія глутамінової кислоти є особливо актуальною при підвищеному вмісті аміаку в крові, тканинах, наприклад, при впливі холоду, перегріві, гіпоксії, гіпероксії, аміачних отруєннях [15, 16].

Здатність даної кислоти зв'язувати аміак і стимулювати обмін речовин в печінці слугує причиною її широкого використання для лікування хворих з різними формами печінкової недостатності. Також отримано позитивні результати при використанні глютамінової кислоти для лікування хвороби Боткіна, печінкової коми, цирозу печінки. Для зв'язування надлишкової кількості аміаку глютамінова кислота застосовується для зниження азотермії у хворих з різними урологічними захворюваннями, а також при бруцельозі [15, 16].

Антитоксичну дію глютамінової кислоти виявлено при отруєнні метиловим спиртом, сірковуглецем, окисом вуглецю, семікарбозидом, гідразином, чотирьох-хлористим вуглецем, хлористим марганцем, фторидом натрію й ін.

За допомогою глютамінової кислоти відбувається біосинтез пуринових і піримідинових нуклеотидів, які беруть участь в утворенні молекул ДНК і РНК. Пуринові і піримідинові нуклеотиди виявляють яскраво виражену анаболічну дію, в першу чергу на кровотворні клітини [17].

Глутамінова кислота має здатність стимулювати синтез білків і пептидів, зокрема, глутатіону, казеїну; а також незамінних амінокислот, зокрема, гістидину та аргініну. Гістидин бере участь в утворенні карнозину і анзерину - безбілкових з'єднань, що містять азот в м'язах і які значно підвищують їхню працездатність, протидіючи розвитку втоми. Гістидин позитивно впливає на функції печінки, шлунково-кишкового тракту, запобігає утворенню виразок, має здатність підвищувати імунітет, послаблювати вплив на організм граничних факторів, налагоджує серцевий ритм. Аргінін спільно з гліцерином бере участь в синтезі креатину в м'язах, підвищує м'язову працездатність, активізує синтез тестостерону в організмі, при цьому помітно підвищує статеву активність у чоловіків. Роль глютамінової кислоти у синтезі білка пов'язують з «ефектом зберігання», суть якого полягає у запобіганні використанню незамінного азоту для синтезу замінних амінокислот. Глутамінова кислота, легко перетворюючись в замінні амінокислоти, забезпечує достатній набір всіх

амінокислот, необхідних для біосинтезу білка. При синтезі аспарагінової кислоти, аланіну, проліну, лізину, орнітину та інших амінокислот використовується не тільки азот глутамату, але і його вуглецевий скелет [18, 19].

Глутамінова кислота тісно пов'язана з процесами метаболізму вуглеводів. Багатогранна дія даної кислоти на показники вуглеводного обміну виявляється при гіпоксії. При цьому попереднє введення глутамінової кислоти перешкоджає накопиченню в крові молочної і піровиноградної кислот, зберігає на більш високому рівні вміст глікогену в печінці і м'язах. У зв'язку з цим, глутамінову кислоту використовують для ослаблення судом, що ускладнюють інсулінову гіпоклікемію при лікуванні шизофренії. Під впливом глутамінової кислоти при гіпоксії спостерігається також нормалізація вмісту АТФ в тканинах. Механізм впливу глутамінової кислоти на вуглеводний обмін повністю не з'ясований. Встановлено, що вуглецевий скелет глутамінової кислоти через метаболіти енергетичного обміну (α -кетоглутарову, щавлевооцтову та піровиноградну кислоти) легко утворює вуглеводи [20].

Зокрема, глутамінова кислота бере участь в утворенні глюкози – основного постачальника енергії для головного та спинного мозку. Вона здатна не тільки безпосередньо перетворюватися в глюкозу, головним чином, у кишківнику, а й прискорювати утворення глюкози (глюконеогенезу) з інших речовин в печінці та нирках. Біосинтез вуглеводів з глутамінової кислоти, перш за все з глюкози, надзвичайно важливий як резервний механізм постачання мозку глюкозою при відсутності харчування вуглеводами або при дуже великих фізичних навантаженнях [21].

Глутамінова кислота бере активну участь в реакціях ліпідного обміну: її вуглецевий скелет включається до складу жирних кислот, хоча в меншій мірі, ніж в лактозу і казеїн. Вважається, що для отримання ацетилкоензиму А та жирних кислот у зворотних реакціях циклу Кребса використовується від 6 до 35% від усієї кількості глутамінової кислоти, залежно від вмісту глюкози та інсуліну в тканинах. Участь глутамінової кислоти в ліпідному обміні пов'язано з циклом Кребса, а також з транспортуванням нею ліпідів. Участь глутамінової

кислоти в окисленні ліпідів доводиться її здатністю знижувати вміст ацетонових тіл в крові [21, 22].

Глутамінова кислота бере участь в мінеральному обміні, будучи регулятором обміну калію. Вона трохи збільшує проникність клітин для іонів калію, сприяючи його збереженню (калію) всередині, що є важливим фактором життєдіяльності м'язів. Окрім глутамінової кислоти здатністю підтримувати вміст калію в тканинах володіє аспарагінова кислота, але вважають, що її дія на калієвий обмін проявляється через глутамінову кислоту. Глутамін, на відміну від глутамату, не активує накопичення іонів калію, що змушує припустити, що саме γ -карбоксільна група глутамінової кислоти використовується для переміщення калію в клітину [21, 23].

Глутамат є найпоширенішою амінокислотою у нервовій тканині головного мозку і є одним з основних збуджуючих нейромедіаторів. Він бере участь у основних інформаційних потоках людини, а саме у процесах розпізнавання, пам'яті, навчання та запам'ятовування, розумового розвитку. З цим пов'язаний також глутамат, який відіграє важливу сигнальну роль у сенсорних процесах (зір та слух), у активації рецепторів смаку, а саме рецепторів умамі, які формують смак збагаченої протеїнами їжі [21].

Тобто, в основному глутамінова кислота служить для передачі процесів збудження. Однак через те, що вона використовується для отримання ще і гальмівних нейромедіаторів (наприклад, серотоніну – опосередковано через участь у синтезі триптофану), в більшості випадків вона не чинить високої збудливої дії. Під впливом ферменту глутамдекарбоксілази перетворюється у мозку на медіатор – гамма-аміномасляну кислоту, яка є не єдиним, але головним гальмівним нейромедіатором. Вона має виражену анаболічну дію на м'язові тканини, а також зменшує потребу клітин організму в кисні. Вона активізує безкисневе окиснення енергетичних субстратів шляхом окиснення та вивільнення великої кількості енергії в нервових клітинах, що необхідна в екстремальних ситуаціях (надмірного нервово-психічного перенапруження, фізичного навантаження, високої або низької температури, тяжкої інфекції).

Порушення транспорту глутамату є характерною рисою патогенезу майже всіх неврологічних захворювань [27-29].

Оскільки здатність організму боротися зі стресом в першу чергу обмежена енергетичними можливостями нервових клітин, в енергетичному аспекті глутамінова кислота проявляє дуже сильну антистресову дію як на центральну нервову систему, так на весь організм в цілому і є своєрідним адаптогеном [30].

Висновки до розділу 1

Промислове виробництво глутамінової кислоти обумовлене широким спектром галузей її застосування.

Дослідженнями, в тому числі клінічними, доведено, що глутамінова кислота бере активну участь у білковому та вуглеводному обмінах; вона стимулює окиснювані процеси, сприяє виведенню з організму людини аміаку, підвищує стійкість організму людини до гіпоксії.

Різноманітний асортимент лікарських засобів та біологічно-активних добавок на основі глутамінової кислоти підтверджує економічну доцільність її промислового виробництва. А широке використання харчових добавок, на її основі, робить це виробництво економічно вигідним.

Проведене у роботі порівняння способів отримання глутамінової кислоти виявило доцільність застосування у промисловому виробництві мікробіологічного синтезу.

РОЗДІЛ 2

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

2.1 Характеристика цільового продукту

Цільовий продукт – глутамінова кислота, належить до замінних аліфатичних амінокислот.



Рис. 2.1. Просторова будова глутамінової кислоти [8]

Брутто формула: $C_5H_9NO_4$

Зовнішній вигляд х.ч. речовини: порошок (кристали) білого кольору

Фізико-хімічні властивості:

Молекулярна маса: 147,13 г/моль

Щільність: 1,538 кг/м³

Температура плавлення: 205°C

Розчинність в воді: 7,5 г/л (при 20°C). Дуже погано розчиняється в холодній воді [8].

Глутамінова кислота як лікарський засіб.

Анатомо-терапевтично-хімічна система класифікації АТХ-код N07XX:

N – Засоби, що діють на нервову систему,

N07XX – Інші засоби, що діють на нервову систему.

Глутамінова кислота грає важливу роль в підтримці збалансованості кислотно-лужних компонентів в організмі. Глутамінова кислота присутня в організмі в досить великій кількості (до 25%) в складі білків і різних хімічних речовин, а також в незв'язаному вільному стані. У нормальному здоровому організмі глутамінова кислота з віком і при наявності різних патологій у

людини її рівень може знижуватися. В такому випадку необхідно додаткове споживання глютамінової кислоти при внесенні у раціон продуктів з високим її вмістом або у вигляді харчових добавок [9, 10]. Глутамінова кислота також є попередником ГАМК, важливого нейротрансмітера в центральній нервовій системі. Вона допомагає транспортувати калій в спинномозкову рідину і сама є збудливим нейротрансмітером.

L-глутамінова кислота використовується в середовищі MEM для культивування клітинних культур як компонент розчину незамінних амінокислот; використовується як джерело азоту для культури *Aspergillus fumigatus* NRRL 2436 для виробництва фумагіліну [11].

В умовах промислового виробництва за органолептичними показниками технічна L-глутамінова кислота повинна відповідати вимогам, зазначеним у таблиці 2.1. [12]

Таблиця 2.1

Органолептичні показники L-глутамінової кислоти

Найменування показників	Характеристика
Зовнішній вигляд	Кристалічна маса коричневого кольору
Смак	Кислий специфічний
Запах	Специфічний
Розчинність	Легко розчинна в розбавлених кислотах, лугах і гарячій воді, важко розчинна в холодній воді і концентрованої соляній кислоті, майже нерозчинна в етиловому спирті, ефірі і ацетоні.

За хімічними показниками технічна L-глутамінова кислота повинна відповідати вимогам, зазначеним у таблиці 2.2 [12].

Хімічні показники L-глутамінової кислоти

Найменування показників	Норми
Масова частка вологи,%, не більше	22,0
Масова частка L-глутамінової кислоти (у перерахунку на суху речовину),%, не менше	75,0
Масова частка хлоридів (у перерахунку на суху речовину),%, не більше	10,0

2.2 Характеристика біологічного агента *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum – грам позитивні бактерії, не рухливі. Фізично мають форму стрижня з кінцями, набряклими у формі, подібній до булави, однак можуть утворюватися класичні палички або коки, залежно від умов росту (рис. 2.2) [13].

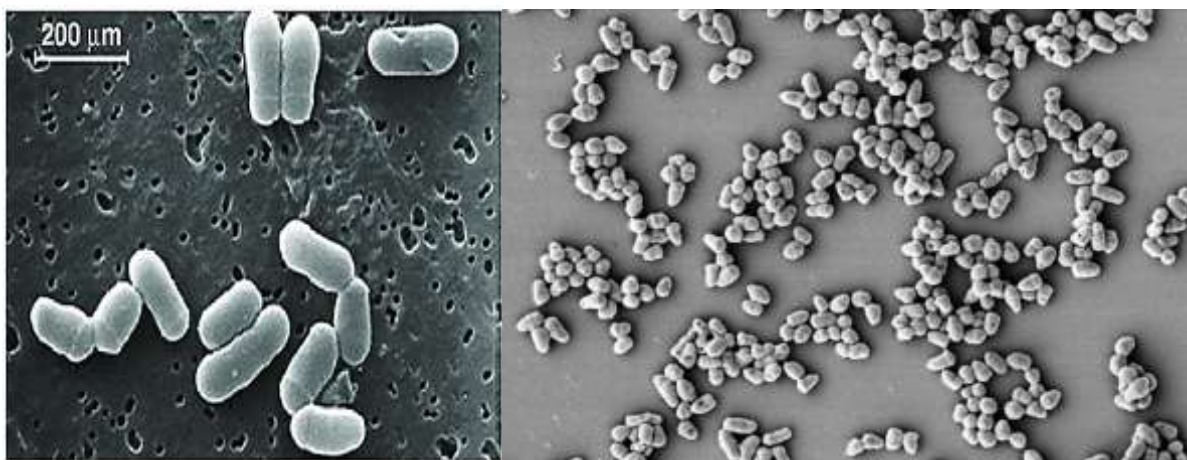


Рис. 2.2. Зовнішній вигляд та колонії *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum, як правило, утворюють метакроматичні гранули, що представляють собою фосфатні включення та гранули волютину. Розмір становить від 2 до 6 мкм в довжину і 0,5 мкм в діаметрі. Бактерії об'єднуються в характерний спосіб, який був описаний як форма «V». Джгутиків не мають, спор и капсул не утворюють [14].

2.2.1 Таксономічний статус *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum являє собою бактерію у вигляді палички, грам позитивної, факультативної анаеробної і присутньої в ґрунтах.

Corynebacterium glutamicum не утворює спори і не є патогенною.

Corynebacterium glutamicum з рештою *Corynebacteriaceae* і бактеріями родин *Mycobacteriaceae* і *Nocardiaceae* входить до групи CMN – бактерії медичного та ветеринарного значення [14].

Вид *C. glutamicum* вперше був відкритий в Японії і описаний Кіношіта і співавторами в 1958 році під назвою *Micrococcus glutamicus*. Пізніше у 1967 вид було перенесено до *Corynebacterium*.

Бактерії роду *Corynebacterium* відповідно таксономічного статусу розташовані в підряді *Corynebacterineae*. Цей підряд у свою чергу належить до порядку *Actinomycetales*, класу *Actinobacteria*.

Отже, за науковою класифікацією:

Тип – *Actinobacteria*;

Клас – *Actinobacteria*;

Ряд – *Mycobacteriales*;

Родина – *Corynebacteriaceae*;

Рід – *Corynebacterium*.

2.2.2 Морфолого-культуральні властивості *Corynebacterium glutamicum*

Клітини *Corynebacterium glutamicum* мають овальну форма. Вирощування колоній на МПА: через 3-5 діб за температури 30°C утворюються колонії діаметром 2-4 мм, жовтувато-кремові, поверхня гладка, форма опукла, край рівний, структура однорідна, тістоподібна.

Вирощування колоній на глюкозо-мінеральному середовищі Гловера (склад: лейцин, біотин, тіамін): через 3- 5 діб за температури 30°C утворюються колонії 1-2 мм, край рівний, структура однорідна, консистенція тістоподібна,

поверхня гладка, колір колоній світло-кремовий. Зростання штриха на вказаному середовищі через дві доби помірне [15].

Corynebacterium glutamicum – аеробні або факультативно анаеробні бактерії, хемоорганотрофи. Можуть використовувати вуглець з безлічі різних джерел, навіть з тих, які мають кілька ароматичних кілець. Через відмінності в доступності поживних речовин і джерел вуглецю, *C. glutamicum* має 127 білків, асоційованих з регуляторною функцією в транскрипції, яка, в свою чергу, контролює метаболізм. Містять каталазу і використовують ферментативний метаболізм для розщеплення вуглеводів, тому добре зростають на глюкозі, сахарозі, мальтозі, фруктозі, етанолі, оцтовій кислоті. Не зростають на ксилозі, лактозі, рафінозі, через відсутність ферментації цих речовин. Засвоюють азот у формі солей амонію і сечовини, не засвоюють нітратний азот. Не розріджують желатин.

Зростають *Corynebacterium glutamicum* за температури 24-40°C; оптимальна температура – 28-30°C.

Зростають *Corynebacterium glutamicum* на середовищах з рН від 6 до 8,5; оптимальне значення рН 6,8-7,2. При зростанні на середовищі потребують біотин, тіамін і L-лейцин [16].

Corynebacterium glutamicum стійкі до аналогу лізину S-(2-аміноетил), L-цистеїну.

Corynebacterium glutamicum стійкі до стрептоміцину.

Мають кільцеву хромосому і кругову плазмиду. Геном складається з 3314179 нуклеотидів.

Клітинна поверхня *Corynebacterium glutamicum* має товстий пептидоглікановий шар, який є і у інших грам-позитивних бактерій. Але у *Corynebacterium glutamicum* є другий додатковий бар'єр проникності, утворений двошаровою коротко ланцюговою міколієвою кислотою. Залишки миколю ковалентно зв'язуються з арабіногалактаном, іншим компонентом клітинної стінки, також є мезо-діамінопімелінові кислоти. На відміну від інших грам-позитивних бактерій, мають незначний або зовсім відсутній ріст циліндричної

клітинної стінки. Також відсутні актиноподібні елементи цитоскелета, які беруть участь у визначенні форми клітини та сегрегації хромосом у різних бактерій [17].

2.3 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

На основі культивування мікроорганізмів з метою здобуття чистих препаратів амінокислот застосовують промислові технології, що включають одно - і двоступінчатий синтез амінокислот. При одноступінчатому синтезі в промислових культиваторах вирощують регуляторні мутанти ауксотрофів, що є надпродуцентами тих або інших амінокислот. Після завершення робочого циклу їх вирощування, культуральну рідину відділяють від кліток мікроорганізмів, згущують і отримують з неї товарний продукт з високою концентрацією синтезованої мікробами амінокислоти. В процесі двоступінчатого синтезу амінокислоти спочатку отримують її попередник, а потім за допомогою ферментів мікроорганізмів перетворюють попередник на амінокислоту, при цьому утворюються лише L- ізомери. Як джерело ферменту можуть бути використані або суспензія кліток мікроорганізмів, або отриманий після руйнування цих кліток ферментний розчин [18-20].

2.3.1 Технологічна схема отримання глютамінової кислоти культурою *Corynebacterium glutamicum*

Принципова технологічна схема отримання глютамінової кислоти складається з наступних стадій (рис. 2.2):

1. отримання посівного матеріалу;
2. приготування поживного середовища, його стерилізація, охолодження і засів готовим посівним матеріалом;
3. вирощування продуцента в ферментаторі до накопичення максимальної кількості глютамінової кислоти;
4. відділення біомаси від культуральної речовини
5. випаровування та кристалізація глютамінової кислоти [21-37].

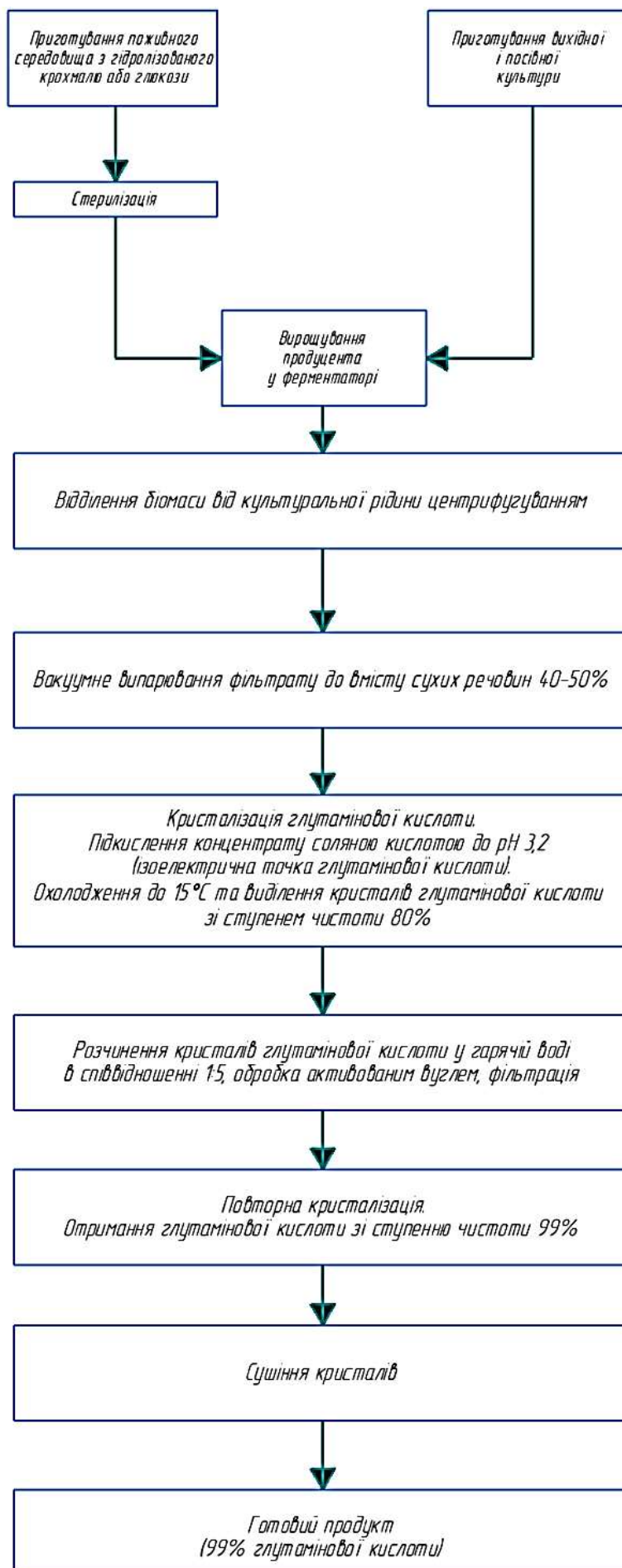


Рис. 2.2. Принципова схема отримання глютамінової кислоти

2.3.2 Приготування поживного середовища

Для промислового виробництва глютамінової кислоти можна використати кілька штамів *Corynebacterium glutamicum* та їх мутантів. Склад поживного середовища практично не змінний для різних штамів і залишається постійним на кожній з проміжних стадій отримання посівного матеріалу.

Основним джерелом вуглецю в середовищі найчастіше використовують мелясу, глюкозу, сахароза, гідролізати крохмалю. При цьому кількість засвоюваного цукру (в перерахунку на сахарозу) має складати 8,5-25,0 %. Використання меляси визначають вмістом у ній біотину. Концентрація біотину у мелясі не повинна перевищувати 2-5 мкг/л поживного середовища. Збільшення понад норму вказаного показника призведе до інтенсивного накопичування аланіну, молочної, бурштинової, аспарагінової кислот. Все перелічене призведе до різкого зростання приросту біомаси продуцента, з одночасним зниженням виходу глютамінової кислоти. Біотин у поживне середовище може бути внесений і з кукурудзяним екстрактом.

Як джерело азоту в поживних середовищах використовують хлорид амонію або сечовину. Сечовина при цьому є більш активним джерелом азоту. Сечовину слід вводити в поживне середовище з обережністю у кількості до 2,0 % в залежності від особливостей використовуваного штаму. Вводиться сечовина дрібно, у міру споживання її з середовища, і так, щоб вміст її в культуральній рідині не перевищувало 0,8 % і рН середовища було в межах від 6,8 до 7,2. Нестача азоту в середовищі призводить до зниження синтезу глютамінової кислоти і до накопичення в середовищі підвищених кількостей α -кетоглутарової кислоти.

Для нормального росту культури необхідно вводити у середовище солі калію і крейду для підтримки рН середовища на оптимальному рівні.

Тривалість культивування залежить від:

- вмісту сухих речовин в середовищі,
- одночасного або постадійного способу введення компонентів середовища,

- ступеня аерації середовища,
- фізіологічних особливостей продуцента [31].

Склад поживного середовища при виробництві посівного матеріалу при виробництві глютамінової кислоти представлено у табл. 2.1 [38].

Таблиця 2.1

Склад поживного середовища для посівного матеріалу

Компонент середовища	Вміст, %
Меляса	8,0
Кукурудзяний екстракт	0,3
Хлорид амонію	0,5
Калію фосфат двозаміщений	0,05
Сульфат магнію	0,03
Вода	інше
pH середовища	7,0–7,2

Склад поживного середовища на стадії біосинтезу глютамінової кислоти представлено у табл. 2.2 [38].

Таблиця 2.1

Склад поживного середовища для здійснення біосинтезу

Компонент середовища	Вміст, %
Меляса	20,0
Сечовина	до 2,0
Калію фосфат двозаміщений	0,05
Сульфат магнію	0,03
Крейда	1,0
Піногасник (синтетичний)	0,1
Вода	інше
pH середовища	7,0–7,2

2.3.3 Приготування вихідної та посівної культур

Посівний матеріал вирощують у суворо асептичних умовах. Приготування здійснюють спочатку в інокуляторах об'ємом 2 м^3 , а потім у посівних апаратах об'ємом 5 м^3 .

Посівний матеріал у кількості 5-6 % (від об'єму апарата) стерильно передають у виробничі ферментери об'ємом 50 м^3 . Коефіцієнт заповнення виробничого ферментеру при цьому повинен складати 0,7 [8].

2.3.4 Вирощування продуцента

Процес біосинтезу здійснюють у суворо асептичних умовах у ферментаторах. Тривалість вирощування у ферментаторі складає 48-52 годин, при цьому інтенсивної аерації – 80-85 мг O_2 /(л·хв.). Інтенсивність аерації показує витрати одиниці об'єму повітря на одиницю об'єму середовища за проміжок часу в 1 хв.

Температуру культивування в $28\text{-}30^\circ\text{C}$ підтримують на всіх стадіях вирощування продуцента.

Ефективність синтезу глютамінової кислоти значною мірою залежить від компонентів та їх кількості у ферментаційному середовищі. Синтез глютамінової кислоти залежить від концентрації меляси. При концентрації меляси 2- 4% фізіологічні параметри за глютаміновою кислотою дорівнюють 0, при цьому всі вуглеводи використовуються для росту бактеріальної маси. Із зростанням концентрації меляси спостерігається нарощування біомаси, поступово, при цьому зростає активність культури за синтезом глютамінової кислоти. Максимальної активності культура досягає при концентрації цукру $100,64 \text{ г/дм}^3$. Після досягнення максимуму, активність культури зменшується тим більше, чим вища концентрація цукру в середовищі. Коефіцієнт використання цукрів максимальний за мінімальної концентрації вуглеводів. На середовищах із вмістом цукру до 100 г/дм^3 розмноження культури завершується впродовж 24 годин. У наступні 24 години приріст біомаси складає не більш 10 % залишкової кількості культури в культуральній рідині.

При зависокій концентрації цукру розмноження культури уповільнюється, приріст біомаси на другу добу біосинтезу становить 30-50 %.

Синтез глютамінової кислоти – процес обернений. За першу добу ферментації глютамінова кислота накопичується в незначній кількості; після другої доби – спостерігається різке зростання її концентрації. Коли ріст біомаси завершений, необхідно додатково вносити поживні речовини на другій стадії процесу ферментації.

У кінці процесу біосинтезу готова культуральна рідина містить до 45 г/л глютамінової кислоти.

Вихід глютамінової кислоти по відношенню до спожитих цукрів складає 45-50%.

Після закінчення ферментації культуральна рідина з біомасою надходить в реактор з мішалкою. Культуральну рідину підкислюють концентрованою сульфатною кислотою до рівня рН 1,5-2,0. Для попередження сильного утворення піни і нагрівання сульфатну кислоту вводять невеликими порціями, періодично перемішуючи рідину впродовж 30-40 хв. Підкислена культуральна рідина подається до фільтраційного обладнання для відокремлення осаду у вигляді біомаси й мінеральних домішок. Отриманий фільтрат збирається у спеціальний збірник.

2.3.5 Характеристика етапів відділення глютамінової кислоти

Відділення глютамінової кислоти з культуральної рідини і подальше її очищення передбачає послідовність проведення технологічних операцій, наведених на рис. 2.3 [38].

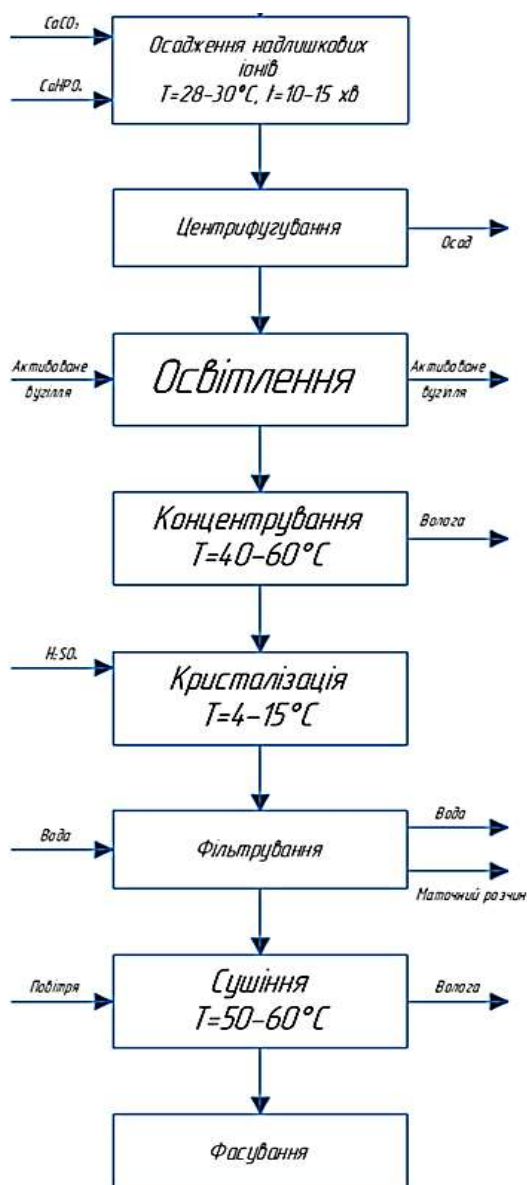


Рис. 2.3. Етапи відділення глютамінової кислоти

Осадження надлишкових іонів здійснюється у результаті додавання негашеного вапна або вапняного молока з наступним осаждением надлишку іонів кальцію фосфорною кислотою. Утворений при цьому осад сприяє кращому відділенню клітин продуцента та інших баластних домішок.

Центрифугування проводять із застосуванням центрифуги. При цьому здійснюють відділення «бідних» фракцій від «багатих». «Бідні» фракції вміщують початкові та кінцеві об'єми елюату; концентрація глютамінової кислоти у фракції складає не більше 15-20 г/дм³. «Багаті» фракції вміщують

глутамінову кислоту у кількості 30-120 г/дм³.

Освітлення фільтрату передбачає очищення від пігментних домішок, що зафарбовують нативний розчин у темний колір. Для освітлення використовують обробку фільтрату активованим вугіллям.

Концентрування освітленого розчину глутамінової кислоти здійснюють шляхом його вакуум-випарювання за температури 40-60°C, при цьому з вихідного розчину глутамінової кислоти відганяють 50-80 % води.

Осадження кристалів глутамінової кислоти в ізоелектричній точці здійснюють шляхом підкислення концентрату соляною кислотою до рівня рН 3,2. Саме такому рівню рН відповідає ізоелектрична точка глутамінової кислоти. Розчину після цього охолоджують до температури 4-15 °С. Одноразове проведення операції забезпечує кристалізацію 77 % глутамінової кислоти; повторне – 87 %. Чистота одержуваних кристалів глутамінової кислоти складає 88 %.

Подальша перекристалізація може збільшити чистоту одержуваних кристалів до 99,6 %.

Відділення кристалів глутамінової кислоти досягається фільтрацією на дисковому фільтрі. Отримані кристали промивають водою і направляють на сушку.

Сушку кристалів глутамінової кислоти здійснюють у дисковій розпилювальній сушарці за температури 50-60 °С.

2.3.6 Обґрунтування вибору технологічного обладнання для отримання глутамінової кислоти

На стадії **ферментації** використовуємо біореактор (ферментер), оснащений необхідним контрольним і вимірювальним обладнанням: датчиками рівня рН, температури, тиску, розчиненого кисню, рівня піни. Конструкція ферментера розроблена таким чином, щоб виключити наявність мертвих зон, які можуть викликати проблеми під час процесу. Внутрішня частина ферментера відполірована до дзеркального блиску. Вона сконструйована з

листового металу, має зварні шви, перегородки і змішувач, що значно полегшує стерилізацію й очищення.

Ферментер оснащений турбіною Раштона – змішувачем, що складається з горизонтального диска та вертикально встановлених на ньому лопатей. Для збільшення ефективності перемішування можна встановити кілька змішувачів або застосувати перегородки всередині ємності.

Біореактор оснащений рядом підсистем: лінією подачі стерильного газу; системою термостатування і парової стерилізації; системою дозування поживних речовин і інокуляту; системою контролю рівня рН і рівня піни, системою очищення «Clean-In-Place». Корпус біореактора обов'язково має оглядові вікна, лампи, кількість і розташування яких залежить від потреб замовника і особливості підприємства.

Наявна у біореактора система автоматичного управління дозволяє програмувати процес, контролювати поточні значення вимірюваних параметрів. Система автоматичного управління оснащена великим сенсорним екраном з вбудованим PLC, що дозволяє відстежувати графіки і параметри процесу.

Для біосинтезу запропоновано використання біореактору (рис.2.4.), який забезпечує:

- стерильне проведення процесів,
- контроль температури, рівня рН, тиску у системі,
- аерацію,
- видалення піни.

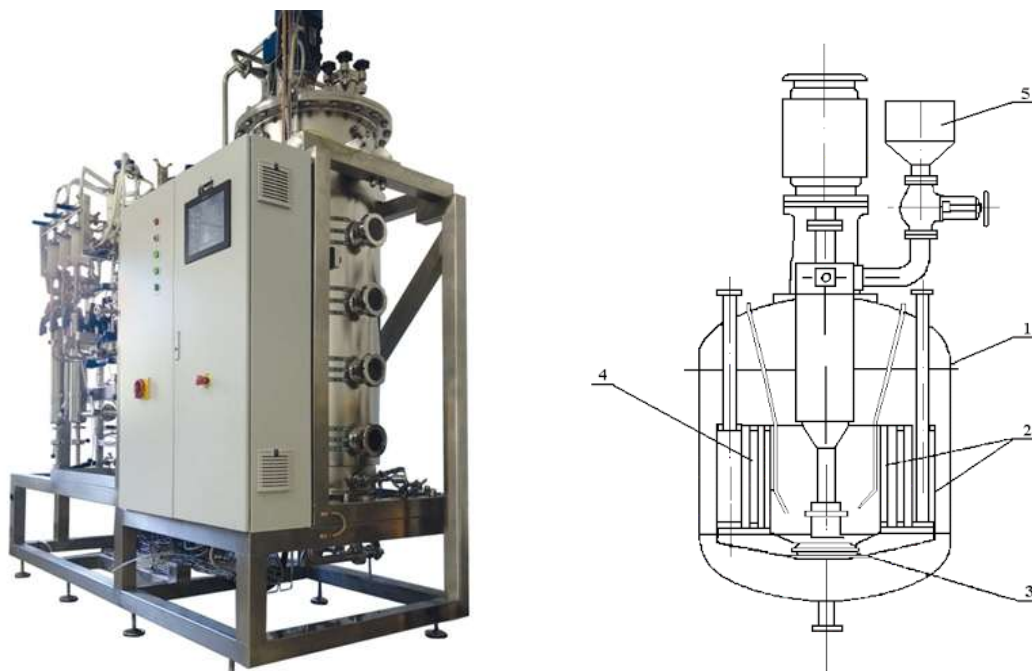


Рис. 2.4. Загальний вигляд та схема ферментеру:

1 – корпус, 2 – дифузор, 3 – мішалка, 4 – теплообмінник, 5 – фільтр

На стадії **осадження надлишкових іонів запропоновано використання** ємнісного реактора з механічним перемішуванням. Реактори можуть бути вертикальними і горизонтальними. В роботі використано вертикальний циліндричний апарат з якірною мішалкою, вісь обертання якої співпадає з віссю корпусу (рис.2.5).

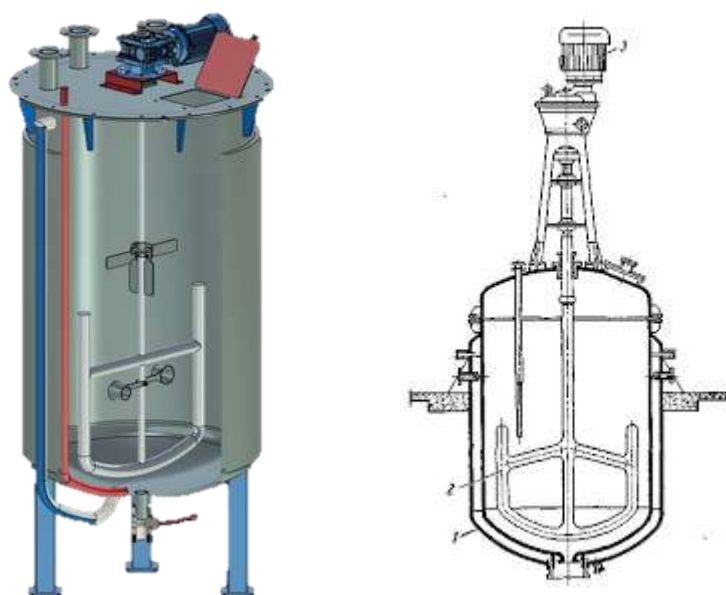


Рис. 2.5. Загальний вигляд та схема ємнісного реактора з якірною мішалкою

Апарат обладнаний паровою сорочкою для підтримання температури реакційної суміші.

На стадії **центрифугування** запропоновано використання вертикальної центрифуги періодичної дії (рис. 2.6).

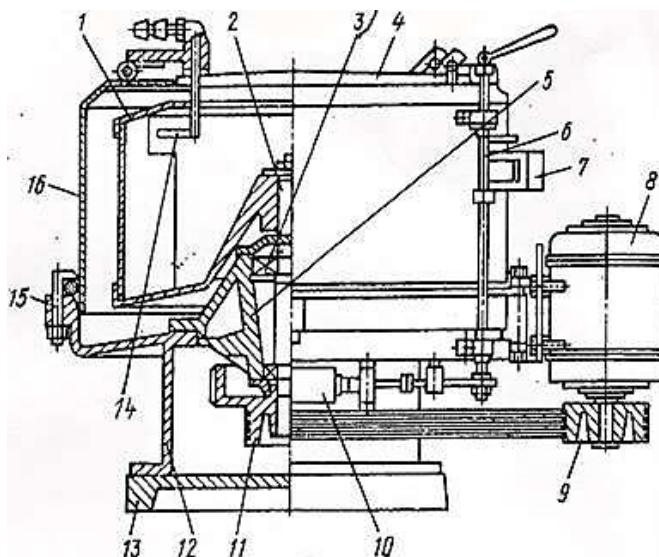


Рис. 2.6. Схема вертикальної центрифуги періодичної дії:

1 – ротор, 2 – опорний вал, 3 – підшипник, 4 – кришка кожуха,
 5 – нерухомий корпус жорсткої опори підшипників, 6 – блокувальний пристрій,
 7 – пусковий пристрій, 8 – електродвигун, 9 – шків, 10 – стрічкове гальмо,
 11 – ведений шків, 12 – станина, 13 – несуча плита, 14 – відвідна труба для
 фугату, 15 – фасонні болти кріплення кожуха, 16 – кожух

Через живильну трубу в кришці 4 ротора суспензія подається на днище ротора і при його обертанні заповнює робочу частину ротора під дією відцентрових сил. У міру просування суспензії знизу вгору частинки твердої фази осідають на внутрішній поверхні ротора. Після заповнення ротора осадом на 75-85 % центрифугу зупиняють, а осад з ротора видаляють (вручну) через верхній отвір.

На стадії освітлення запропоновано використання свічкового фільтру (рис. 2.7). Фільтрація здійснюється за допомогою фільтрувального засобу з активованим вугіллям на вертикальних фільтрових свічках. Свічковий фільтр характеризується високою ефективністю фільтрації.

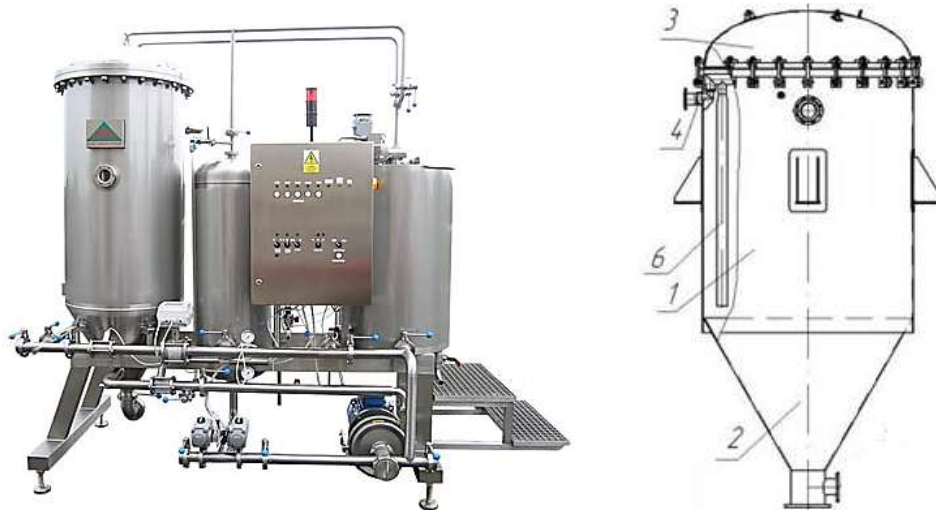


Рис. 2.7. Зовнішній вигляд та схема свічкового фільтру:

1 – циліндр, 2 – конічне дно, 3– сферична кришка, 4 – штуцер, 6 – патрон

Залежно від складу шару фільтру можна досягти різних ступенів освітлення та варіювати потік рідини, що фільтрують. Фільтри можуть бути оснащені приладами для автоматизації процесу. Рекомендована швидкість потоку для фільтру складає 1500-2200 л/год.

Свічка є циліндричним елементом, виготовленим із дроту з неіржавіючої сталі. Дріт має специфічний трапецієподібний переріз, що забезпечує його високу деформаційну стійкість і довговічність. Відповідно, результатом є висока ефективність фільтрації, можливість використання фільтра для тонкої або грубої фільтрації. Фільтрація свічковим фільтром забезпечує невисоку вартість фільтруючого матеріалу і економію при експлуатації.

Для **кристалізації** запропоновано використання вертикального кристалізатору з рамною мішалкою (рис. 2.8).

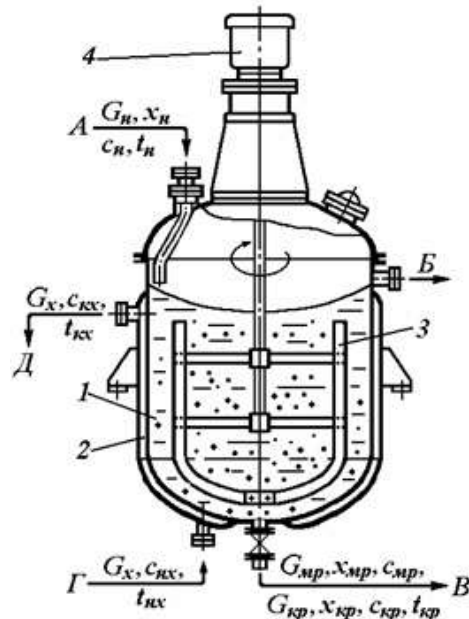


Рис. 2.8. Загальний вигляд та схема кристалізатору з рамною мішалкою:
 А – подача розчину, Б – відведення сокової пари, В – відведення кристалічної суспензії, Г – подача гострої пари, Д – відведення конденсату; 1 – корпус, 2 – сорочка обігрівальна парова, 3 – мішалка, 4 – привід мішалки

На стадії **висушування** застосована розпилювальна сушарка (рис. 2.9). Такий тип сушарки застосовується для сушіння вологих сипких продуктів. Корпус сушарки 9 являє собою циліндричний апарат з конічним днищем. Розчин розпилюється відцентровим пристроєм 13 за допомогою диска 10. Сушильний агент подається у верхню частину установки по газовідвідній трубці 7, на кінці якої встановлений диспергатор 8, призначений для створення в сушильній камері обертального руху теплоносія і його кращого контакту з продуктом. Розпорошені краплі продукту підхоплюються потоком і спрямовуються вниз. Волога випаровується, дрібний висушений порошок осідає в конусному днищі, через розвантажувальний пристрій 1 надходить в систему пневмотранспортування. Для струшування частинок, що осіли на стінках, встановлені вібратори 17. Відпрацьований теплоносієм видаляється

через газовідвідну трубку 2. Для огляду апарату передбачені візок 4, світильник 6, двері 5. На корпусі 9 змонтовані запобіжні клапани 3 і 18 у вигляді відкидаються дисків і патрубки 12 для вихлопу сушильних газів при різкому збільшенні тиску. Для змащення відцентрово-розпилювального пристрою 13 у верхній частині встановлений масляний фільтр 14. Підйом розпилювального пристрою здійснюється електроталю 15, що закріплена на шатрі 16.

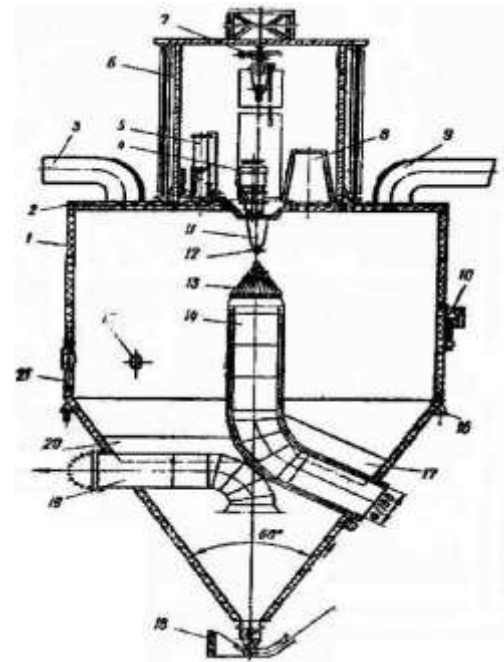


Рис. 2.9. Загальний вигляд та схема розпилювальної сушарки

Загальна технологічна схема виробництва глютамінової кислоти представлена на рис. 2.10.

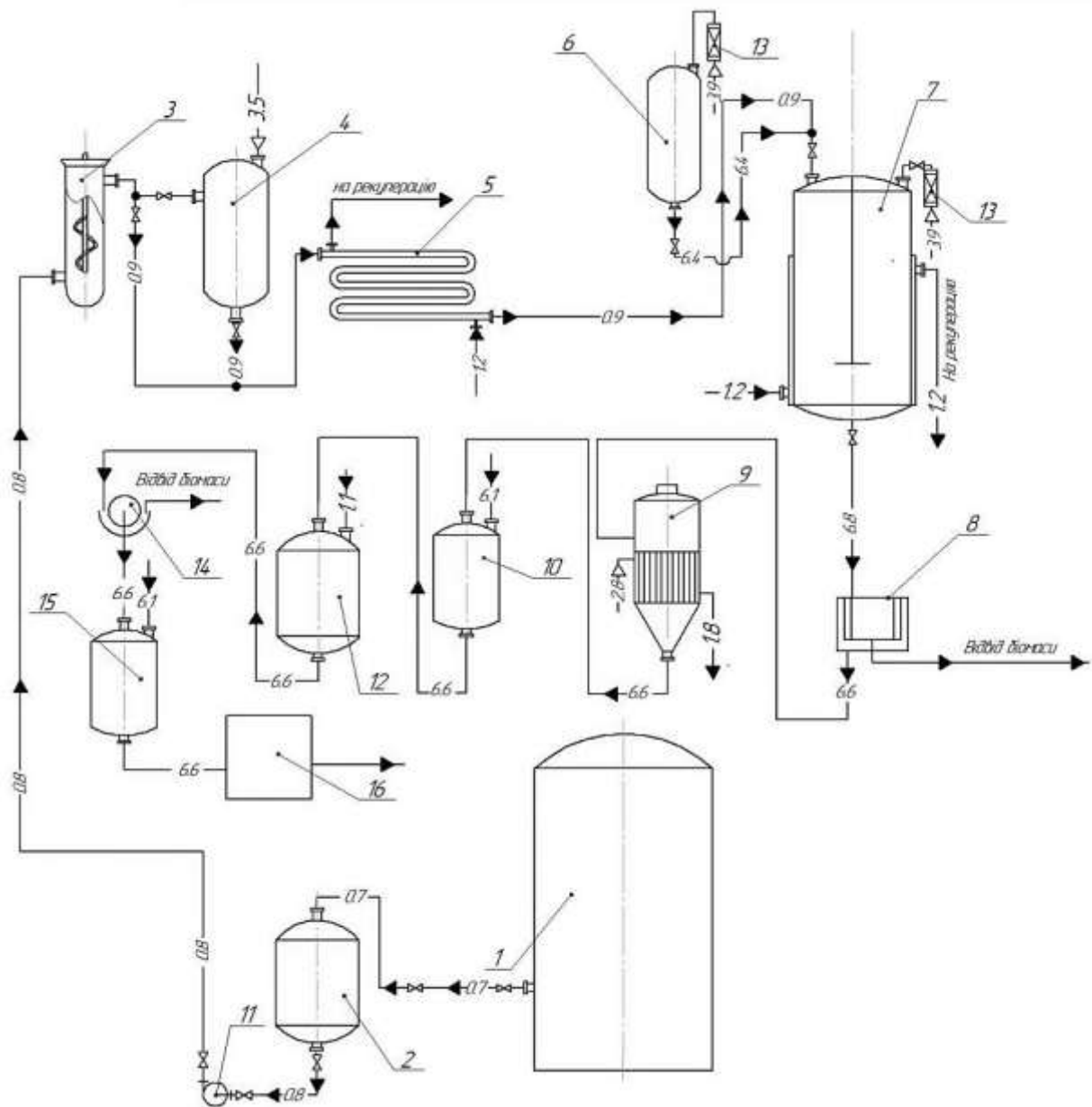


Рис. 2.10. Технологічна схема виробництва глютамінової кислоти [32]:
 1 – сховище м'яса; 2,12 – реактор-змішувач; 3 – стерилізаційна колона;
 4 – витримувач; 5 – теплообмінник; 6 – посівний апарат; 7 – ферментер;
 8 – центрифуга; 9 – випарний апарат; 11 – насос; 10,15 – кристалізатор;
 13 – індивідуальний повітряний фільтр; 14 – барабанний-вакуум фільтр;
 16 – сушарка

Для отримання глютамінової кислоти зі сховища м'яса 1 відбирають розраховану кількість м'яса та направляють у реактор змішувач 2. В реакторі-

змішувачі 2 поживне середовище переміщується з мінералами сполуками. Далі середовище подається до системи стерилізації. Ця система складається з стерилізаційної колони 3 та витримувача 4. Після чого середовище охолоджують в теплообміннику 5.

Частина середовища з теплообмінника надходить у інокулятор 6. Інша частина разом з посівним матеріалом з інокулятора надходить до ферментера 7. Повітря для аерації подається через індивідуальній повітряний фільтр 13.

З ферментера культуральна рідина потрапляє на центрифугу 14. В вакуум-випарному апараті 9 здійснюється концентрування рідини.

В кристалізаторі 10 відбувається попередня кристалізація з підкисленням сульфатною кислотою. Далі в реакторі-змішувачі 12 глютамінову кислоту змішують з водою, щоб на кристалізаторі 15 отримати більший відсоток виходу чистої глютамінової кислоти. На барабанному вакуум фільтрі 14 відділяють надлишкову рідину. В сушарці 16 проводиться сушка глютамінової кислоти.

Висновки до розділу 2

Бактерії роду *C. glutamicum* широко використовують в промисловості для виробництва амінокислот, у тому числі глютамінової кислоти.

При промисловому культивуванні в якості джерела вуглецю запропоновано використання меляси. Відповідно до цього обрано одно стадійний спосіб отримання глютамінової кислоти.

Запропонована промислова технологічна схема отримання глютамінової кислоти налічує наступні стадії: отримання посівного матеріалу; приготування поживного середовища, стерилізація поживного середовища, охолодження і засів готовим посівним матеріалом; вирощування продуцента в ферментаторі; виділення глютамінової кислоти у кристалічному вигляді, сушка кристалів.

РОЗДІЛ 3 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Виробництво лікарських засобів, харчових добавок і хімічних реактивів високого ступеня чистоти із застосуванням мікробного синтезу здійснюється відповідно методик, зазначених у технологічних регламентах і виробничих інструкціях. Виробництво лікарських засобів здійснюють з урахуванням принципів і правил належної виробничої практики (Good Manufacturing Practice, GMP). Система GMP – необхідна умова для отримання готової продукції належної якості відповідно до реєстраційної та ліцензійної документації.

Контроль у процесі виробництва не повинен заважати та негативно впливати на здійснення технологічного процесу і якість продукції. На всіх стадіях технологічного процесу, включаючи стадії, що передують стерилізації, необхідно проводити заходи, які зводять до мінімуму мікробну контамінацію.

3.1 Контроль на стадії біосинтезу

1 етап контролю – перевірка на чистоту виробничих приміщень і персоналу.

2 етап – перевірка обладнання. Обладнання миють, ополіскують, дезінфікують, стерилізують, проводять технічний огляд справності обладнання, його герметичності.

3 етап – перевірка лабораторією підприємства якості вихідної сировини та мікробіологічної чистоти поживного середовища. Перевірку якості сировини здійснює лабораторія.

Джерела води, оснащення для обробки води, якість води регулярно контролюють на мікробіологічну та хімічну контамінацію, за необхідності – на контамінацію ендотоксинами. Застосовувана на виробництві вода за якістю, має відповідати вимогам нормативно-технічної документації.

Будь-який газ, що контактує під час технологічного процесу з розчинами або іншою проміжною продукцією, має пройти стерилізаційне фільтрування.

Матеріали, яким властиве утворення волокон з їхнім можливим викидом у навколишнє середовище, не повинні застосовувати у «чистих» приміщеннях. При здійсненні технологічного процесу в асептичних умовах використання таких матеріалів повністю заборонене.

Перерви між початком приготування розчинів і їх стерилізацією (стерилізаційною фільтрацією) повинні бути мінімальними, обмеженими у часі. Препарати, що містять живі мікроорганізми, забороняється виготовляти і пакувати у приміщеннях, призначених для виробництва інших мікробіологічних препаратів.

Для кожного продуцента складають оптимальне поживне середовище, яке повинне відповідати ряду вимог: забезпечувати максимальне утворення цільового продукту; складатись з відносно дешевих компонентів; мати достатню фільтруючу здатність; забезпечувати використання найбільш економічних прийомів виділення й очищення.

Стерилізацію поживного середовища у промислових умовах здійснюють двома способами: періодичним і безперервним.

Поживне середовище готують і стерилізують у дві стадії з урахуванням властивостей компонентів, що входять до його складу. Стадія підготовки і стерилізації середовища складаються зі змішування компонентів середовища в певній пропорції за допомогою спеціальних дозаторів в реакторі, розчинення солей при перемішуванні, нагріву до температури стерилізації, витримки при цій температурі впродовж 1 години, охолодження до температури, при якій проводиться культивування продуцента глютамінової кислоти.

Термолабільні компоненти середовища, наприклад мелясу, стерилізують окремо. Для цього у реактор з мішалкою подають мелясу і нагрівають її при постійному розмішуванні до температури 80°C. При нагріві періодично додають до розчину воду. Стерилізацію здійснюють шляхом швидкого розігріву отриманого розчину гострою парою до 120-122°C у спеціальному

апараті, витримують при вказаній температурі певний час, необхідний для повної загибелі всієї мікрофлори. Охолоджений розчин стисненим стерильним повітрям передають в попередньо підготовлений ферменстер. Температура стерилізації м'яса вища, а тривалість менша, ніж ті ж параметри при стерилізації інших компонентів середовища.

Піногасник, який використовують на стадіях культивування продуцента теж стерилізують окремо. Це пов'язано з тим, що режими стерилізації при обробці піногасника більш жорсткий, ніж це прийнято для стерилізації будь-яких поживних середовищ.

На біосинтез глютамінової кислоти істотний вплив чинять ступінь аерації середовища, інтенсивність перемішування, рівень рН середовища, тривалість і температура ферментації, вік і витрати посівного матеріалу. Тому на всіх стадіях біосинтезу всі перелічені параметри культивування суворо регламентуються і контролюються. Контролю підлягає також зміна основних компонентів середовища, накопичення біомаси та глютамінової кислоти.

Рівень рН середовища контролюють особливо уважно. Продуцентами є бактеріальні штами, а тому оптимальний рівень рН для культивування лежить в певних межах. Для всіх відомих продуцентів глютамінової кислоти рівень рН, що забезпечує максимальну зростання культури й акумуляцію глютамінової кислоти, лежить в межах від 6,0-8,5. Найкращих результатів з біосинтезу глютамінової кислоти досягають, якщо рН середовища підтримують на рівні 7,0-7,2 [39].

У процесі біосинтезу здійснюють біологічний контроль, який враховує споживання організмом основних поживних компонентів середовища (джерел нітрогену, вуглецю, фосфору). Контроль здійснюють за допомогою автоматичних комп'ютерних систем.

Постачання зростаючої культури киснем також є важливим фактором, що впливає на ріст мікроорганізму. Кисень, що використовується бактеріальною клітиною, повинен бути розчинений в живильному середовищі. Для збільшення розчинності кисню здійснюють барботування повітрям середовища з одночасним його перемішуванням.

Контроль за ходом технологічного процесу здійснюють на всіх етапах його проведення. При цьому визначають: оптичну щільність розчину культуральної рідини (за вмістом клітин продуцента), склад субстрату в суміші. Контролюють сигнали датчиків рівня рН і розчиненого кисню в ферментаційному середовищі. В кінці процесу біосинтезу вміст глютамінової кислоти у культуральній рідині досягає 45 г/л, а концентрація остаточного субстрату при цьому складає не більше 0,5-1,0% [37].

3.2 Контроль готового продукту

На промисловому підприємстві функціонує незалежна служба контролю якості та дослідна лабораторія. Лабораторія відокремлена від виробничих приміщень та інших лабораторій (мікробіологічної, біологічної). Готова продукція не реалізується доти, доки її якість не буде визнана задовільною і відповідати паспорту якості (табл. 3.1).

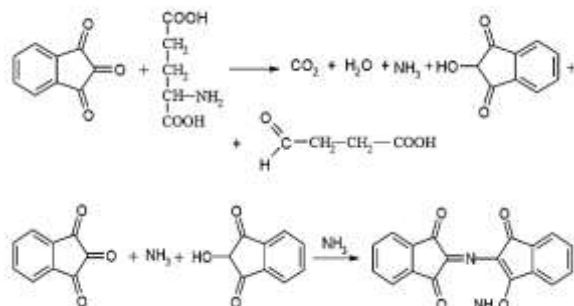
Таблиця 3.1.

Паспорт якості L-глютамінової кислоти [33]

Фізичні і хімічні показники	
Агрегатний стан	твердий
Форма	порошок, кристали
Колір	білий
Запах	характерний
рН	3,0 - 3,5 (10% водний розчин, 25 °С)
Температура плавлення	213 °С
Самозаймання	Матеріал є горючим, але без властивостей самозаймання
Тиск газу	<0,001 Па при 20 °С
Густина	1,54 г/см ³ при 20 °С
Об'ємна густина	460 кг/м ³
Розчинність у воді	8,6 г/л при 25 °С
Поверхневий натяг	74,2 мН/м

В лабораторіях застосовують одночасно кілька методів для ідентифікації глютамінової кислоти. Перелік методів для ідентифікації доволі широкий.

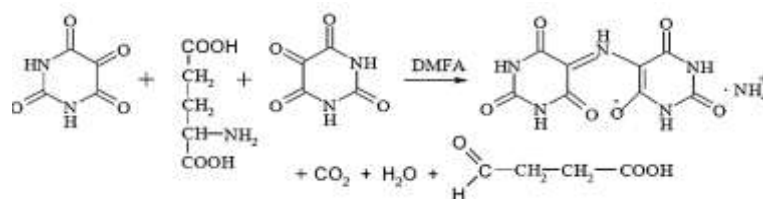
Для ідентифікації глютамінової амінокислоти використовують кольорову реакцію з нінгідрином [34]. В результаті реакції (загальної для амінокислот) утворюється амонійна сіль енольної форми:



Утворена сіль дікетогідринденкетогідрінаміну має синьо-фіолетове забарвлення.

Метод інфрачервоної спектроскопії дозволяє лабораторії провести ідентифікацію й оперативний контроль вихідної сировини і готової продукції. Метод інфрачервоної спектроскопії є фармакопейним методом для ідентифікації глютамінової кислоти. Глутамінову кислоту визначають за збігом смуг пропускання в області $4000\text{-}400\text{ см}^{-1}$ [34].

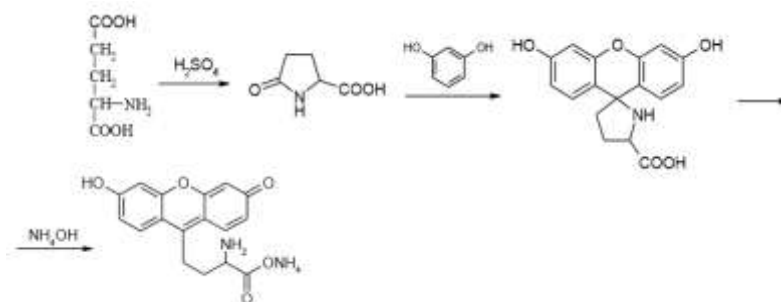
Ідентифікацію глютамінової кислоти можна проводити спектрофотометричним шляхом. В основі дослідження лежить взаємодія глютамінової кислоти з алоксаном у середовищі вода-диметилформамід [34]:



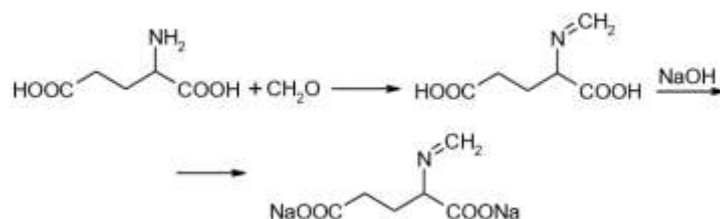
Продуктом реакції є забарвлений комплекс з максимумом поглинання на рівні 450 нм.

Для ідентифікації глютамінової кислоти використовують кольорову реакцію з резорцином в присутності концентрованої сульфатної кислоти. При дії концентрованої сульфатної кислоти на глютамінову кислоту відбувається внутрішньо молекулярна дегідратація з отриманням піролідонкарбонової

кислоти, яка конденсується з резорцином. В результаті – виходить сплав червоного кольору, що розкладається в аміачних розчинах, після чого – набуває флуоресцентного фіолетово-червоного забарвлення з зеленим відтінком [34].

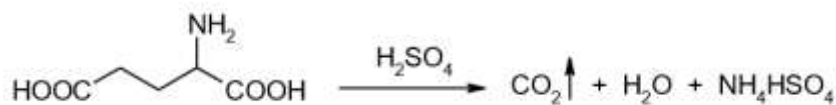


Для встановлення кількості глутамінової кислоти можна використати метод формолового титрування (метод Серенсена). До глутамінової кислоти додають нейтралізований (перевірка фенолфталеїном) розчин формальдегіду. В результаті реакції аміногрупа блокується й утворюється N-метіліденове похідна – азометин. Після чого проводять титрування розчином луку [35]:

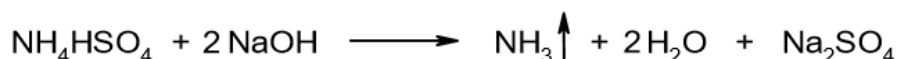


Метод К'ельдаля теж можна застосовувати для визначення глутамінової кислоти. Суть методу полягає в розкладанні глутамінової кислоти до NH_4HSO_4 . При цьому методика дослідження налічує чотири етапи:

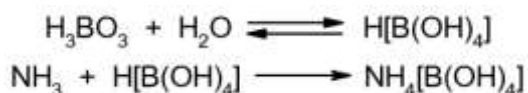
1) Мінералізація – нагрівання з концентрованою сульфатною кислотою:



2) Розкладання гідросульфату амонію гідроксидом натрію до аміаку, його відгонка у колбу-приймач:



3) Взаємодія аміаку в приймачі з борною кислотою з утворенням тетрагідроксоборату амонію:



4) Кількісне титрування тетрагідроксоборату амонію 0,1 М розчином соляної кислоти для визначення азоту:



Для проведення куприметричного титрування застосовується реакція глютамінової кислоти з іонами міді (II). Реакція супроводжується появою хелатних комплексів. Іони водню, які виділяються при цьому, нейтралізують фосфатним або боратним буфером. Надлишок іонів міді видаляють у вигляді осаду малорозчинної солі або гідроксиду. Встановлюють кількість міді в утвореному комплексі з амінокислотою [36].

Кольорова реакція глютамінової кислоти з алоксаном використовується для фотоколориметричного визначення. Для визначення отримують забарвлені розчини стандартних зразків – переводячи їх у амонієву сіль пурпурової кислоти. Вимірявши на фотоколориметрі оптичну густину, будують калібрувальний графік залежності інтенсивності поглинання забарвлених розчинів від їх концентрації. Потім проводять вимірювання оптичної густини досліджуваного зразка і за калібрувальним графіком розраховують вміст глютамінової кислоти [36].

3.3 Екологічна складова

При виробництві L-глютамінової кислоти, в навколишнє середовище в складі конденсату і викидів з ферментера потрапляють: бутиловий спирт, метилбутиловий кетон, фенол, піридин, крезол, циклогексиламін, ізомасляна та пропіонова кислоти та інші речовини.

Виробництво амінокислот характеризується утворенням великої кількості відходів у вигляді розчинних органічних речовин. Вказані відходи можуть забруднювати або призводити до псування водойм за рахунок зменшення концентрації розчиненого кисню. Технологічні стоки і промивні води, що містять клітини продуцента, амінокислоти та інші компоненти культуральної

рідини, а також залишки глютамінової кислоти, об'єднують, упарюють, висушують з наповнювачем до залишкової вологості 10 %. При цьому отримують препарат, який використовують як кормову добавку, що містить до 40 % білкових речовин [39]. Для підприємства реалізація побічної продукції є економічно вигідною і збільшує розмір отриманого підприємством прибутку [37].

Обробка рідких відходів може включати комплекс фізичних, хімічних та біологічних методів очищення. Застосовують такі методи, як осадження і механічне відстоювання, фільтрацію, флотацію, флокуляцію, зворотний осмос, іонообмінну обробку, поглинання на вугіллі (або кізельгурі). Широкого використання набули методи, що включають біологічну очистку стічних вод, застосування аеробних біофільтрів, іригацію при розбризкуванні, використання біоплато.

Відходи з високим значенням рН нейтралізують. Або застосовують усереднення відходів, поєднуючи кислотні та лужні стоки. За необхідності підприємство може використовувати відходи суміжних виробництв [37].

Для запобігання поширенню неприємного запаху від підприємства застосовують абсорбери або скрубери.

Висновки до розділу 3

Контроль виробництва на підприємстві здійснюють з метою забезпечення відповідності готової продукції вимогам нормативно-технічної документації.

Контролю на підприємстві підлягає персонал та використовуване технологічне обладнання. Вихідні компоненти, параметри біосинтезу, якість цільового продукту.

Контрольні заходи на стадії біосинтезу та контроль якості готової продукції здійснює на підприємстві служби якості, і підпорядковані їй лабораторії. На підприємстві регламентується дотримання чітких правил щодо забезпечення екологічності функціонування підприємства.

ВИСНОВКИ

1. У роботі досліджено властивості глютамінової кислоти та способи її промислового виробництва. Визначено галузі застосування глютамінової кислоти.

2. Вивчено властивості *Corynebacterium glutamicum*. Обґрунтована придатність *Corynebacterium glutamicum* до виробництва глютамінової кислоти.

3. Визначено склад поживного середовища для здійснення виробничого біосинтезу глютамінової кислоти. Основними елементами поживного середовища визначено мелясу та сечовину. Склад поживного середовища для культивування *Corynebacterium glutamicum* передбачає також наявність мінеральних солей та органічних сполук. Обрано раціональні параметри культивування: температура 28-30 °С, тривалість 48-52 год., рН 7,0 - 7,2, передбачена інтенсивна аерація середовища.

4. Обґрунтовано вибір ферментеру з турбінною мішалкою та барботером. Запропоновано використання ємнісного реактора з якірною мішалкою для осадження іонів, вертикальної осаджувальної центрифуги, свічкового фільтру для освітлення, ємнісного реактора з рамною мішалкою для кристалізації, розпилювальної сушарки для сушіння кристалічної маси продукту з наступним пакуванням її у пластикові бочки.

5. Обґрунтовано методи контролю на виробництві.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Глутаминовая кислота (Acidum glutaminicum) / Компендиум: лекарственные препараты. Справочник ЛС № 1 в Украине. URL: <https://compendium.com.ua/info/61080/glutaminovaja-kislota/>
2. Путро Л. М., Котко Д. Н., Гончарук Н. Л. Аминокислоты, аминокислотные смеси, применяемые в практике спорта высших достижений (достоинства и недостатки). Спортивна медицина і фізична реабілітація. 2019. № 1. С. 74 - 80.
3. Глутамінова кислота. URL: https://uk.wikipedia.org/wiki/Глутамінова_кислота
4. Трухан И. С. Питательная среда как ключевой фактор культивирования клеток млекопитающих. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2018. № 12/1. С. 165 - 172.
5. Kinoshita S Glutamic acid bacteria. In: Demain AL, Solomon NA (eds) *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. 1985. P. 115 - 140.
6. Characterization of developmental colony formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008. Vol. №81(1). P. 127.
7. Горячковский А. М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике: справочное пособие. Одесса: Экология, 2005. 607 с.
8. Курбат М. Н. L-Глутамат: современный взгляд на известную аминокислоту. *Нейрохимия*, 2009. Т. 26, № 3. С. 202-207.
9. Климович И. И., Дорошенко Е .М., Страпко В. П., Смирнов В. Ю. Аминокислоты в лечении биллиарной патологии (обзор литературы). *Журнал ГрГМУ*. 2008. № 1. С. 14.
10. Okwudiri O. O. Monosodium Glutamate Induces Oxidative Stress and Affects Glucose Metabolism in the Kidney of Rats. Onyema Oscar Okwudiri, Alisi Chinwe Sylvanus, Ihetuge Adaeze Peace. *International Journal of Biochemistry Research & Review*. 2012. Vol. 1, № 2. P. 1 - 11.

11. Салига Н. О. Активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту в щурів за дії L-глутамінової кислоти. *Український біохімічний журнал*. 2013. Т. 85, № 4. С. 40 - 47.

12. Державна фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». Харків: РІРЕГ, 2001. Доп. 1. 2004. 520 с.

13. Западнюк В. И., Кураш Л. П., Заика М. И. Аминокислоты в медицине. Київ : Здоров'я, 1982. 200 с.

14. *Corynebacterium glutamicum* характеристики, таксономія, морфологія, культура. URL: <https://ua.thpanorama.com/articles/biologa/corynebacterium-glutamicum-caractersticas-taxonoma-morfologa-cultivo.html>

15. Мосичев М. С., Складнев А. А., Котов В. Б. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. 418 с.

16. Сырочая А.О., Шаповал Л.Г., Макаров В.А. Аминокислоты глазами химиков, фармацевтов, биологов. Х.: Щедра садиба плюс, 2014. 228 с.

17. Kirstein C. L., Coopersmith R., Bridges R. J., Leon M. Glutathione levels in olfactory and non-olfactory neural structures of rats. *Mol. Aspects. Med.* 2009. Vol. 30. N 1 - 2. P. 99 - 110.

18. Пастухов А.О. Na⁺-залежний транспорт глутамату та екзоцитоз в нервових терміналях головного мозку за умов гіпотермії : дис... канд. біол. наук: 03.00.04 «Біохімія»; Нац. акад. наук України, Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна. Київ, 2019. 163 с.

19. COMPOUND SUMMARY. Glutamic acid URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutamic-acid>

20. R.H.A. Plimmer. The Chemical Constitution of the Protein / R.H.A. Plimmer; F.G. Hopkins. 2nd.London: Longmans, Green and Co. 1912. P. 114.

21. Hansen A. M., Caspi R. R. Glutamate joins the ranks of immunomodulators. *Nat. Med.* 2010. Vol. 16. N 8. P. 856 - 858

22. Коржов В. И., Жадан В. Н., Коржов М. В. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты. *Журнал АМН України*. 2007. Т. 13. № 1. С. 3 - 20.
23. Пономарьов П.Х., Сирохман І.В. Безпека харчових продуктів та продовольчої сировини : навч. посіб. К.: Лібра, 1999. 272 с.
24. Kinoshita S Glutamic acid bacteria. In: Demain AL, Solomon NA (eds) *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. 1985. P. 115 - 140.
25. Characterization of developmental colony formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008. Vol. №81(1). P. 127.
26. Контроль якості продуктів харчування та харчових добавок. Модуль 1: навч.-метод. посібник для студентів 5 курсу фармацевтичного факультету спеціальності «Фармація» / уклад.: С.О. Васюк, А. С. Коржова, Ю.В. Монайкіна. Запоріжжя : ЗДМУ, 2017. 131 с.
27. Промышленный биосинтез аминокислот. URL: <http://propionix.ru/biosintez-aminokislota>
28. Пат. RU 2107723 С1. Штамм бактерий *Corynebacterium glutamicum* в-7198-продуцент L-глутаминовой кислоты. Винаров А. Ю., Сидоренко Т. Е., Яшина В. Н., Гордеева Е. И. Заявл. 27.09.2013; Опубл. 27.03.1998.
29. T. Nakanishi, J. Nakajima, K. Kanda, Conditions for conversion of L-glutamic acid fermentation by *Corynebacterium glutamicum* in to L-glutamine production, *J. Ferment. Technol*. Vol. №53. 1975. P. 543-550.
30. Егорова Н. С., Самуилова В. Д., Дебабов В. Г. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. М.: Высш. шк., 1988. 208 с.
31. Hockberger P. E. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*. Vol. № 76 (6) P. 561 - 79.
32. 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.

33. Паспорт безопасности. L-глутаминовая кислота $\geq 98,5$ %, Ph.Eur., для биохимии URL: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-3774-RU-RU.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyNTA1NzV8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oNjEvaDQ4LzkwMjc2NTU3MjkxODIucGRmfGY0YTE4Yjk4NjdmZWY3MzhIM2ZIN2Q5OWVhNGU4ODQyNjkyOTZmOTVhOTJhNTZiMzNhMTg1N2VmY2MyZmJhYzM>

34. Контроль якості продуктів харчування та харчових добавок. Модуль 1: навч.-метод. посібник для студентів 5 курсу фармацевтичного факультету спеціальності «Фармація» / уклад.: С. О. Васюк, А. С. Коржова, Ю. В. Монайкіна. Запоріжжя : ЗДМУ, 2017. 131 с.

35. Методическое пособие к малому практикуму по биохимии. 6-е изд., перераб. и доп. / сост. С.А. Коннова, А. А. Галицкая, Е. В. Плешакова, М. В. Каневский, Ю. П. Федоненко. Саратов, 2017. 75 с.

36. Гамаюрова В. С., Ржечицкая Л.Э. Пищевая химия: Лабораторный практикум. М.: 2006. 136 с.

37. Бедарева Е. А. Идентификация и количественное определение глутаминовой кислоты в фармацевтических препаратах : дипломный проект / Е. А. Бедарева. Национальный исследовательский Томский политехнический университет (ТПУ), Институт природных ресурсов (ИПР), Кафедра физической и аналитической химии (ФАХ) ; науч. рук. Е. И. Короткова. Томск, 2016.

38. Glutamic acid Веб-сайт. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutamic-acid>

39. R. H. A. Plimmer, F.G. Hopkins. The Chemical Constitution of the Protein; 2nd. London: Longmans, Green and Co., 1912. P. 114.