

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА
ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

ДИПЛОМНИЙ БАКАЛАВРСЬКИЙ ПРОЄКТ
на тему: «Технологія отримання лізину»

Виконавля: студентка групи ББТ-19
Спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
Катерина ВАЛОВА
Науковий керівник: кандидат біологічних наук,
доцент Ольга ЮНГІН
Рецензент: кандидат біологічних наук, доцент
Ольга ШИДЛОВСЬКА

Київ 2023

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

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

«___» _____ 2023 р.

**ЗАВДАННЯ
НА ДИПЛОМНИЙ БАКАЛАВРСЬКИЙ ПРОЄКТ СТУДЕНТУ
Валовій Катерині Олександрівні**

1. Тема дипломного бакалаврського проєкту Технологія отримання лізину
Науковий керівник проєкту Ольга Сергіївна Юнгін, к.б.н.
затверджені наказом КНУТД від «08» листопада 2022 року № 224-уч.
2. Строк подання студентом дипломного проєкту _____
3. Вихідні дані дипломного проєкту: завдання на дипломний бакалаврський проєкт; наукова література щодо технології виробництва лізину; технологічні схеми промислового отримання лізину; матеріали переддипломної практики
4. Зміст дипломного проєкту: техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва, характеристика біологічного агента, опис технологічної схеми, контроль якості культуральної рідини
5. Дата видачі завдання _____

6. КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломного бакалаврського проєкту	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Техніко-економічне обґрунтування		
3	Розділ 2 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва		
4	Розділ 3 Характеристика біологічного агента		
5	Розділ 4 Опис технологічної схеми		
6	Розділ 5 Контроль якості культуральної рідини		
7	Висновки		
8	Оформлення дипломного бакалаврського проєкту		
9	Подання дипломного бакалаврського проєкту на кафедру для рецензування		
10	Перевірка дипломного бакалаврського проєкту на наявність ознак плагіату		
11	Подання дипломного бакалаврського проєкту на затвердження завідувачу кафедри		

Студент _____ Катерина ВАЛОВА

Науковий керівник _____ Ольга ЮНГІН

Рецензент _____ Ольга ШИДЛОВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Катерина ВАЛОВА. Технологія отримання лізину. Застосування *Corynebacterium glutamicum* для отримання лізину. – Рукопис.

Дипломний бакалаврський проєкт за спеціальністю 162 Біотехнологія та інженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2023 рік.

Дипломний бакалаврський проєкт присвячено технології отримання лізину за допомогою *C. glutamicum*. у відповідності до технікоекономічного обґрунтування.

У дипломному проєкті обґрунтовано технологію виробництва лізину на основі *C. glutamicum*. Представлено технологічну схему виробництва лізину, яка передбачає стадії ферментації. Обґрунтовано вибір біологічного агенту, обґрунтовано спосіб проведення біосинтезу (вибору ферментатора/ферментаторів та його/їх параметрів), розраховано кількості стадій підготовки посівного матеріалу, підготовка поживного середовища та параметри стерилізації

Дипломний бакалаврський проєкт включає методики контролю на стадії біосинтезу та контролю цільового продукту.

Ключові слова: лізин, біосинтез, Corynebacterium glutamicum, контроль якості, біологічний агент, ферментація.

					ДБП.ПЗ.162.01				
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					
Розробив		Валова			АНОТАЦІЯ		Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Юнгін					Д	4	1
							КНУТД, ББТ-19		
Н.Контр.									
Затвердив									

ABSTRACT

Kateryna Valova. Technology of obtaining lysine. Application of *Corynebacterium glutamicum* to obtain lysine. - Manuscript.

Diploma bachelor's project in the specialty 162 Biotechnology and engineering. - Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2023.

The diploma bachelor project is devoted to the technology of obtaining lysine with the help of *C. glutamicum*. in accordance with the feasibility study.

The diploma project substantiates the technology of lysine production based on *C. glutamicum*. A technological scheme for the production of lysine, which involves the stages of fermentation, is presented. The choice of a biological agent is substantiated, the method of conducting biosynthesis (the choice of fermenter/fermenters and its/their parameters) is justified, the number of stages of seed preparation, the preparation of a nutrient medium and sterilization parameters are calculated.

The bachelor's diploma project includes methods of control at the stage of biosynthesis and control of the target product.

Key words: lysine, biosynthesis, Corynebacterium glutamicum, quality control, biological agent, fermentation.

					ДБП.ПЗ.162.01		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	ABSTRACT		
Розробив	Валова						
Перевірив	Юнгін						
Н.Контр.							
Затвердив					КНУТД, ББТ-19		
					Літ.	Аркуш	Аркушів
					Д	5	1

ЗМІСТ

ВСТУП

РОЗДІЛ 1 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

1.1 Характеристика цільового продукту.

1.1.1 Фізико-хімічні властивості лейцину

1.1.2 Застосування лізину

1.2. Потреба у цільовому продукті.

1.3. Розрахунок потужності виробництва

1.3.1. Розрахунок кількості лізину для забезпечення спортивним харчуванням

1.3.2. Розрахунок потужності виробництва лізину

1.4. Розрахунок кількості виробничих циклів отримання культуральної рідини та розрахунок об'єму ферментера.

РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

2.3 Обґрунтування способу проведення біосинтезу (вибору ферментатора/ферментаторів та його/їх параметрів)

2.3.1. Обґрунтування вибору ферментатора

2.3.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

2.3.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

2.3.3.1. Миючі засоби

2.3.3.2. Підбір концентрації миючих засобів

2.3.3.3. Обґрунтування вибору миючого засобу для оброблювальних об'єктів

					ДБП.ПЗ.162.01			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Розробив	Валова					Д	6	5
Перевірив	Юнгін					КНУТД, ББТ-19		
Н.Контр.								
Затвердив								

2.3.3.4. Дезинфікуючі засоби. Обґрунтування вибору методу дезінфекції

2.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу, підготовка поживного середовища та параметри стерилізації

2.4.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

2.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 0,3 м³

2.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 30 л

2.4.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 3 л

2.4.5. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

2.5 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу

2.5.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

2.5.1.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

2.5.1.2. Вирощування культури в інокуляторі 3 л

2.5.1.3. Вирощування культури в інокуляторі 30 л

2.5.1.3. Вирощування культури в інокуляторі 0,3 м³

РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

3.1 Таксономічний статус

3.2 Морфолого-культуральні властивості

3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Опис технологічної схеми

ДР.1. Санітарна підготовка виробництва

ДР.1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1. Інструктаж робочого персоналу

ДР 1.1.2. Медичний огляд

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						7
Зм.Зм.	Аркуш	Документа №	Підпис	ата_Д		

ДР 1.1.3. Підготовка одягу

ДР.1.2. Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів

ДР.1.2.1. Підготовка мийних засобів (каустична сода)

ДР.1.2.2. Підготовка мийних засобів для поверхонь

ДР.1.2.3. Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

ДР.1.2.4. Підготовка дезінфікуючих засобів для обладнання

ДР.1.3. Підготовка ферментатора

ДР.1.3.1. Огляд, миття та ополіскування апарату

ДР.1.3.2. Перевірка на герметичність

ДР.1.3.3. Стерилізація

ДР.1.4. Підготовка приміщень

ДР.1.4.1. Щоденне прибирання

ДР.1.4.2. Генеральне прибирання

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря ДР 2.2.очищення повітря від пилу та механічних частинок

ДР 2.3. Стиснення повітря

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

ДР 2.5. Нагрівання повітря

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

ДР 3. Приготування титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування 6% - ї HCl.

ДР 3.1.1. Приготування розчину HCl для підкислення середовища, в інокуляторі об'ємом 3 м³.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація розчину титрувального агента (6 %-й розчин NaOH)

ДР 3.2.1. Приготування розчину NaOH для підлучення середовища, в інокуляторі об'ємом 3 м³

ДР 4. Приготування та стерилізація запасних та підживлюючих розчинів.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						8
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ДР 4.1 Приготування та стерилізація біотину

ДР 4.2 Приготування підживлюючого розчину глюкози для ферментера об'ємом 3 м³.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 5.1. Приготування та стерилізація середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

ДР 5.1.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

ДР 5.1.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

ДР 5.1.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

ДР 5.2. Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 30 л.

ДР 5.2.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

ДР 5.2.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

ДР 5.2.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

ДР 5.3. Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 300 л.

ДР 5.3.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

ДР 5.3.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

ДР 5.3.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 3 м³

ДР 5.4.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

ДР 5.4.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

ДР 5.4.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

ТП 6.2 Отримання робочої культури

ТП 6.3 Отримання робочої культури на агаризованих середовищах

ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалках.

ТП 6.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 30 л.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						9
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ТП 6.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 300 л.

ТП 6.7. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 3 м³.

ТП 7. Зберігання культуральної рідини

ТП 7.1. Ферментація

ТП 7.2. Зберігання культуральної рідини

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження рідких відходів

ЗВ 8.2. Знешкодження твердих відходів

ЗВ 8.3. Знешкодження повітряних відходів

4.2 Поетапна блок-схема технології

РОЗДІЛ 5 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

5.1 Методики контролю на стадії біосинтезу

5.2 Методи контролю цільового продукту

ВИСНОВКИ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

ДОДАТКИ

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						10
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ВСТУП

Лізин є незамінною амінокислотою, яка використовується в багатьох галузях промисловості, включаючи харчову, косметичну та фармацевтичну. Технологія виробництва лізину є важливим предметом досліджень і розробок, який матиме великий вплив на різні галузі промисловості та різні сфери життя людини.

Метою проекту є розробка ефективної технології виробництва лізину. Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання: вивчити вплив різних умов і типів бактерій на продукцію лізину, оптимізувати умови виробництва для максимального виходу лізину.

Основним завданням цього дослідження є розробка методів виробництва лізину для ефективного та максимального використання штамів бактерій. З цією метою було досліджено вплив різних факторів на продукцію лізину, таких як штам-продуцент, склад середовища, температура, рН і концентрація вуглеводнів. Було проведено економічний аналіз вибраних штамів і середовищ, включаючи їх прибутковість і економічну доцільність.

Предметом дослідження є процес отримання лізину за допомогою бактеріальних культур. Об'єктом дослідження: оптимізація умов культивування штамів, скринінг ефективних штамів, вивчення механізму синтезу та вивільнення лізину, визначення якості та кількості отриманих продуктів. .

Для досягнення поставлених завдань досліджено основні способи виробництва лізину шляхом аналізу літературних джерел для визначення оптимальних умов виробництва. Для розробки та дослідження технологій виробництва лізину використовувалася інформаційна база, яка включала наукову літературу, стандарти та методичні рекомендації з виробництва біопрепаратів.

					ДБП.ПЗ.162.01				
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					
Розробив		Валова			ВСТУП	Літ.	Аркуш	Аркушів	
Перевірив		Юнгін				Д	11	2	
Н.Контр.						КНУТД, ББТ-19			
Затвердив									

Основна інновація цього дослідження полягає в розробці технології виробництва лізину з використанням нових технологій та оптимальних умов виробництва для отримання високоякісної та високопродуктивної продукції.

Результати цього дослідження можуть бути використані для виробництва лізину в промислових масштабах, що підвищить доступність і знизить вартість біофармацевтичних препаратів. Крім того, отримані результати можуть бути використані для подальших наукових досліджень у галузі біохімії та біотехнології. Результати дослідження були представлені на Міжнародній науково-практичній дистанційній конференції у Харкові 24 березня 2023 року (Додаток А та Додаток Б).

					ДБП.ПЗ.162.01		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	ВСТУП		
Розробив	Валова						
Перевірив	Юнгін						
Н.Контр.							
Затвердив					КНУТД, ББТ-19		
					Літ.	Аркуш	Аркушів
					Д	12	2

РОЗДІЛ 1. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

1.1 ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІЗИНУ

Лізин (2,6-діаміногліколева кислота, α,ϵ -амінокапронова кислота), молекулярна формула $C_6H_{14}N_2O_2$, див. рис. 1.1, є однією з незамінних амінокислот, що утворюють білки.

Існує у вигляді безбарвних, прозорих кристалів. Природний L-лізин добре розчинний у воді та кислотах, нерозчинний у спиртах і нерозчинний в ефірі. Амінокислота розкладається при температурі 224-225°C. Лізин кристалізується у вигляді безбарвних голчастих або гексагональних пластинок.

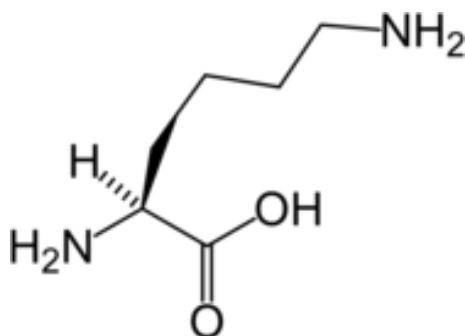


Рис. 1.1. Молекулярна формула лізину

У всіх живих організмах він входить до складу білкових і пептидних молекул і формує активний центр ферментів, таких як аміотрансферази. Він також міститься в гістонах і протамінах (білках хроматину). Він також міститься у тваринних білках, таких як казеїн (9,9%), гемоглобін (9,2%) і яєчний альбумін (15,1%).

Синтетичний лізин отримують за допомогою біотехнологій або шляхом осадження з білкових гідролізатів у вигляді пікратів. Добова потреба в лізині становить 23 мг/кг для дорослих і 170 мг/кг для немовлят.

					ДБП.ПЗ.162.01			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБґРУНТУВАННЯ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Розробив	Валова					Д	13	5
Перевірив	Юнгін					КНУТД, ББТ-19		
Н.Контр.								
Затвердив								

Виробництво амінокислот біосинтетичними методами є економічно ефективним і дає природні L-форми амінокислот. Лізин виробляється біотин залежними мікроорганізмами. В даний час більшість продуцентів L-лізину можна віднести до групи бактерій під назвою *Corynebacterium*.

1.1.1 Фізико-хімічні властивості лейцину

Лізин (2,6-діаміногексановая кислота) - аліфатична амінокислота з вираженою основністю, одна з незамінних амінокислот. Це незамінна амінокислота з молекулярною масою 146,19. Лізин відомий у двох формах: оптично активній D-формі та L-формі.

1.1.2 Застосування лізину

Застосовується в період відновлення після хірургічних операцій і спортивних травм. Також використовується як харчова добавка для компенсації дефіциту цієї амінокислоти в рослинних білках, у синтезі пептидів і при приготуванні поживних середовищ.

Лізин широко використовується в медицині. Дослідження показали, що лізин підвищує засвоєння кальцію. Він також відіграє важливу роль у виробленні організмом карнітину, який перетворює жир в енергію, і в підтримці нормального рівня холестерину в ліпопротеїнах. Лізин - одна з найважливіших амінокислот, що бере участь у регенерації м'язів і загоєнні ран та переломів. Він сприяє засвоєнню кальцію, ефективно скорочуючи час регенерації.

Препарати, що містять лізин, можуть бути використані в рослинництві. Використання препаратів, що містять інші біостимулятори на додаток до амінокислот, може значно підвищити врожайність тепличних і польових культур. В Україні будується завод з глибокої переробки кукурудзи для виробництва лізину. Окупація та війна не змогли завадити групі компаній "Ерідон" продовжити будувати завод з переробки кукурудзи в Україні.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						14
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

1.2. Потреба у цільовому продукті

Хоча потреба організму в цьому продукті може бути легко задоволена за рахунок збалансованого харчування, є кілька груп, які потребують додаткового споживання лізину:

1. Спортсмени. Ця амінокислота сприяє росту м'язів, зміцнює опорно-руховий апарат і підвищує гнучкість суглобів, знижуючи ризик розтягнень і травм. L-лізин знижує рівень стресу, а тому має вирішальне значення для якісного відновлення під час високо інтенсивних фізичних навантажень;

2. Людям у віці 50-60 років і старше. У цьому віці важливо підтримувати здоров'я суглобів і міцність кісток. З віком засвоєння кальцію знижується, але лізин покращує цю ситуацію і запобігає розвитку остеопорозу. Він також підтримує синтез колагену;

3. Люди з особливими харчовими потребами. Якщо тривалий час не вживати продукти тваринного походження або дієта з низьким вмістом жирів, необхідне додаткове споживання лізину;

4. Після важких опіків або травм. Ця амінокислота відома своєю здатністю сприяти регенерації тканин. Тому збільшення споживання лізину є виправданим, а в деяких випадках може бути рекомендовано фахівцями.

1.3. Розрахунок потужності виробництва

1.3.1. Розрахунок кількості лізину для забезпечення спортивним харчуванням

Добова потреба становить 12-24 мг/добу на кожен кілограм маси тіла. Добова потреба в амінокислотах розраховується індивідуально і залежить від маси тіла людини. Так, дорослій людині необхідно 12 мг речовини на кг маси тіла.

За даними сайту Національної служби статистики України, середній зріст дорослого українця становить 169 см, а вага - 75кг. Середній зріст жінок становить 164 сантиметри, а вага - 71 кілограм (на 1 кілограм більше, ніж у

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						15
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

2019 році). Середній зріст і вага українських чоловіків за рік не змінилися - 175 сантиметрів і 80 кілограмів.

Припустимо, що середньостатистичний українець важить 75кг. Використовуючи мінімальну кількість як орієнтир, розрахуємо середню кількість лізину, яку спортсмен повинен споживати за одне тренування: 12 мг на 75 кг маси тіла – 900 мг, тобто приблизно 0,9 г.

$$N_{\text{leu}} = 3 \cdot 0,9 = 2,7 \text{ г}$$

Розрахуємо кількість тренувань на рік, враховуючи, що оптимальним є три тренування на тиждень:

$$N_{\text{тренувань}} = 3 \cdot 52,1429 = 156,42 = 156 \text{ тренувань.}$$

З наведених вище розрахунків можна визначити кількість лейцину, необхідну одному спортсмену на рік:

$$N_{\text{leu/рік}} = 156 \cdot 2,7 = 421,2 \text{ г}$$

За даними Державної служби статистики України, у 2016 році 10% населення України відвідували спортивні зали. Для розрахунків припускається, що населення Київської області у 2016 році становило 1 732,2 мільйона осіб. Для цілей розрахунку кількість відвідувачів приймається на рівні 1% від загальної кількості населення Київської області. Розрахуємо приблизну кількість відвідувачів спортивного центру:

$$N_{\text{від.}} = 1\,732,2 \cdot 0,01 = 17322$$

Припустимо, що спортивне харчування вживають 50 % спортсменів, тоді їх кількість становить:

$$N_{\text{вж}} = 17322 \cdot 0,5 = 8661$$

Отже, річна потреба спортсменів у лізині становить:

$$П = 8661 \cdot 421,2 \text{ г} = 3648013,2 \text{ г} = 3648,02 \text{ кг}$$

Таким чином, для забезпечення 50% відвідувачів спортивних залів у Київській області спортивним харчуванням на рік кількість лізину становить 3648,02 кг.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						16
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

1.3.2. Розрахунок потужності виробництва лізину

При періодичному способі культивування продуцента через 24-48 год. концентрація лізину в культуральній рідині досягає 60-70 г/л.

Визначаємо об'єм культуральної рідини, необхідний для отримання 3648,02 кг лізину:

$$V_{кр0} = 3648013,2 \text{ г} / 70 \text{ г/л} = 52114,5 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виробництві (20 %), необхідна кількість культуральної рідини складає :

$$V_{кр} = 52114,5 / (1 - 0.2) = 65143,1 \text{ л} = 65,14 \text{ м}^3$$

1.4. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної (замовленої) потреби в цільовому продукті та геометричний об'єм ферментера.

Беручи до уваги об'єм культуральної рідини, необхідний для задоволення річної потреби (65,14 м³), розрахований у розділі 1.3.2, робиться наступний розрахунок: якщо кількість робочих днів ($T_{рд}$) становить 83 дні (квартали), то добовий об'єм продукту (V_d):

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 65143,1 / 83 \approx 784,9 \text{ л}$$

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_d \times T_{цф}) / 24) = 65143 / ((784,9 \times 48) / 24) = 41,5 = 42 \text{ цикли.}$$

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{крц}$):

$$V_{крц} = K_1 \times V_d \times T_{цф} / 24 = 1.1 \times 784,9 \times 48 / 24 = 1726,78 \text{ л,}$$

K_1 - коефіцієнт запасу, який враховує можливість нестерильної роботи.

Геометричний об'єм ферментера для виробництва 1726,78 літрів культуральної рідини при коефіцієнті заповнення 0,6 є наступним:

$$V_{г} = V_{крц} / K_{зап} = 1726,78 / 0.6 = 2878 \text{ л} = 2.8 \text{ м}^3$$

$K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						17
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

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

Амінокислоти можна виробляти різними способами. Хімічний синтез лізину нерентабельний, оскільки призводить до утворення рацемічних форм-рівноважної суміші L- і D-форма мінокислот. Присутність D-форми амінокислоти в кінцевому продукті небажана, оскільки вона є баластом і не засвоюється організмом. Тому ця технологія вимагає включення складного і дорогого процесу очищення. Виробництво лізину шляхом гідролізу білка не є економічно вигідним, оскільки вимагає використання нестандартної і дорогої сировини і багатьох етапів для виділення і очищення амінокислоти. Більш економічно вигідним методом виробництва амінокислот є біосинтез, який дозволяє отримувати природні L-форми амінокислот. Лізин виробляється біотин залежними мікроорганізмами.

Біосинтез лізину здійснюється за допомогою гетеротрофних мутантів мікроорганізмів родів *Mycrococcus*, *Brevibacterium* і *Corynebacterium*.

На відміну від виробництва кормових дріжджів, промислове виробництво лізину та інших амінокислот здійснюється в строго асептичних умовах на стерильних середовищах з використанням чистих культур-продуцентів.

					ДБП.ПЗ.162.01			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Валова			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Юнгін				Д	18	24
						КНУТД, ББТ-19		
Н.Контр.								
Затвердив								

Основна технічна послідовність процесу виробництва лізину виглядає наступним чином:

1. Підготовка поживного середовища
2. Підготовка та стерилізація культурального середовища, всього обладнання та засобів комунікації
3. Вирощування продукту в промисловому ферментері (ферментація)
4. Виділення цільового продукту (L-лізину).

Протипоставимо декілька продуцентів, щоб обрати найефективніший біологічний агент.

В табл. 2.1 розглянуто різні продуценти, для яких наведено склад поживних середовищ, на яких вони вирощувалися, основні показники синтезу та особливості технологічного процесу. При виборі даних біологічних агентів увага приділялась концентрації лізину, та часу, за який вона утворюється.

Таблиця 2.1

Поживні середовища для культивування штамів *Brevibacterium flavum* MJ-08, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *C. glutamicum* ATCC 1303, *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062 з метою одержання лізину

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Показники синтезу		Тривалість процесу	Особливості технологічного процесу
		Кількість продукту, г/л	Продуктивність, г/л/год		
<i>Brevibacterium flavum</i> MJ-08	Глюкоза - 10 г/л Пептон - 10 г/л Сіль кухонна (хлорид натрію) - 5 г/л Фосфат монопотасію - 2 г/л Фосфат динатрію - 2 г/л Лізин - 5 г/л	7,81-12 г/л	0,15-0,25 г/л/год	24-48 години	Технологічний процес культивування зазвичай здійснюється при температурі 30-37 °C та pH 7.0-8.0 з використанням аеробних умов.

Продовження таблиці 2.1

<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 14067	Глюкоза - 20 г / л L-цистин - 0,1 г / л Мононатрієва соляна кислота - 2,5 г / л Натрію хлорид - 2,5 г / л Монокалій фосфат - 1,15 г / л Магнію сульфат - 0,1 г / л Ферментований гідролізат казеїну - 10 г / л	10.6 г/л	0.11 г/л/год	72-96 годин	рН середовища підтримують на рівні 7.2-7.6, а культивування проводять при температурі 30-32°C
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	Мінеральна сільова основа (MSB) з наступним складом: (NH ₄) ₂ SO ₄ - 5 г/л MgSO ₄ •7H ₂ O - 0,5 г/л K ₂ HPO ₄ - 2 г/л KH ₂ PO ₄ - 1 г/л NaCl - 0,5 г/л Додаткові компоненти: Глюкоза - 20 г/л Казеїн - 10 г/л Клітинний екстракт дріжджів - 2 г/л	До 8 г/л	Від 0,1 до 0,5 г/л/год	До 24 годин	Використання аеробного культивування при 30-37°C, з наступною ферментацією на протязі 18-24 годин після досягнення фази стаціонарної фази росту. Ph 6,5-7,5.
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	Молочну сироватку - 10-15 г / л Культивуючу пептон - 5 г / л Екстракт дріжджів - 5 г / л Глюкозу - 1 г / л Хлористий натрій - 5 г / л Фосфати - 2 г / л	від 2 до 4 г/л	Від 0,05 до 0,1 г/л/год	Від 24 до 48 годин	Температура: оптимальна температура для росту становить 30-37°C. РН середовища: оптимальний рівень рН середовища для росту становить 7.0-7.5.

Продовження таблиці 2.1

<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Середовище MCGS: Глюкоза (C ₆ H ₁₂ O ₆) - 40.0 Мононатрійфосфа т (NaH ₂ PO ₄) - 12.0 Аммоній сульфат (NH ₄) ₂ SO ₄) - 5.0 Магній сульфат (MgSO ₄) - 0.2 Калій хлорид (KCl) - 0.1 Кальцій пантотенат (Ca(C ₉ H ₁₆ NO ₅)(C ₃ H ₅ NO ₂) ₂) - 0.01 Біотин (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S) - 0.0001	За оптималь них умов культиву вання <i>C.</i> <i>glutamicu</i> <i>m</i> ATCC 13032 може вироблят и до 60- 70 г/л лізину	20-25 г/л/год	24-48 години	Оптимальна температура для виробництва лізину становить 30-33°C, а оптимальне значення pH - 7.0- 7.3.
<i>Corynebacterium glutamicum</i> SYPS-062	CGXII (CgXII) середовище): глюкоза - 40,0; нітрат калію - 0,6; магній сульфат - 0,2; калій фосфат - 3,0; амоній сульфат - 1,0; мікроелементна суміш - 1,0 мл / л (pH 7,2). Це середовище є стандартним для культивування <i>C.</i> <i>glutamicum</i> SYPS- 062.	може досягати 40-60 г/л	2-4 г/л/год	від 24 до 72 годин	для досягнення максимальної продуктивності процесу культивування проводяться при температурі 30- 33°C і pH 7,0-7,5, з використанням CGXII середовища.

Проте така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою. Тому, на другому етапі порівнюється вартість поживних середовищ для культивування обраних продуцентів (табл. 2.2).

З табл. 2.2 видно що вартість 1 л поживного середовища для синтезу лізину *Micrococcus luteus* ATCC 10240 не є найдорожчою, проте з табл. 2.1 ми бачимо що кількість продукту є низькою. Найбільш вартісним є середовище для отримання амінокислоти бактеріями *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698.

Вартість поживних середовищ для культивування *Brevibacterium flavum* MJ-08, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *C. glutamicum* ATCC 1303, *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062 з метою одержання лізину

Продукт	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело (1, 2, 3, 4, 5, 6..)
<i>Brevibacterium flavum</i> MJ-08	Глюкоза - 10 г/л	138 грн	1,38 грн	1
	Пептон - 10 г/л	12000 грн	12 грн	2
	Сіль кухонна (хлорид натрію) - 5 г/л	19,90 грн	0,1 грн	3
	Мононатрійфосфат - 2 г/л	126 грн	0,3 грн	4
	Фосфат динатрію - 2 г/л	265 грн	0,53 грн	5
	Лізин - 5 г/л	362,50	1,82 грн	6
	Вартість 1 л середовища – 16,13 грн			
<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 14067	Глюкоза - 20 г / л	138 грн	2,76 грн	1
	Л-цистин - 0,1 г / л	354 грн	0,0354 грн	7
	NaHCO ₃ - 2,5 г / л	80 грн	0,2 грн	8
	Натрію хлорид - 2,5 г / л	80 грн	0,2 грн	9
	Монокалій фосфат - 1,15 г / л	145 грн	0,17 грн	10
	Магнію сульфат - 0,1 г / л	100 грн	0,01 грн	11
	Ферментований гідролізат казеїну - 10 г / л	1 095 гривень за упаковку вагою 500 грамів За 1 кг 2190 грн	21,9 грн	12
	Вартість 1 л середовища – 25,28 грн			

Продовження таблиці 2.2

<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	(NH ₄) ₂ SO ₄ - 5 г/л	70 грн	0,35 грн	13
	MgSO ₄ •7H ₂ O - 0,5 г/л	27 грн	0,014 грн	14
	K ₂ HPO ₄ - 2 г/л	150 грн	0,3 грн	15
	KH ₂ PO ₄ - 1 г/л	195 грн	0,20 грн	16
	NaCl - 0,5 г/л	80 грн	0,04 грн	9
	Глюкоза - 20 г/л	138 грн	2,76 грн	1
	Казеїн - 10 г/л	За 1 кг 2190 грн	21,9 грн	12
	Клітинний екстракт дріжджів - 2 г/л	1110 грн	2,2 грн	17
Вартість 1 л середовища – 27,8 грн				
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	Глюкоза: 5 г/л	138 грн	0,69	1
	Казеїнат натрію: 1 г/л	280 грн	0,28 грн	18
	Нітрат калію: 0,5 г/л	45 грн	0,023 грн	19
	Фосфат калію: 0,5 г/л	127 грн	0,064 грн	20
	Магній сульфат: 0,1 г/л	27 грн	0,0027 грн	14
	Амоній хлорид: 0,5 г/л	115 грн	0,0575 грн	21
	Марганцевий сульфат: 0,01 г/л	110 грн	0,0011 грн	22
Вартість 1 л середовища – 1,12 грн				
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Глюкоза - 40.0	138 грн	5,52 грн	1
	Мононатрійфосфат - 12.0	126 грн	1,512 грн	4
	Аммоній сульфат - 5.0	70 грн	0,35 грн	13
	Магній сульфат - 0.2	27 грн	0,0054 грн	14
	Калій хлорид - 0.1	69 грн	0,0069 грн	23
	Кальцій пантотенат - 0.01	995 грн	0,00995 грн	24
	Біотин - 0.0001	6352,53 грн	0,000635253 грн	25
Вартість 1 л середовища – 7,4 грн				
<i>Corynebacterium glutamicum</i> SYPS-062	Глюкоза - 40,0;	138 грн	5,52 грн	1
	Нітрат калію - 0,6;	45 грн	0,027 грн	19
	Магній сульфат - 0,2;	27 грн	0,0054 грн	14
	Калій фосфат - 3,0;	127 грн	0,381 грн	20
	Амоній сульфат - 1,0;	70 грн	0,07 грн	13
	Мікроелементна суміш - 1,0 мл / л	75 грн	0,075 грн	26
Вартість 1 л середовища – 6,08 грн				

Порівнюючи усі дані з двох таблиць ми бачимо, що найбільш вигіднішим продуцентом для продукції лізину є *C. glutamicum* ATCC 13032, так як кількість продукту становить до 70 г/л і ціна за 1 л середовища становить 7,4 грн, що в порівнянні з іншими продуцентами є найбільш прийнятним та дешевшим варіантом.

1. <https://tricolad.com.ua/glyukoza-kristalichna-dekstroza-1-kg-tm-slado-ukraina/p7795>
2. <https://flagma.ua/uk/pepton-fermentativniy-o10191906.html>
3. <https://epicentrik.ua/ua/shop/sil-kharchova-ne-yodovana-1-kh.html>
4. <https://tdchem.com.ua/uk/product/%D0%BD%D0%B0%D1%82%D1%80%D1%96%D0%B9-%D1%84%D0%BE%D1%81%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%BE%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%B8%D0%B9-1-%D0%B7%D0%B0%D0%BC%D1%96%D1%89%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B9/>
5. <https://flagma.ua/uk/natriy-fosfat-2-zam-bv-fasovka-1kg-o12345367.html>
6. https://vetmarket.biz.ua/catalog/dlya_selskokhozyaystvennykh_zhivotnykh/lizin_1_kg_krug/
7. <https://soda.kiev.ua/ua/p18862153-tsistin.html>
8. <https://silur.prom.ua/ua/p21370182-natriya-karbonat.html>
9. <https://silur.prom.ua/ua/p5216502-natrij-hloristyj.html>
10. <https://agromagazin.in.ua/ua/p561796637-monokalijfosfat-1kg-razves.html>
11. https://www.covalent.com.ua/shop/magnesium_sulfate/
12. <https://expert-lab.com.ua/gidrolizat-kazeinu-peptidnogo-skladu-dlya-kletocnyh-kultur-500-g.html>
13. <https://prom.ua/ua/p1771580858-sulfat-ammoniya-ammonij.html>
14. <https://ahc.in.ua/ua/p845202084-sulfat-magniya-semivodnyj.html>
15. <https://novohim.com.ua/ru/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/kalij-fosfornokislyj-2-zam/>
16. <https://prom.ua/ua/p1091383043-monofosfat-kaliya-kalij.html?&primelead=MS44>
17. <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
18. <https://soda.kiev.ua/ua/p614097476-kazeyinat-natriyu-harchovij.html>
19. <https://fermercenter.com.ua/kalievaya-selitra-nitrat-kaliya-vodorastvorimoe-udobrenie-25kg-yara-yara-rossiya>
20. <https://fermercenter.com.ua/monokalii-fosfat-vodorastvorimyi-fosfat-kaliya-1kg-izrail-fasovka-fermer-centr->
21. <https://prom.ua/ua/p1090663782-ammonij-hloristyj-hlorid.html>
22. <https://prom.ua/ua/p445803515-marganets-sulfat-marganets.html>
23. https://imetalua.com/potassium_chloride/
24. <https://megachem.com.ua/ua/kalcij-pantotenat-d-farm.html>
25. <https://xn----utbcjbgv0e.com.ua/ua/biotin-vitamin-b7-1-kg.html>
26. <https://vita.biz.ua/product/sumish-mikroelementiv/>

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		24

На третьому етапі продуценти порівнюються за умовною вартістю 1 г утвореної ними амінокислоти (табл. 2.3)

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г лізину при культивуванні *Brevibacterium flavum* MJ-08, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *C. glutamicum* ATCC 1303, *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація лізину, г/л	Умовна вартість 1 г лізину, грн	Тривалість культивування, год	Концентрація лізину, синтезованого за год, г/л
<i>Brevibacterium flavum</i> MJ-08	16,13 грн	7,81-12 г/л	1,68 грн	24-48 години	0,15-0,25 г/л/год
<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 14067	25,28 грн	10.6 г/л	2,74 грн	72-96 годин	0.11 г/л/год
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	27,8 грн	До 8 г/л	11,58 грн	До 24 годин	Від 0,1 до 0,5 г/л/год
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	1,12 грн	від 2 до 4 г/л	0,373 грн	24 - 48 годин	Від 0,05 до 0,1 г/л/год
<i>C. glutamicum</i> ATCC 1303	7,4 грн	60-70 г/л	0,11 грн	24 - 48 години	20-25 г/л/год
<i>Corynebacterium glutamicum</i> SYPS-062	6,08 грн	40-60 г/л	0,028 грн	24 - 72 годин	2-4 г/л/год

З табл. 2.3 ми бачимо що умовна вартість 1 г лізину культивуванням *C. glutamicum* ATCC 1303 становить 0,11 грн, що в порівнянні з іншими продуцентами є дешевим варіантом з урахуванням кількості продукту на літр, часу та відносно бюджетною ціною за один літр середовища

Підсумовуючи дані, наведені у табл. 2.1, табл. 2.2 і табл. 2.3, можна зробити висновок, що отримання лізину за допомогою продуцента *C. glutamicum* ATCC 1303 є доцільним, та не найдорожчим у порівнянні з іншими продуцентами амінокислоти.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Визначення вмісту азоту

Дано: $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 5 \text{ г/л};$

$$M((NH_4)_2SO_4) = 132 \text{ г/моль};$$

$$Ar(N_2) = 28 \text{ г/моль};$$

Відсоткове співвідношення азоту:

$$\frac{Ar \text{ N}_2}{M \text{ NH}_4 \text{ 2SO}_4} = \frac{28}{132} \cdot 5 = 1.06$$

Дано: $Ca(C_9H_{16}NO_5)(C_3H_5NO_2)_2 = 0,01 \text{ г/л};$

$$M(Ca(C_9H_{16}NO_5)(C_3H_5NO_2)_2) = 596,69 \text{ г/моль};$$

$$Ar(N_2) = 28 \text{ г/моль};$$

Відсоткове співвідношення азоту:

$$\frac{Ar \text{ N}_2}{M \text{ Ca C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_5 \text{ C}_3\text{H}_5\text{NO}_2 \text{ 2}} = \frac{28}{596.69} \cdot 0.01 = 0.00047$$

Знаючи те, що в клітині азоту знаходиться 10% від усіх компонентів, тому щоб дізнатися концентрацію біомаси, отримане значення необхідно перерахувати:

$$1.06 \cdot 0.00047 \cdot 10 = 10.6044 \text{ г л}$$

Отже, теоретично можлива концентрація біомаси за азотом дорівнює 10.6044 г л.

Визначення вмісту вуглецю

Дано: $C_6H_{12}O_6 = 40 \text{ г/л}$

$$M(C_6H_{12}O_6) = 180 \text{ г/моль};$$

$$Ar(C_6) = 72 \text{ г/моль};$$

Відсоткове співвідношення вуглецю:

$$\frac{Ar \text{ C}_6}{M \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6} = \frac{72}{180} \cdot 40 = 16$$

Знаючи те, що в клітині вуглецю знаходиться 50% від усіх компонентів, тому щоб дізнатися концентрацію біомаси, отримане значення необхідно перерахувати:

$$16 \cdot 2 = 32 \text{ г л}$$

Тоді теоретично можливий вихід біомаси за вуглецем дорівнює 32 г/л.

2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						26
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

2.2.1. Обґрунтування вибору ферментатора

Перед тим, як вибрати ферментатор для біосинтезу лейцину бактерією *Corynebacterium glutamicum* ATCC 1303, необхідно визначити умови і параметри процесу ферментації. Ці умови залежать від морфологічних і культурних характеристик продуцента та фізико-хімічних властивостей цільового продукту.

C. glutamicum ATCC 1303 є факультативною анаеробною бактерією, яка може рости як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Цей мікроорганізм потребує достатньої кількості кисню для ефективного росту і виробництва лізину. Система подачі повітря включає компресор, розпилювачі додатковий фільтр; найкраще росте при 30-34°C, але може рости і при 20-37°C. Оптимальний рівень pH для росту *Corynebacterium glutamicum* ATCC 1303 становить 7,0-7,5. Для контролю pH поживного середовища реактор оснащений датчиком pH.

Оскільки велика кількість мікроорганізмів росте в певному температурному діапазоні та при певному рівні pH, обладнання, інструменти та поживні середовища стерилізують, щоб запобігти їхньому забрудненню.

Промислове виробництво лізину зазвичай здійснюється шляхом мікробного біосинтезу. Процес виробництва лізину зазвичай здійснюється в біореакторах, де температура, pH, концентрація кисню та інші параметри, що впливають на продуктивність процесу, контролюються автоматично.

Для того, щоб розподілити кисень по всьому середовищу та інтенсифікувати масообмін, ферментатор повинен бути обладнаний мішалкою зі швидкістю не менше 300 об/хв. Біосинтез лізину може призвести до збільшення в'язкості культурального середовища. Оскільки лізин є типом амінокислоти, яка утворює білки і пептиди, його внутрішньоклітинне виробництво може впливати на склад і властивості культурального середовища.

Для культивування *C. glutamicum* ATCC 1303 в промислових масштабах зазвичай використовують різні типи мішалок, включаючи

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						27
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

пропелерні, турбінні та ексцентрикові. Для інтенсивного перемішування рідин ми віддаємо перевагу турбінним мішалкам відкритого типу (рис.2.1).

Відкриті турбінні мішалки мають ряд переваг перед іншими мішалками, особливо в біопроцесах:

Ефективний розподіл газу: відкриті турбінні мішалки забезпечують ефективний розподіл газу в культуральному середовищі. Це забезпечує ефективний ріст і метаболізм, забезпечуючи мікроорганізми достатньою кількістю кисню.

Високошвидкісний масообмін: відкриті турбінні мішалки забезпечують ефективний масообмін за рахунок перемішування культурального середовища на високій швидкості. Це скорочує час, необхідний для досягнення бажаної концентрації продукту.

Ефективне очищення поверхні: відкриті турбінні мішалки забезпечують ефективне очищення поверхні, запобігаючи утворенню накипу і підвищуючи ефективність процесу.

Висока продуктивність: відкриті турбінні мішалки забезпечують високу продуктивність за короткий час завдяки швидкому перемішуванню і ефективному розподілу газу. Легко миються: проста конструкція відкритих турбінних мішалок спрощує процес очищення та дезінфекції.

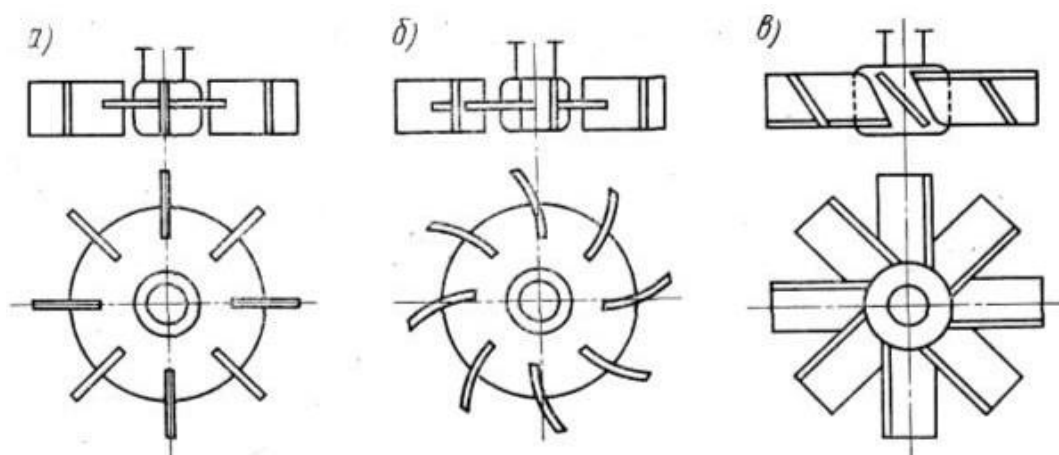


Рис. 2.1. Турбінні мішалки відкритого типу:

а - відкрита з радіальними прямими лопатями, б - відкрита з криволінійними лопатями, в - відкрита з похилими лопатями

Для виробництва лізину з використанням штаму *Corynebacterium glutamicum* ATCC 1303 з подачею повітря, датчиком рН і відкритою турбінною мішалкою можна вибрати ферментери компанії Sartorius, що базується в Геттінгені, Німеччина. Їх ферментатори доступні в широкому діапазоні ємностей і конфігурацій, а також оснащені подачею повітря, датчиками рН і мішалками.



Рис.2.2. Приклади біореакторів компанії Sartorius
Sartorius BIOSTAT® Cplus3 і Sartorius BIOSTAT® DCU3

Ферментатор Sartorius BIOSTAT® Cplus3 є частиною серії біореакторів BIOSTAT® Cplus і призначений для досліджень і промислового виробництва біологічних продуктів. Ферментатор оснащений різними датчиками і системами управління, які автоматизують контроль рН, температури, рівня рідини, аерації та перемішування. Модульна конструкція налаштовується для роботи з різними типами продуктів. Ферментатор Sartorius BIOSTAT® Cplus3 також оснащений датчиками для контролю рівня піни і рівня рідини в

резервуарі, що забезпечує безпеку і стабільність процесу культивування мікроорганізмів.

Ферментатор Sartorius BIOSTAT® DCU3 – це автоматичний біореактор з контролем температури, аеробним і анаеробним культивуванням, контролем рН і електроживленням. Ферментатор оснащений відкритою турбінною мішалкою, яка інтенсивно перемішує і розподіляє навколишнє повітря, покращуючи масообмін і ефективність культури. Ферментатор також оснащений автоматичною системою подачі, яка дозволяє точно контролювати рівень мікробних поживних речовин. Крім того, ферментатор має розширені датчики для моніторингу тиску, температури та рівня кисню і може бути підключений до системи газопідготовки. Всі параметри відстежуються і контролюються мікропроцесором, що забезпечує точний і стабільний процес культивування.

2.2.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Процес аерації (аеробний процес) у ферментеріє одним з найважливіших параметрів у виробництві біологічних продуктів, таких як лізин, за допомогою таких мікроорганізмів, як *Corynebacterium glutamicum* ATCC 1303.

Навколишнє повітря додатково очищується за допомогою спеціальних повітро забірників, розташованих на висоті $\approx 17\text{м}$ над рівнем землі висотної будівлі. Це пов'язано з тим, що виробнича будівля має висоту приблизно 14 м (включаючи похилий дах 1,5 м і висоту стелі 12 м) і розташована на відстані 2-3 м від даху виробничої будівлі, щоб запобігти потраплянню забруднюючих речовин у повітрозабірник з виробничої будівлі.

Фільтри грубої очистки (базові фільтри) та індивідуальні фільтри (високоєфективні фільтри) використовуються для стерилізації повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого вирощування. Індивідуальні фільтри встановлюються безпосередньо перед ферментатором, посівним апаратом та інокулятором. Базові фільтри заповнені волокнистими

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш 30
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

прокладками і встановлюються в головному вентиляційному колекторі ферментаційної камери і мають ефективність очищення повітря приблизно 95% м/о, в той час як ультра тонкі фільтри і атомарні фільтри з волокнистим наповнювачем можуть затримувати до 99,999% мікроорганізмів.

Ферментаційні камери зазвичай обладнані системою газопостачання, що включає компресор, розпилювач і додаткові фільтри. Компресор стискає повітря і направляє його до випарника. Розпилювач розпилює повітря в середовище у ферментаторі, створюючи бульбашки. Фільтри очищають повітря від бруду та бактерій, які можуть вплинути на ріст та виробництво мікробів.

Для забезпечення ефективної подачі повітря в середовище і сприяння метаболізму ферментатор повинен бути обладнаний мішалкою (мішалкою з відкритим ротором) зі швидкістю обертання не менше 300 об/хв. Для забезпечення рівномірного розподілу бульбашок повітря по всьому середовищу.

2.2.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Загальні нормативні вимоги до мийних та дезінфікуючих засобів, що використовуються для очищення та санітарної обробки обладнання, такі:

Безпека та ефективність: мийчі та дезінфікуючі засоби повинні бути безпечними та ефективними для використання на обладнанні, що контактує з харчовими продуктами.

Не впливати на якість продукції: мийчі та дезінфікуючі засоби не повинні містити речовин, які можуть вплинути на якість харчових продуктів.

Не повинні містити рідкої піни: мийчі та дезінфікуючі засоби не повинні містити рідкої піни, оскільки вона може забруднити харчові продукти.

Контроль рН: мийчі засоби повинні мати контрольований рН, щоб уникнути пошкодження матеріалів обладнання.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						31
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Контроль концентрації: концентрація миючих та дезінфікуючих засобів повинна бути контрольованою, щоб максимізувати їхню ефективність.

Що стосується миючої здатності, то це стосується здатності миючого засобу видаляти забруднення з поверхні обладнання. Очищувальна здатність зазвичай визначається шляхом тестування на модельних ґрунтах, що імітують типові забруднення, які трапляються на підприємствах харчової промисловості. Миючі засоби повинні мати достатню очищувальну здатність, щоб надійно видаляти забруднення і досягати належного рівня дезінфекції.

2.2.3.1. Миючі засоби

Миючі засоби - це речовини, які використовуються для видалення забруднень з поверхонь. Вони можуть бути в різних формах, наприклад, рідкі, порошкові, гранульовані, таблетовані тощо.

Класифікація миючих засобів може проводитися за декількома критеріями:

1. Форма: рідкі, порошкові, гранульовані, таблетовані.
2. Функція: загального призначення, спеціальні, для певних видів поверхонь, для певних видів забруднень.
3. Хімічний склад: алкалійні, кислотні, нейтральні.
4. Вплив на довкілля: біорозкладні, небіорозкладні.

Критерії вибору миючих засобів залежать від призначення та типу поверхонь, які потрібно очистити. Деякі з них включають наступне:

1. Ефективність: Миючий засіб повинен бути ефективним для видалення забруднень, що зустрічаються на певних поверхнях.
2. Безпека: Миючий засіб повинен бути безпечним для людей та довкілля.
3. Сумісність з поверхнею: Миючий засіб повинен бути сумісним з матеріалом поверхні, яку потрібно очистити, щоб запобігти пошкодженню матеріалу.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						32
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

4. Вартість: Миючий засіб повинен мати прийнятну вартість в порівнянні з іншими доступними засобами.

5 Наявність: Миючий засіб повинен бути доступний для покупки та легко доступний у магазинах або онлайн.

2.2.3.2. Підбір концентрації миючих засобів

Підбір концентрації миючого засобу залежить від різних факторів, таких як тип забруднення, поверхня, яку потрібно очистити, та технологія очищення. Нижче наведено загальні рекомендації для підбору концентрації миючого засобу.

Початкова концентрація: Початкова концентрація миючого засобу повинна бути достатньою для розчинення забруднення на поверхні, але не занадто високою, щоб запобігти пошкодженню поверхні. Зазвичай для цього використовують рекомендовану концентрацію, яка вказана на упаковці миючого засобу.

Збільшення концентрації: Якщо початкова концентрація не дозволяє ефективно очистити поверхню, то можна поступово збільшувати концентрацію миючого засобу, доки не досягнете необхідного результату.

Ефект на функціональність поверхні: Концентрація миючого засобу повинна бути достатньою для очищення поверхні, але не такою високою, щоб пошкодити її. Наприклад, занадто висока концентрація миючого засобу може викликати корозію металевої поверхні.

Тип миючого засобу: Концентрація миючого засобу може варіюватися в залежності від типу засобу, наприклад, для нейтральних миючих засобів потрібна вища концентрація, ніж для лужних миючих засобів.

Технологія очищення: Концентрація миючого засобу може залежати від технології очищення, наприклад, для ультразвукової очистки може бути потрібна вища концентрація миючого засобу.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						33
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

2.2.3.3. Обґрунтування вибору миючого засобу для оброблювальних об'єктів

Біонол – миючий засіб виробництва компанії «Новотекс Україна». Він призначений для ефективного очищення різноманітних забруднень з різноманітних поверхонь, включаючи жир, масляні речовини, вуглеводні, фарбу, лак та інші забруднення.

Біонол використовується в різних галузях промисловості, таких як харчова, хімічна, нафтогазова, електротехнічна та ін. Цей засіб можна використовувати для очищення обладнання, підлоги, стін, даху, вікон та інших поверхонь.

Щоб використовувати Біонол, його потрібно розчинити у воді в пропорції, яка вказана на упаковці. Потім отриманий розчин можна нанести на поверхню, яку потрібно очистити, за допомогою щітки, ганчірки або іншого відповідного пристрою. Після використання засобу потрібно дати йому деякий час для взаємодії з забрудненнями, після чого ретельно змити водою.

Використання: Розчин придатний протягом 14 днів при зберіганні в герметичному контейнері.

Упаковка: банка 1 кг.

2.2.3.4. Дезинфікуючі засоби. Обґрунтування вибору методу дезінфекції

Дезінфекційні засоби – хімічні речовини, біологічні чинники та засоби медичного призначення, що застосовуються для проведення дезінфекційних заходів, куди включають антисептику.

Існує кілька різних методів дезінфекції, кожен з яких має переваги та недоліки. Ось кілька прикладів різних методів дезінфекції:

Фізична дезінфекція – цей метод знищує мікроорганізми за допомогою фізичних факторів, таких як тепло, висока температура, ультразвук тощо.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						34
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Наприклад, для знищення мікроорганізмів можна використовувати стерилізацію під високим тиском, високою температурою або випаровуванням.

Хімічна дезінфекція - Цей метод використовується для знищення мікроорганізмів за допомогою хімічних речовин. Для різних типів мікроорганізмів і різних поверхонь можна використовувати різні речовини. Хімічні дезінфікуючі засоби можуть бути рідинами, газами або твердими речовинами.

Ультрафіолетова дезінфекція – цей метод використовує ультрафіолетове світло для знищення мікроорганізмів. УФ-промені пошкоджують ДНК мікробів, тому вони втрачають здатність до розмноження і стають безпечними.

Дезінфекція озоном - цей метод використовує озон для знищення мікроорганізмів. Озон – це газ, який швидко розкладається після використання, тому безпечний для навколишнього середовища.

Хімічний метод дезінфекції найбільш широко використовується, є найбільш ефективним, зручним та, в порівнянні з іншими є найменш енергозатратним.

2.3 Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу з наведенням складу поживного середовища

2.3.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 1726,78$ л л культуральної рідини. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{роб\ 1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{ф}} = \frac{1726,78}{1 - 0,1} = 1918,6 \text{ л}$$

де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						35
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 1918,6$ л. При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{ф.1} = 1918,6/0,6 = 3197,6$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 3000$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап\ 1} = \frac{V_{роб\ 1}}{V_{сф}} = \frac{1918\ 6}{3000} = 0\ 64$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах. Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб\ 1}}{1 - X_{ф}} = \frac{1918\ 6}{1 - 0\ 1} = 1744\ 2\ л$$

де $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу для ферментера. Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб\ 1} + V_{пс1} = 1918\ 6 + 1744\ 2 = 174\ 4\ л$$

2.3.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі $0,3\ м^3$

Для одержання $174,4$ л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб\ 2} = \frac{V_{пм1}}{1 - E_{ін}} = \frac{174\ 4}{1 - 0\ 1} = 193\ 7\ л$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 193,7/0,6 = 322,9$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 300$ л = $0,3\ м^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап\ 2} = \frac{V_{роб\ 2}}{V_{сін}} = \frac{193\ 7}{300} = 0\ 65$$

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						36
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.
Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс2} = \frac{V_{роб\ 2}}{1 - X_{ін}} = \frac{193\ 7}{1 - 0\ 1} = 176\ 1\ л$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм2} = V_{роб\ 2} - V_{пс2} = 193\ 7 - 176\ 1 = 17\ 6\ л$$

2.3.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 30 л

Для одержання 17,6 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб\ 3} = \frac{V_{пм2}}{1 - E_{ін}} = \frac{17\ 6}{1 - 0\ 1} = 19\ 5\ л$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 19,5/0,6 = 32,6\ л$.
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 30\ л$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап\ 3} = \frac{V_{роб\ 3}}{V_{сін}} = \frac{19\ 5}{30} = 0\ 65\ л$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.
Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$K_{зап\ 3} = \frac{V_{роб\ 3}}{1 - X_{ін}} = \frac{19\ 5}{1 - 0\ 1} = 17\ 7\ л$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб\ 3} - V_{пс3} = 19\ 5 - 17\ 7 = 1\ 8\ л$$

2.3.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 3 л

Для одержання 1,8 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з

урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб4} = \frac{V_{пм3}}{1 - \epsilon_{ін}} = \frac{1,8}{1 - 0,1} = 2 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 1,8/0,6 = 3 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 3 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап4} = \frac{V_{роб4}}{V_{сін}} = \frac{1,8}{3} = 0,6$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах. Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс4} = \frac{V_{роб4}}{1 - X_{ін}} = \frac{1,8}{1 - 0,1} = 1,64 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм4} = V_{роб4} - V_{пс4} = 2 - 1,64 = 0,36 \text{ л}$$

2.3.5. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для одержання 0,36 л посівного матеріалу можна використовувати качалочні колби об'ємом близько 0,75 л. Коефіцієнт заповнення такої колби складатиме близько 0,48. Кількість колб становитиме:

$$N_{колб} = \frac{V_{пм4}}{V_{колб} \cdot K_{зк}} = \frac{360}{750 \cdot 0,46} = 1,04 \text{ шт}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 1 качалочні колби. Таким чином, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу лізину у ферментері об'ємом 3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи.

2.4 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу

2.4.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						38
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Вирощування посівного матеріалу та біосинтез лізину відбувається в середовищі такого складу (г/л):

Середовище MCGS:

Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$) - 40.0

Мононатрійфосфат (NaH_2PO_4) - 12.0

Аммоній сульфат ($(NH_4)_2SO_4$) - 5.0

Магній сульфат ($MgSO_4$) - 0.2

Калій хлорид (KCl) - 0.1

Кальцій пантотенат ($Ca(C_9H_{16}NO_5)(C_3H_5NO_2)_2$) - 0.01

Біотин ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) - 0.0001

Об'єм середовища, л	Біотин ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$)		Об'єм композиції солей, л	6%-й розчин HCl (6%-й розчин NaOH)	
	Вміст г/л	Особливості приготування		Об'єм для регуляції pH, мл	Особливості приготування
1	0.0001	Запасний розчин	Не потребує		
10	0.001	Запасний розчин			
100	0.01	Запасний розчин			
1000	0.1	Запасний розчин	6.5	13	Приготування в колбі на 750 мл
10000	1	Компонент композиції	65	130	Приготування в колбі на 750

2.4.1.1. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Композиція 1: Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$) - режим стерилізації: 121 °C протягом 15 хвилин.

Композиція 2: (NaH_2PO_4) - режим стерилізації: 121 °C протягом 30 хвилин.

Композиція 3: (NH_4) $_2$ SO $_4$, MgSO $_4$, KCl, ($Ca(C_9H_{16}NO_5)(C_3H_5NO_2)_2$) - режим стерилізації: 121 °C протягом 30 хвилин.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						39
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Композиція 4: $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ - режим стерилізації: 121 °C протягом 30 хвилин.

Стерилізація композицій відбувається у автоклаві.

Солі композицій 2 та 3 стерилізують окремо для запобігання утворення нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

2.4.1.2. Вирощування культури в інокуляторі 3 л

Композиція 1: Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$)

Для стерилізації використовується автоклав із наступними параметрами: температура - 121 °C, тиск - 1 атмосфера, час - 20 хвилин.

Композиція 2: (NaH_2PO_4)

Для стерилізації використовуйте автоклав із наступними параметрами: температура - 121 °C, тиск - 1 атмосфера, час - 20 хвилин.

Композиція 3: $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$, KCl , $(Ca(C_9H_{16}NO_5)(C_3H_5NO_2)_2)$

Для стерилізації використовуйте автоклав із наступними параметрами: температура - 121 °C, тиск - 1 атмосфера, час - 20 хвилин.

Композиція 4: $C_{10}H_{16}N_2O_3S$

Для стерилізації композиції 4 можна використовувати фільтрацію через мембрану з розміром пор не більше 0.22 мкм або стерилізацію у водяній бані протягом 15-30 хвилин при температурі 121-123 °C під тиском 1-2 атмосфери.

2.4.1.3. Вирощування культури в інокуляторі 30 л

Композиція 1: Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$) - стерилізація здійснюється при температурі 121 °C протягом 20 хвилин в збірнику об'ємом не менше 50 л.

Композиція 2: (NaH_2PO_4) - стерилізація здійснюється при температурі 121 °C протягом 20 хвилин в збірнику об'ємом не менше 50 л.

Композиція 3: $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$, KCl , $(Ca(C_9H_{16}NO_5)(C_3H_5NO_2)_2)$ - стерилізація здійснюється при температурі 121 °C протягом 20 хвилин в збірнику об'ємом не менше 50 л.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						40
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Композиція 4: C10H16N2O3S - стерилізація здійснюється при температурі 121 °C протягом 20 хвилин в посівному апараті об'ємом не менше 5 л.

2.4.1.3. Вирощування культури в інокуляторі 0,3 м³

Композиція 1: автоклав при температурі 121 °C протягом 20 хвилин.

Композиція 2: автоклав при температурі 121 °C протягом 20 хвилин.

Композиція 3: автоклав при температурі 121 °C протягом 20 хвилин.

Композиція 4: фільтрація через мембрану з пором 0,2 мкм після підготовки інших композицій та їхньої стерилізації.

Для стерилізації композицій 1, 2 та 4 необхідно використовувати посівний апарат об'ємом 0,5 м³.

Для стерилізації композиції 3 необхідно використовувати збірник об'ємом 0,5 м³, оскільки сумарний об'єм композиції 3 складає 0,405 м³.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						41
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

3 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

3.1 Таксономічний статус

***Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032** - грампозитивна бактерія, що належить до роду *Corynebacterium*. Її було виділено з ґрунту, зібраного в Японії, а здатність виробляти амінокислоту лізин робить її одним з найбільш вивчених мікроорганізмів у світі.

***C. glutamicum* ATCC 13032** має такий таксономічний статус:

Домен: *Bacteria*

Клас: *Actinobacteria*

Ряд: *Corynebacteriales*

Родина: *Corynebacteriaceae*

Рід: *Corynebacterium*

Вид: *Corynebacterium glutamicum*

Цей штам важливий продуцент лізину. Він є важливим компонентом у виробництві харчових добавок, таких як глутамат натрію, який використовують як підсилювач смаку в різноманітних продуктах харчування, включаючи супи, соуси та іншу консервацію.

C. glutamicum ATCC 13032 теж продукує і інші амінокислоти, такі як аргінін, глутамінову кислоту, ізолейцин, валін, лейцин та фенілаланін, які мають немале значення у харчовій та фармацевтичній промисловості.

C. glutamicum ATCC 13032 є важливим продуцентом амінокислот, таких як лізин, і тому цей мікроорганізм має велике значення у промисловому виробництві. Вивчення його метаболічних шляхів та генетики дає можливість покращити процес виробництва лізину та інших сполук, що продукуються цим видом.

					ДБП.ПЗ.162.01		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Розробив	Валова						
Перевірив	Юнгін						
Н.Контр.							
Затвердив							
					Літ.	Аркуш	Аркушів
					Д	42	2
					КНУТД, ББТ-19		

3.2 Морфолого-культуральні властивості

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 - грампозитивна, аеробна, нежиттєздатна, нерухома паличка, діаметром приблизно 0,6-0,8 мкм і довжиною 2-5 мкм. Утворює приземкуваті, круглі або деревоподібні колонії на різних поживних середовищах.

Штам може рости на різних поживних середовищах, включаючи тверді та рідкі. *C. glutamicum* ATCC 13032 є аеробним і не утворює спор. Росте при температурі від 20 до 37 °C і значеннях pH від 6,5 до 7,5.

C. glutamicum ATCC 13032 є важливим видом для виробництва амінокислот, особливо лізину, і тому має велике значення в промисловій біотехнології та мікробіології.

3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

Фізіологічні та біохімічні характеристики *C. glutamicum* ATCC 13032 включають наступне:

- Цей штам може виробляти велику кількість амінокислот, зокрема лізин і глютамін, що робить його корисним для використання в промисловій біотехнології.
- *C. glutamicum* ATCC 13032 є аеробним, нейтральним і росте за помірних температур (20-37°C).
- Цей штам є грампозитивним і не утворює спор.
- *C. glutamicum* ATCC 13032 є факультативною аеробною бактерією і може рости з киснем або без нього.
- Для росту та метаболізму вона може використовувати різні вуглеводи, включаючи глюкозу, лактозу, мальтозу та неочищений цукор.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						43
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Опис технологічної схеми

Технологічна схема отримання лізину штамом *C. glutamicum* ATCC 13032 включає допоміжні роботи, технологічний процес, пакування маркування відвантаження та знешкодження відходів.

ДР.1. Санітарна підготовка виробництва

ДР.1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1. Інструктаж робочого персоналу

Перед початком роботи в компанії працівники проходять комплексний інструктаж щодо правил безпеки на робочому місці та запобіжних заходів, яких слід дотримуватися при роботі з обладнанням та мікроорганізмами. Персонал забор'язаний вивчити основи гігієни, санітарії та принципів GMP. Їхні знання оцінюються за допомогою тесту на знання.

ДР 1.1.2. Медичний огляд

Медичні огляди працівників є важливим профілактичним заходом, який передбачає оцінку фізичного та психічного стану працівника та виявлення можливих медичних протипоказань. Це захищає здоров'я та безпеку на робочому місці.

ДР 1.1.3. Підготовка одягу

Робочий одяг, який входить до комплексу технологічного одягу, повинен бути у відповідному гігієнічному стані. Тому перед використанням його сортують і перевіряють на комплектність. Потім його сушать при 80°C протягом 1,5 година бо 120 °C протягом 2 годин і відправляють на прання з використанням порошку. Використана вода нейтралізується у водоочисній установці. Для того, щоб працівники працювали в гігієнічних та комфортних умовах, перед виходом на роботу їм видається чистий одяг.

					ДБП.ПЗ.162.01		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		
Розробив	Валова						
Перевірів	Юнгін						
Н.Контр.							
Затвердив					КНУТД, ББТ-19		
					Літ.	Аркуш	Аркушів
					Д	44	14

ДР.1.2. Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів

ДР.1.2.1. Підготовка мийних засобів (каустична сода)

Визначають необхідну кількість каустичної соди відповідно до вказаної концентрації, вимірявши і розрахувавши необхідну кількість відповідно до вимог.

Розчиняють каустичну соду у воді до заданої концентрації. Каустичну соду зазвичай додають повільно в перемішувану воду, щоб переконатися, що речовина повністю розчинилася в розчині.

ДР.1.2.2. Підготовка мийних засобів для поверхонь

Зважують і змішують відповідні компоненти миючого розчину, згідно з приписаним рецептом. Для очищення поверхонь найкраще підходить порошковий засіб Біонол.

Струшують компоненти розчину до отримання рівномірної та постійної концентрації миючого засобу.

ДР.1.2.3. Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

Готують спеціальні дезінфікуючі розчини для обробки рук та інших частин тіла працівників, використовуючи відповідні інгредієнти, такі як антимікробні, антисептичні та противірусні засоби.

Перевіряють концентрацію та якість приготованих дезінфікуючих розчинів, щоб переконатися, що вони відповідають встановленим стандартам.

ДР.1.2.4. Підготовка дезінфікуючих засобів для обладнання

Використовується 1% розчин каустичної соди. Цей розчин готується шляхом змішування NaOH з питною водою.

ДР.1.3. Підготовка ферментатора

ДР.1.3.1. Огляд, миття та ополіскування апарату

Візуально оглядають ферментер, щоб виявити можливі дефекти, забруднення або пошкодження.

Очищують ферментер, використовуючи відповідний миючий засіб, щоб видалити бруд, залишки продукту та інші забруднення.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						45
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Промивають ферментер чистою водою, щоб переконатися, що залишки миючого засобу видалені, а поверхні пристрою чисті.

ДР.1.3.2. Перевірка на герметичність

Перевіряють ферментатор на наявність витоків або протікання. Визначають та усувають можливі джерела витоку, такі як ущільнення, клапани та прокладки.

Переконуються, що ферментаційна ємність герметична, виконавши відповідні перевірки та тести перед використанням.

ДР.1.3.3. Стерилізація

Підтримувати асептичні умови у ферментаторах, застосовуючи відповідні методи та процедури, такі як термічна стерилізація, та автоклавування.

Дотримуються вимог щодо часу стерилізації, температури, тиску та інших параметрів відповідно до встановлених процедур і правил.

Забезпечують належну стерильність ферментаторів перед їх використанням у подальшій обробці.

ДР.1.4. Підготовка приміщень

ДР.1.4.1. Щоденне прибирання

Регулярне прибирання будівлі, включаючи підлогу, стіни, стелю, меблі, вікна та інші поверхні.

Підтримують будівлю в чистоті та гігієнічності, видаляючи сміття, пил, бруд та інші забруднення.

Використовують відповідні миючі засоби та обладнання для забезпечення ефективного прибирання.

ДР.1.4.2. Генеральне прибирання

Ретельне і повне прибирання приміщень, включаючи ретельне миття, чищення, дезінфекцію та інші процедури для видалення сильних забруднень, бактерій, грибків та інших мікроорганізмів.

Проведення генерального прибирання відповідно до встановленої програми або за необхідності, наприклад, перед початком нового

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		46

виробничого процесу, після закінчення попереднього процесу або при виявленні забруднення, що вимагає спеціального втручання.

Використання відповідних інструментів, обладнання та методів для забезпечення високої якості прибирання, а також чистоти та гігієнічності приміщень.

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

Забір здійснюється за допомогою повітрозабірника на висоті приблизно 30 м над найвищою точкою будівлі, в якій відбувається весь процес. Висота будівлі становить приблизно 12 м, що відповідає висоті триповерхового будинку.

ДР 2.2.очищення повітря від пилу та механічних частинок

Зважені частинки видаляються до 80% чистоти за допомогою фільтра грубого очищення, $P=65$ Па (на початку) і 250 Па (наприкінці).

ДР 2.3. Стиснення повітря

Стиснення повітря відбувається в компресорі за тиску 0,35 МПа, внаслідок чого температура повітря підвищується до 120-200°C.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Повітря охолоджується до 25-30 °C у теплообміннику, а вологість повітря знижується до 60 %. Сконденсована волога видаляється в ресивері.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Повітря нагрівається теплообмінником до 50°C, тим самим знижуючи вологість повітря до 50 %.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Головний фільтр очищає повітря в розташований поруч із ферментаційним відділенням і має чистоту 95%, $P=80$ Па на початку та 450 Па наприкінці.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

Повітря очищається окремими фільтрами до рівня очищення 99,995%, $P=140$ Па на початку і 600 Па в кінці.

ДР 3. Приготування титрувальних розчинів

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						47
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ДР 3.1. Приготування 6% - ї HCl.

Розрахунки кількості компонентів, необхідних для приготування 6%-го розчину соляної кислоти, наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Розрахунок кількості 38 %-го розчину HCl і води для приготування 6 %- ї HCl для підкислення поживного середовища

Об'єм середовища, яке необхідно підкислити, л	Об'єм 6 %-ї HCl для підкислення, мл	Тара, в якій готується і зберігається 6 %-а HCl	Об'єм 38 %-ї HCl, мл	Об'єм води, мл
6,5	13	Колба на 750 мл	2,5	12
65	130		20,53	112

ДР 3.1.1. Приготування розчину HCl для підкислення середовища, в інокуляторі об'ємом 3 м³.

У мірну колбу на 750 мл додаємо 12 мл дистильованої води. Додаємо 2 мл 38% HCl, перемішуючи (щоб уникнути сильної екзотермічної реакції, переконуємося, що рідини змішуються саме в такому порядку, а не навпаки). Закриваємо колбу скляною пробкою. Приготований 6% розчин HCl не піддається стерилізації.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація розчину титрувального агента (6 %-й розчин NaOH)

Розрахунки кількості компонентів, необхідних для приготування 6%-го розчину NaOH, наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

Розрахунок кількості 6 %-го NaOH для підлужнення поживного середовища

Об'єм середовища, яке необхідно підлужнити, л	Об'єм 6 %-го NaOH для підлужнення, мл	Кількість кристалічного NaOH для підлужнення, г	Тара, в якій готується і стерилізується 6 %-й розчин NaOH	Об'єм води, мл
6,5	13	0,78	Колба на 750 мл	12,2
65	130	7,8		52

ДР 3.2.1. Приготування розчину NaOH для підлучення середовища, в інокуляторі об'ємом 3 м³

Зважують 0,78 г кристалічного NaOH на технічних вагах; перенесять у колбу ємністю 750 мл, додають 12,2 мл питної води та перемішують (див. табл. 2.2). Закривають колбу марлевим корком і стерилізують в автоклаві за 131 °С протягом 40 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація запасних та підживлюючих розчинів.

ДР 4.1 Приготування та стерилізація біотину

Зважують 1 г біотину на технічних вагах, потім поміщають наважку в колбу на 250 мл і розчиняють у 100 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують при 100 °С протягом 30 хвилин.

ДР 4.2 Приготування підживлюючого розчину глюкози для ферментера об'ємом 3 м³.

Для приготування 40 %-го поживного розчину в 250-літровий реактор додають 156 літрів питної води і 62,5 кг глюкози, які постійно перемішують за допомогою об'ємного дозатора. Готовий розчин подається на стадію виробничого біосинтезу після 18 годин інкубації.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 5.1. Приготування та стерилізація середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для приготування посівного матеріалу на качалочних колбах необхідно приготувати 1 л поживного середовища. Вміст компонентів для середовища наведено в *табл. 5.1.*

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						49
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Таблиця 5.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 1 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл	Об'єм ємності, мл
Глюкоза	40	40	1	150	500
Вода		150			
(NaH_2PO_4)	12	12	2	150	500
Вода		150			
((NH_4) $_2\text{SO}_4$)	5	5	3	700	2000
Вода		250			
(MgSO_4)	0.2	0.2			
Вода		150			
(KCl)	0.1	0.1			
Вода		150			
($\text{Ca}(\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_5)(\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}_2)_2$)	0.01	0.01			
Вода		150			

ДР 5.1.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

На електронних вагах зважують 40 г глюкози, вносять у колбу об'ємом 500 мл та додають 150 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують при 112 °C упродовж 30 хв.

ДР 5.1.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

На технічних вагах зважують 12 г NaH_2PO_4 , вносять в колбу об'ємом 500 мл та додають 150 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 121 °C протягом 30 хвилин.

ДР 5.1.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

На технічних вагах зважують 5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та 0.2 г MgSO_4 , 0.1 г KCl, та 0.01 г $\text{Ca}(\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_5)(\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}_2)_2$. Наважки поміщують в колбу об'ємом 2 л, та додають 700 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-

марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 121 °С упродовж 30 хв.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 30 л.

Для вирощування інокулята потрібно 10 літрів середовища. Враховуючи, що об'єм рідкого інокулята становить 1 літр (10% від об'єму середовища), загальний об'єм води, необхідної для приготування середовища, становить 9 літрів; вміст компонентів для приготування 10 літрів середовища наведено в *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 10 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 10 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	40	400	1	1500
Вода		1500		
(NaH ₂ PO ₄)	12	120	2	1000
Вода		1000		
((NH ₄) ₂ SO ₄)	5	50	3	6500
(MgSO ₄)	0.2	2		
(KCl)	0.1	1		
(Ca(C ₉ H ₁₆ NO ₅)(C ₃ H ₅ NO ₂) ₂)	0.01	0.1		
Вода		6500		

ДР 5.2.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

На технічних вагах зважують 400 г глюкози, наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л та за допомогою мірної колби вносять 1,5 л питної води. Колбу закривають ватно – марлевою пробкою та стерилізують при 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 5.2.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

На технічних вагах зважують 120 г NaH₂PO₄. Наважку переносять у колбу об'ємом 2 л, додають 1 л питної води та перемішують. Закривають

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						51
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

колбу ватно-марлевою пробкою та стерилізують при температурі 121 °С упродовж 30 хв у автоклаві.

ДР 5.2.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

На технічних вагах зважують 50 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 г MgSO_4 , та 1 г KCl , 0.1 г $\text{Ca}(\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_5)(\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}_2)_2$. Наважки поміщають у реактор об'ємом 6 л та додають 3 л питної води. Для кращого розчинення солей в сорочку подається пара (до досягнення температури розчину 40 °С) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 100 - 150 об/хв до повного розчинення. Після розчинення солей розчин самоплином подають в посівний апарат, та додають 3,5 л води, вносять розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.1) до досягнення значення рН 4-4,5. Стерилізують в посівному апараті при температурі 121 °С упродовж 30 хв.

ДР 5.3. Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 300 л.

Для вирощування посівного матеріалу потрібно 100 літрів поживного середовища; враховуючи рідкий посівний матеріал об'ємом 10 літрів, загальна кількість води, доданої для приготування середовища, становить 90 літрів; вміст компонентів для приготування 100 літрів живильного середовища наведено в таблиці 5.3.

Таблиця 5.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 100 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 100 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	40	4000	1	15
Вода		13.5 л		
Конденсат		1.5 л		
$(\text{NaH}_2\text{PO}_4)$	12	1200	2	5

Вода		5 л		
Конденсат		1 л		
$((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$	5	500	3	70
(MgSO_4)	0.2	20		
(KCl)	0.1	10		
$(\text{Ca}(\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_5)(\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}_2)_2)$	0.01	1		
Вода		58.5 л		
Конденсат		6.5 л		

ДР 5.3.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

У реактор об'ємом 25 л за вносять 4 кг глюкози та 13,5 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізують розчин глюкози у збірнику гострою парою при температурі 121°C впродовж 30 хв.

ДР 5.3.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

У реактор об'ємом 10 л вносять 1200 г NaH_2PO_4 та додають 5 л питної води і вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізація відбувається при температурі 121°C упродовж 30 хв.

ДР 5.3.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

У 10-літровий реактор додають 500 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 г MgSO_4 і 10 г KCl , 1 г $\text{Ca}(\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_5)(\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}_2)_2$ і 8 літрів питної води. Для кращого розчинення солей в сорочку подають пару (поки температура розчину не досягне 40°C) і встановлюють режим перемішування 100-150 об/хв до повного розчинення. Після розчинення солей розчин самопливом переливають у культиватор об'ємом 200л, додають 61 л питної води та розчин соляної кислоти (з ДР 2.1.2), доки значення рН не буде в межах 4-4,5. Соляну композицію стерилізують при 121°C протягом 30 хв.

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 3 м^3

Для вирощування посівного матеріалу потрібно 1 м^3 л поживного середовища; враховуючи рідкий посівний матеріал об'ємом 100 літрів,

					ДБП.ПЗ.162.01ДБП.ПЗ.162.01ДБП.ПЗ.162.01ДБП.ПЗ.16	Аркуш
						5377
Зм.Зм.	Аркуш	№	Підпис	Дата_		

загальна кількість води, доданої для приготування середовища, становить 900 літрів; вміст компонентів для приготування 1 м³ л поживного середовища наведено в таблиці 5.4.

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1 м³ середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 1 м ³ л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	40	40000	1	150
Вода		135 л		
Конденсат		15 л		
(NaH ₂ PO ₄)	12	12000	2	50
Вода		50 л		
Конденсат		1 л		
((NH ₄) ₂ SO ₄)	5	5000	3	700
(MgSO ₄)	0.2	200		
(KCl)	0.1	100		
(Ca(C ₉ H ₁₆ NO ₅)(C ₃ H ₅ NO ₂) ₂)	0.01	10		
Вода		540 л		
Конденсат		60 л		
C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0.0001	0.1	4	Запасний розчин
Вода		500 мл		
Конденсат				

ДР 5.4.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

У реактор об'ємом 250 вносять 40 кг глюкози, та 135 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій та стерилізують гострою парою при температурі 121 °С впродовж 30 хв.

ДР 5.4.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

У реактор об'ємом 60 л вносять 12 кг NaH₂PO₄, та 50 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізація відбувається при температурі 121 °С упродовж 30 хв.

ДР 5.4.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

У реактор об'ємом 60 л вносять 5 кг (NH₄)₂SO₄, 200 г MgSO₄ і 100 г KCl, 10 г Ca(C₉H₁₆NO₅)(C₃H₅NO₂)₂ та додають 40 л питної води, для

кращого розчинення солей в сорочку подається пара (до досягнення температури розчину 40 °С) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 100 - 150 об/хв до повного розчинення. Після розчинення солей розчин самоплином подають в посівний апарат об'ємом 3 м³ та вносять 660 л питної води, додають розчин соляної кислоти до досягнення значення рН 4-4,5. Композицію солей стерилізують при температурі 121 °С упродовж 30 хв.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *C.glutamicum* ATCC 13032 зберігають у пробірках зі скошеним твердим середовищем Мюллера (Mueller's medium) при температурі 4°С. Пересіви культури здійснюються кожні 3-4 місяці, в асептичних умовах.

ТП 6.2 Отримання робочої культури

Музейну культуру, що зберігається в пробірках зі скошеним середовищем Мюллера, пересівають на чашки Петрі для отримання ізольованих колоній і вирощують у термостаті 24 год при температурі 32 °С.

ТП 6.3 Отримання робочої культури на агаризованих середовищах

Ізольовані колонії за допомогою мікробіологічної петлі переносять на 11 потрібних пробірок за скошеним щільним середовищем та інкубують у термостаті 24 год при температурі 32 °С.

ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалках.

У колбу з композицією 3 в асептичних умовах вносять композицію 2 (ПС від ДР 5.1.1; ПС від ДР 5.1.2; ПС від ДР 5.1.3), композицію 1, та 1 мл запасного розчину біотину. Розчин солей розливають по колбах (об'єм колб 750 мл) по 100 мл. У пробірку з робочою культурою *C. glutamicum* ATCC 13032, вирощену на середовищі Мюллера, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колби. Культуру вирощують у колбах на качалці

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						55
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

(250 об/хв) упродовж 24 годин. Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для визначення концентрації біомаси ($\square$ 26 г/л) та здійснюють мікробіологічний контроль.

ТП 6.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 30 л.

В інокулятор з композицією 2 (ПС від ДР 5.2.1 ;ПС від ДР 5.2.2; ПС від ДР 5.2.3) самоплином подають композицію 1, через засівну колбу вносять композицію 3, 10 мл біотину. Автоматично рН середовища регулюється до значення 7,0 6 %-м NaOH. Далі через засівну колбу вносять посівний матеріал. Температура..культивування становить 32 °С, рН 6,8-7,2, швидкість перемішування – 250 об/хв. Тривалість культивування становить 24 год. Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для визначення концентрації біомаси (26 г/л) та здійснюють мікробіологічний контроль.

ТП 6.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 300 л.

В інокулятор з композицією 2 (ПС від ДР 5.3.1 ;ПС від ДР 5.3.2; ПС від ДР 5.3.3) самоплином подають композицію 1 та композицію 3 подають. Автоматично рН середовища регулюється до значення 7,0 6%-м NaOH. Далі подають посівний матеріал. Температура культивування становить 30-33 °С, рН 7.0-7.3, швидкість перемішування – 250 об/хв. Тривалість культивування становить 24 год. Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для визначення концентрації біомаси ($\square$ 26 г/л) та здійснюють мікробіологічний контроль.

ТП 6.7. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 3 м³.

В інокулятор з композицією 2 (ПС від ДР 5.3.1 ;ПС від ДР 5.3.2; ПС від ДР 5.3.3) за допомогою перистальтичного насоса подають композицію 1 та самоплином композицію 3. Автоматично рН регулюється до значення 7,0 6%-м NaOH. Далі подають посівний матеріал. Температура культивування становить 32 °С, рН 6,8-7,2, швидкість перемішування – 250 об/хв. Тривалість культивування становить 24-48 год. Періодично (кожні 4 год)

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						56
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

відбирають пробу культуральної рідини для визначення концентрації біомаси ($\square$ 26 г/л) та здійснюють мікробіологічний контроль.

ТП 7. Зберігання культуральної рідини

ТП 7.1. Ферментація

Тривалість процесу – 48 год. Температура становить 30-33°C, а значення рН - 7.0-7.3.

ТП 7.2. Зберігання культуральної рідини

Культуральне середовище відправляється в резервуар для зберігання, де воно зберігається при кімнатній температурі до тих пір, поки продукт не буде готовий до очищення.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження рідких відходів

Залишки титрування, залишки елюенту та промивні води (Від ДР 1.3.1, ДР2.4, 2.5, від ДР6.5, 6.6, 6.7) утилізуються на очисних спорудах.

ЗВ 8.2. Знешкодження твердих відходів

Після фільтрації культурального середовища біомасу (Від ДР 1.3.1), що залишилася, відправляють на утилізацію.

ЗВ 8.3. Знешкодження повітряних відходів

Відпрацьоване повітря з інокуляторів, ферментаторів, випарників фільтрату та розпилювальних сушарок (Від ДР 1.3.1, від ДР6.5, 6.6, 6.7) спрямовується в установки для очищення відпрацьованого повітря.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						57
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 5 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

5.1 Методики контролю на стадії біосинтезу

Коли процес виробництва лізину завершено, необхідно контролювати якість готового продукту. Для цього були розроблені методи контролю стадії біосинтезу та цільового продукту. Контроль на стадії біосинтезу використовується для визначення ефективності процесу синтезу лізину і виявлення можливих проблем у застосуванні.

Одним з методів контролю є вимірювання росту бактеріальних культур і визначення кількості лізину, що виділяється в культуральне середовище. Для цього використовується спектрофотометрія для вимірювання оптичної щільності культурального середовища і визначення концентрації лізину в культуральному середовищі.

Також важливо контролювати такі параметри, як температура, рН і концентрація регуляторів росту, таких як глюкоза, під час фази біосинтезу. Контролюючи ці параметри, можна забезпечити оптимальні умови для росту бактерій і досягти ефективного синтезу лізину.

5.2 Методи контролю цільового продукту

З метою визначення якості та кількості отриманого лізину проводять контроль об'єктного продукту. Для визначення кількості лізину використовують хімічні методи, зокрема метод Бредфорда та метод низькомолекулярного фракціонування. В останньому методі лізин розділяється на окремі фракції і його кількість можна визначити за допомогою спектрофотометра.

					ДБП.ПЗ.162.01		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ		
Розробив	Валова						
Перевірив	Юнгін						
Н.Контр.							
Затвердив					КНУТД, ББТ-19		
					Літ.	Аркуш	Аркушів
					Д	58	2

Для визначення якості лізину аналізують його структуру за допомогою хроматографії та мас-спектрометрії. Активність лізину по відношенню до бактерій також є важливим фактором його якості і визначається спеціальними методами, такими як метод зон чутливості і метод мікророзведення.

Загальна мета контролю якості цільового продукту полягає в тому, щоб забезпечити відповідність виробленого лізину встановленим вимогам щодо якості та кількості. Контроль якості є важливим етапом процесу виробництва лізину, який гарантує якість продукту і визначає напрямки подальшого розвитку технології.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						59
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

В результаті виконання бакалаврської дипломної роботи було розроблено технологію виробництва лізину штамом *C. glutamicum* ATCC 13032. Для досягнення поставленої мети було досліджено фактори, що впливають на продукування лізину, встановлено оптимальні умови виробництва, визначено якість та чистоту отриманого лізину, оцінено практичне значення отриманих результатів та проведено апробацію результатів досліджень.

Результати показали, що оптимальними умовами для продукування лізину штамом *C. glutamicum* ATCC 13032 є використання глюкози як джерела вуглецю, оптимальна температура 30°C та pH 7,5. Ці умови дозволили отримати чистий продукт з високими виходами.

Результати дослідження свідчать, що використання штаму *C. glutamicum* ATCC 13032 є ефективним методом отримання лізину і має практичне значення для промислового виробництва цього продукту в Україні.

Отримані результати відповідають поставленим завданням дослідження та підтверджують новизну технології виробництва лізину, розробленої з використанням штаму *C. glutamicum* ATCC 13032. Практичне значення також підтверджено апробацією на профільній конференції.

Таким чином, розроблена технологія має важливе значення для розвитку біотехнологічної галузі в Україні, зменшення економічної залежності від імпорту лізину та створення нових робочих місць.

Для підвищення ефективності виробництва лізину за допомогою штаму *C. glutamicum* ATCC 13032 можна дослідити можливість використання інших джерел вуглецю, збільшення масштабів виробництва та впровадження автоматизованих систем контролю якості продукції.

					ДБП.ПЗ.162.01			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Валова			ВИСНОВКИ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Юнгін				Д	60	2
						КНУТД, ББТ-19		
Н.Контр.								
Затвердив								

Отримані результати можуть бути використані для подальших наукових досліджень та розробки нових технологій виробництва біопродуктів. Слід враховувати, що розглянуті фактори, такі як температура і рН, можуть змінюватися в залежності від характеристик використовуваної сировини і ступеня чистоти продукту.

В цілому, результати даного дослідження показують важливість використання біотехнологічних методів виробництва для отримання високоякісної продукції з низьким впливом на навколишнє середовище та економічною вигодою для країни. Таким чином, результати цього дослідження можуть бути використані для підвищення конкурентоспроможності України на світовому ринку біотехнологій.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
						61
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Чернявський А. М., Сергієнко В. В., Євтушенко О. В. та ін. Лізин: Біологія, технологія, застосування. Київ: Авіцена, 2014. - 292 с.
2. Морозова Н. С., Марієвський В. Ф. Дезінфектологія. Дезінфекція, стерилізація, дезінсекція, дератизація: підручник. Київ: Наукова думка, 2019. - 240 с. - ISBN 966-00-1663-7.
3. ДЕЗІНФЕКТАНТИ АБО ДЕЗІНФЕКЦІЙНІ ЗАСОБИ. Фармацевтична енциклопедія. [Електронний ресурс]. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2423/dezinfektanti-abo-dezinfekcijni-zasobi>
4. Harch.tech. (2022, 31 жовтня). Переробний завод з виробництва лізину будують в Україні. [Електронний ресурс]. URL: <https://harch.tech/2022/10/31/pererobnyj-zavod-z-vyrobnyctva-lizynu-budujut-v-ukraini/>
5. Дехтяр Ю. Ф. Мікробіологічне виробництво кормів та кормових добавок. Миколаїв, 2017.
6. Андріяш Г. С., Заболотна Г. М., Шульга С. М. Мутантні штами мікроорганізмів — продуцентів лізину та треоніну. Biotechnologia Acta, 2014. Vol. 7, № 3. doi 10.15407/biotech7.03.095.
7. Герасименко В. Г. Біотехнологія. Київ, 2006.
8. Філімоненко О. Ю. Конспект лекцій з дисципліни «Технології БАП та харчових продуктів». Дніпродзержинськ, 2016.
9. Borysowski, J., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (Eds.). (2015). Bacteriophages and Biofilms: Ecology, Phage Therapy, Plaques. New York: Springer. 339 p.
10. Nag, A. (Ed.). (2015). Principles of Microbial Biotechnology. New Delhi: New Age International. 501 p.

					ДБП.ПЗ.162.01		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		
Розробив	Валова						
Перевірив	Юнгін						
Н.Контр.							
Затвердив							
					Літ.	Аркуш	Аркушів
					Д	62	4
					КНУТД, ББТ-19		

11. Bollschweiler, D. F., Lood, R., Bonten, M. J. M., & Willems, R. J. L. (2021). Bacterial cell wall lysins: enzymes in action. *Current Opinion in Microbiology*, 62, 82-89.
12. Clokie, M. R. J., & Kropinski, A. M. (Eds.). (2012). *Methods in Enzymology*. Volume 507, Bacteriophages. Part B. 652 p.
13. Eggeling, L., & Bott, M. (2005). *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press.
14. Ikeda, M. (2003). Amino acid production processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 79, 1-35.
15. Kinoshita, S., Udaka, S., & Shimono, M. (2005). Studies on the amino acid fermentation. *Journal of General and Applied Microbiology*, 51(3), 147-156.
16. Lee, S. Y., & Park, J. H. (2018). Physiology of recombinant microorganisms for the production of amino acids and related compounds. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1-14.
17. Liebl, W., Ehrmann, M., & Ludwig, W. (1994). Taxonomic composition of the genus *Corynebacterium* isolated from dairy cows. *Systematic and Applied Microbiology*, 17(4), 467-473.
18. Ikeda, M. (2003). Amino acid production processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 79, 1-35. doi: 10.1007/3-540-44810-2_1
19. Tauch, A., & Sandbott, J. (2014). The family *Corynebacteriaceae*. In *The Prokaryotes: Actinobacteria* (pp. 239-277). Berlin, Germany: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-38954-2_277
20. Tortoli, E. (2014). Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Corynebacterium*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 647-680. doi: 10.1128/CMR.00042-13
21. Yeh, W. K., & Chang, Y. C. (2009). Biotechnological production and applications of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum*. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 143-149.

					ДБП.ПЗ.162.01	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		63

22. Becker, J., Wittmann, C., & Corynebacterium, G. (2011). Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production-the heartbeat of industrial strain development. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 1-10.
23. Park, J. B., Kim, B. G., & Jung, K. S. (2016). Lysine production from lignocellulosic hydrolysate by *Corynebacterium glutamicum* harboring the *ptfL* gene encoding peptidase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 597-605.
24. Ikeda, M. (2003). Amino acid production processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 79, 1-35.
25. Becker, J. and Wittmann, C. (2012). Bio-based production of chemicals, materials and fuels—*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Current opinion in biotechnology*, 23(4), pp.631-640.
26. Lindner, S. N., Vidaurre, D., Willke, T., & Wendisch, V. F. (2012). NCgl1221 of *Corynebacterium glutamicum* encodes a novel glutamine synthetase with a C-terminal extension involved in regulation. *Microbiology*, 158(9), 2483-2493.
27. Sharma, P., Tomar, S.K., Goswami, P., & Sangwan, R.S. (2010). Isolation, purification and characterization of lysozyme from *Brevibacterium flavum*: Optimization of process parameters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(3), 265-273. doi: 10.1007/s10295-009-0679-4.
28. Vaidya, V.K. & Goyal, A. (2007). Optimization of medium composition for production of lysozyme by *Brevibacterium flavum* using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(7), 467-475. doi: 10.1007/s10295-007-0227-7.
29. Shabir, U., Hameed, A., Arshad, M., & Iqbal, M. (2011). Screening and production of lysozyme from *Micrococcus lysodeikticus*. *African Journal of Biotechnology*, 10(7), 1226-1231. doi: 10.5897/ajb10.1882.

30. Wu, J., Wu, Q., Zhang, Q., & Chen, H. (2013). Optimization of fermentation conditions for lysine production by *Brevibacterium flavum* using response surface methodology. *Journal of food science*, 78(4), M635-M640.
31. Cho, J. H., Kim, J. W., & Kim, Y. (2002). Kinetic modeling of lysine fermentation by *Brevibacterium flavum*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 12(3), 476-483.
32. Gomathi, D., Muthulakshmi, C., & Mani, C. (2010). Optimization of media composition for the production of l-lysine by *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 691-699.
33. Juturu, V., & Wu, J. C. (Year). Production of lysozyme by *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 using immobilized cells in continuous flow stirred tank reactor. *Title of Journal, Volume(Issue), Page numbers*.
34. Kurbanoglu, E. B., Ozdal, M., & Koc, M. (2018). *Micrococcus* spp. from Traditional Turkish Foods: Isolation, Characterization, and Their Technological Properties. *International journal of food science*, 2018, 1-11.

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ВІСЬОЧКА-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЇ ФАРМАЦІЇ
КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ


Науково-практична
міжнародна дистанційна
конференція
**«МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА
ІМУНОЛОГІЧНІ
ДОСЛІДЖЕННЯ В
СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ»**

Сертифікат

Цим засвідчується, що

Валова К.О.

брав(ла) участь у роботі Науково-практичної
міжнародної дистанційної конференції

**«Мікробіологічні та імунологічні дослідження
в сучасній медицині»**

24 березня 2023 р. м. Харків

Тривалість – 5 годин / 0,15 кредитів ЕКТС

Проректор з науково-педагогічної роботи
(інноваційної та науково-дослідної)
Національного фармацевтичного університету,
доктор фармацевтичних наук, професор

Завідувачка кафедри мікробіології, вірусології та імунології
доктор медичних наук, професор



І.М. Владимірова

Н.І. Філімонова

Конференція зареєстрована у ДУ
«Український інститут науково-
технічної експертизи та інформації»,
посвідчення № 544 від 19 грудня 2022 року

РОЛЬ ЛІЗИНУ В ЛІПОСОМАЛЬНИХ ПРЕПАРАТАХ

Валова К.О., Волошина І.М.

Київський національний університет технологій та дизайну, м.

Київ, Україна

katayvaloval23@gmail.com

Вступ. Ліпосомні препарати актуальні в багатьох галузях, зокрема в медицині, фармакології, косметології та косметичі. Однією з головних переваг ліпосомальних препаратів є те, що вони захищають діючі речовини від шкідливих впливів зовнішнього середовища, забезпечуючи при цьому підвищену ефективність їх дії та знижене дозування. Ліпосомні препарати здатні максимально природно взаємодіяти зі шкірою та ефективно доставляти корисні речовини в глибокі шари шкіри, що робить їх одним із найперспективніших засобів у косметичі.

Використання ліпосомальних складів у косметичних засобах може покращити стан шкіри, зменшити гіперпигментацію та запобігти появі зморшок. Крім того, додавання лізину до ліпосом підвищує їх ефективність у наданні максимальної користі шкірі. У косметології ліпосомальні препарати використовуються для поліпшення засвоєння шкірою корисних компонентів, а також для захисту шкіри від небезпечних факторів зовнішнього середовища. Композиції ліпосом можна включати до складу кремів, лосьйонів, масок, сироваток, тоніків та інших засобів по догляду за шкірою. Лізин можна додавати до ліпосомної композиції для посилення його дії. У ліпосомах лізин можна використовувати як емульгатор, що допомагає змішувати різні компоненти рецептури, а також як компонент, що забезпечує стабільність ліпосом проти розпаду.

Лізин використовується кількома різними способами в ліпосомальних композиціях залежно від їх використання та складу. Лізин можна використовувати як емульгатор для змішування різних компонентів ліпосомних препаратів, таких як фосфоліпіди, водно-жирові розчинники, біологічно активні речовини тощо. В результаті виходить стійка емульсія, яка забезпечує однорідний розподіл діючої речовини в ліпосомах. За допомогою лізину можна забезпечувати стійкості ліпосом до пошкоджень. Це пояснюється тим, що лізин містить аміногрупу, яка може взаємодіяти з фосфоліпідами та іншими молекулами, що утворюють ліпосоми. Це допомагає підтримувати цілісність ліпосом і захищає їх вміст від руйнування. Лізин можна використовувати для підвищення біодоступності певних речовин у ліпосомальних композиціях. Також він може взаємодіяти з вільними радикалами та іншими шкідливими речовинами, які викликають окислювальний стрес у клітинах.

Сучасна біотехнологія

Висновки: Ліпосомні препарати є одними з найперспективніших засобів у косметології та косметичі для поліпшення стану шкіри та забезпечення доставки корисних інгредієнтів у глибокі шари. Додавання лізину до композицій ліпосом може посилити їх дію та забезпечити краще зв'язування ліпосом із клітинами шкіри. Але додавання лізину має бути доречним, щоб уникнути негативних наслідків.

