НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації

До захисту допущено:
Завідувач кафедри
_____Валентина ПОЛІЩУК
«03» червня 2025 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія β-аланіну з проєктуванням апарата для посівного матеріалу»

Виконала:
студентка IV курсу, групи БТ-11
Сорокоумова Анастасія Сергіївна _____

Керівник:
Старший викладач кафедри промислової біотехнології та біофармації,
к.т.н. Тітова Лариса Олександрівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для
проведення технологічного процесу:
старший викладач кафедри промислової біотехнології та біофармації
Остапенко Жанна Ігорівна _____

Рецензент:
Проф. кафедри біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології, д.б.н., проф.
Горго Юрій Павлович _____

Засвідчую, що у цьому дипломному проєкті немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.
Студентка_____

Київ – 2025 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	А4		Завдання на дипломний проєкт	1	
2	А4	ДП БТ-1120. 00 ПЗ	Пояснювальна записка	107	
3	А1	ДП БТ-1120. 01 ТС	Технологічна схема	2	
4	А1	ДП БТ-1120. 02 АС	Апаратурна схема	2	
5	А1	ДП БТ-1120. 03 КА	Інокулятор	1	

				ДП БТ-1120. 00 ВДП	
	ПІБ	Підп.	Дата		
Розробн.	Сорокоумова А.С.			ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ	Лист 2 / Листів 112
Керівн.	Тітова Л.О.				
Консульт.	Остапенко Ж.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПББФ Гр. БТ-11
Н/контр.					
Зав.каф.	Поліщук В.Ю.				

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
_____Валентина ПОЛІЩУК
« 14 » квітня 2025 р.

ЗАВДАННЯ
на дипломний проєкт
студентці
Сорокоумовій Анастасії Сергіївні

1.Тема проєкту «Технологія β-аланіну з проєктуванням апарата для посівного матеріалу» . Керівник проєкту: Тітова Лариса Олександрівна, старший викладач кафедри промислової біотехнології та біофармації, к.т.н. ,затверджені наказом по університету від « 29 » травня 2025 р. № 1838-с.

2. Термін подання студентом проєкту 09 червня 2025 року

3. Вихідні дані до проєкту: кінцевий продукт - таблетки; інокулятор для виробничого біосинтезу об’ємом 1 $м^3$.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва бета-аланіну; охарактеризувати кінцеву продукцію виробництва, обґрунтувати вибір технології виробництва бета-аланіну; розглянути біохімічні основи виробництва; проаналізувати методики створення високопродуктивних штамів та обрати найбільш оптимальний; навести характеристику сировини, матеріалів та напівпродуктів; описати технологічний процес; скласти матеріальний баланс; розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції апарату, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення апарату – 1 арк. А1, технологічна схема – 2 арк. А1, апаратурна схема – 2 арк. А1., презентація.

6. Консультанти розділів проєкту:

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Остапенко Ж. І. ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

1. Дата видачі завдання 14 квітня 2025 року

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1	Отримання теми та завдання	14.04.25 р.	
2	Підбір та вивчення літератури	14.04.25 – 18.04.25 р.	
3	Виконання розділів проєкту	18.04.25 – 12.05.25 р.	
4	Оформлення технологічної схеми	12.05.25 – 15.05.25 р.	
5	Оформлення апаратурної схеми	15.05.25 – 22.05.25 р.	
6	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	22.05.25 – 26.05.25 р.	
7	Оформлення пояснювальної записки	26.05.25 – 31.05.25 р.	
8	Перевірка на плагіат дипломного проєкту	31.05.25 – 04.06.25 р.	
8	Подання дипломного проєкту на рецензування	05.06.25 – 06.06.25 р.	
9	Подання дипломного проєкту та рецензії до екзаменаційної комісії	До 09.06.25 р.	

Студентка Анастасія СОРОКОУМОВА

Керівник Лариса ТІТОВА

Пояснювальна записка

до дипломного проєкту

на тему: «Технологія β-аланіну з проєктуванням апарата для посівного матеріалу»

Київ – 2025 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт містить: 112 с., 15 рис., 4 табл., 42 посилання.

У дипломному проєкті розглянуто питання вдосконалення технології виготовлення препарату бета-аланіну у таблетках, присвячено окрему увагу проєктуванню і розрахункам інокулятора обсягом 1 м³ для отримання посівного матеріалу другої генерації. Бета-аланін є важливою амінокислотою, яка бере участь у синтезі карнозину, що підвищує фізичну витривалість та продуктивність у спортивних тренуваннях. У роботі проведено аналіз сучасних методів виробництва, досліджено морфолого-культуральні та фізико-біохімічні особливості мікроорганізму-продуцента *Escherichia coli*. Як продуцент β-аланіну був обраний штам *E. coli B0016-080BB*, модифікований шляхом інтеграції гена panD із Corynebacterium glutamicum (CgpanD), а також касети km-cits857-pR-pL для термоіндукції.

Запропонована технологія включає етапи підготовки поживного середовища, ферментації, очищення, концентрації та формування кінцевого продукту. Особливу увагу приділено оптимізації параметрів культивування, таких як температура, pH, аерація, що забезпечують максимальний вихід продукту.

Обґрунтовано вибір інокулятора для вирощування посівного матеріалу з урахуванням технологічних вимог. Виконано технологічний і тепловий розрахунок основного апарата та допоміжного обладнання. Наведено технологічну та апаратурну схеми виробництва, а також креслення загального вигляду установки.

БЕТА-АЛАНІН, ФЕРМЕНТАЦІЯ, ІНОКУЛЯТОР, ТАБЛЕТУВАННЯ, *E.COLI*

ABSTRACT

The diploma project contains 112 pages, 15 figures, 4 tables, 42 references.

The diploma project addresses the improvement of the manufacturing technology for beta-alanine tablets, with particular attention given to the design and calculation of a 1 m³ inoculator intended for producing second-generation seed material. Beta-alanine is an essential amino acid involved in the synthesis of carnosine, which enhances physical endurance and performance during athletic training. The study analyzes modern production methods and investigates the morphological, cultural, and physicochemical characteristics of the producer microorganism *Escherichia coli*. The beta-alanine producer selected was the *E. coli B0016-080BB* strain, genetically modified by integrating the *panD* gene from *Corynebacterium glutamicum* (*CgpanD*) and the km-cits857-pR-pL cassette for thermoinduction.

The proposed technology includes stages for preparing the nutrient medium, fermentation, purification, concentration, and formulation of the final product. Special attention is paid to optimizing cultivation parameters such as temperature, pH, and aeration to ensure maximum product yield.

The choice of inoculator for growing the seed material is substantiated, taking into account technological requirements. Technological and thermal calculations of the main apparatus and auxiliary equipment have been performed. The technological and equipment schemes of the production process are presented, along with a general layout drawing of the installation.

The developed tablet-form product meets current requirements of the pharmaceutical and sports industries and has wide application potential.

BETA-ALANINE, FERMENTATION, INOCULATOR, TABLETING, *E.COLI*

ЗМІСТ

ВСТУП……10
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ……12
1.1 Основні промислові продуценти……12
1.2 Систематичне положення……15
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки……15
1.4 Культуральні ознаки……16
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки……19
1.6 Поширення в природі……21
РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА… ……22
2.1 Характеристика кінцевого продукту ……22
2.2 Методи синтезу β-аланіну ……23
2.3 Процес культивування для біосинтезу β-аланіну……27
2.4 Методи очистки цільового продукту……35
2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси. ……37
РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ……39
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту ……39
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту ……41
3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі ……45
РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА……48
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва……48
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві ……51
4.3 Опис технологічного процесу……55

					ДП БТ-1120. 00 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Сорокоумова А.С.			ЗМІСТ	Стадія	Арк.	Аркушів
Конс.						Д	8	112
Керівн.		Тітова Л.О.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

4.4 Матеріальний баланс.....68
4.5 Контроль виробництва..... 71
РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ..... 81
5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату..... 81
5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки 90
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання 100
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища 103
ВИСНОВКИ.....106
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ 108

ВСТУП

Бета-аланін є важливою амінокислотою, яка відіграє ключову роль у синтезі карнозину — пептиду, що сприяє підвищенню фізичної витривалості та покращенню продуктивності в спортивних тренуваннях. Останні дослідження підтвердили, що бета-аланін може бути ефективним засобом для покращення спортивних результатів, що робить його актуальним у спортивній медицині та нутриціології. В умовах зростаючого попиту на функціональні харчові добавки та препарати для покращення спортивних показників, виробництво бета-аланіну у таблетках має великий потенціал.

Сучасні технології біотехнологічного виробництва, зокрема у ферментації, дозволяють ефективно виробляти бета-аланін з використанням мікроорганізмів. Важливе місце займає *Escherichia coli* як основний продуцент. Цей штам є одним із найкраще досліджених у мікробіології завдяки його швидкому росту, простоті генетичних модифікацій та здатності до ефективної експресії гетерологічних генів.

E. coli дозволяє гнучко конструювати метаболічні шляхи, спрямовані на синтез β-аланіну, що робить її привабливою платформою для промислового виробництва.

Враховуючи світові тенденції у виробництві біотехнологічної продукції, зокрема збільшення інтересу до екологічно чистих і безпечних продуктів, розробка технології виробництва бета-аланіну у ферментерах є надзвичайно важливою. Використання нових технологій, таких як генетична інженерія та метаболічна інженерія, відкриває нові можливості для підвищення ефективності виробництва.

Розробка ефективної технології виробництва бета-аланіну у інокуляторі обсягом 1 м³ може стати основою для створення промислового виробництва, яке задовольнятиме потреби ринку. Вивчення та оптимізація параметрів культивування, таких як температура, pH, швидкість аерації, можуть значно підвищити вихід бета-аланіну.

Новизна даного проєкту полягає в розробці комплексної технології виробництва бета-аланіну, що включає в себе дослідження нових штамів мікроорганізмів, оптимізацію умов ферментації та ефективне очищення готового продукту.

Мета – вдосконалити технологію виробництва бета-аланіну у таблетованій формі.

Завдання:

1. Вивчити біохімічні, культуральні та морфологічні особливості *E. coli.*

2. Навести методи отримання промислових штамів продуцента.

3. Навести технологічну схему отримання препарату β-аланіну.

4. Розробити апаратурну схему технологічного процесу.

5. Скласти матеріальний баланс виробництва.

6. Розробити інокулятор об’ємом 1 $м^3$ для отримання посівного матеріалу *E. coli B0016-080BB.*

Таким чином, даний дипломний проєкт має на меті не лише теоретичне, але й практичне значення для розвитку біотехнологічного виробництва бета- аланіну, що відповідає сучасним вимогам і тенденціям на ринку функціональних добавок.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

Аланін (амінопропіонова кислота) - замінна амінокислота (NH2 - CH4 - COOH), яка є одним з основних джерел енергії для м'язової тканини, головного мозку та центральної нервової системи. Аланін також підтримує імунну систему і бере участь у метаболізмі вуглеводів [1].

Основним недоліком початкового використання штамів, що виробляють аланін, була їх нездатність накопичувати аланін у ферментаційному середовищі у вигляді чистого оптичного ізомера. Було встановлено, що причиною накопичення аланіну у вигляді суміші (L- і D-ізомерів) є наявність аланін-рацемази в досліджених мікроорганізмах. Японським і китайським ученим вдалося отримати продуценти аланіну шляхом мутагенезу, такі як *Corynebacterium gelatinosum No. 7183* і *Brevibacterium flavum ATCC 21269*. Останній штам після 72 годин ферментації в колбах накопичував у середовищі 45 г/дм^3 D- і L-аланіну. До кінця 60-х років найкращим продуцентом аланіну вважався штам *Corynebacterium gelatinosum 483*, отриманий Самеджимою та його командою, який до кінця ферментації накопичував 17,5 г/дм^3 аланіну за початкової концентрації глюкози 10 %. Ці ж дослідники довели, що біосинтез аланіну в цьому штамі відбувається переважно через шлях L-аланін-дегідрогенази. Вчені з Вірменії змогли отримати штами-продуценти аланіну, які мали дві важливі відмінності від раніше відомих. По-перше, синтез у них проходить через трансаміназний шлях, а по-друге, штами *Corynebacterium* або *Brevibacterium* були спеціально позбавлені аланін-рацемази. Використовуючи

сахарозу як джерело вуглецю на мінімальному середовищі, штам *Brevibacterium flavum AA 5* продукував до 42 г/дм^3 аланіну [1].

Згодом були розроблені штами, які продукують значно більше аланіну. Так, штам LAP7 з роду *Arthrobacter*, який має високу активність аланін-дегідрогенази , в умовах підживлення глюкозою продукував до 76,7 г/дм^3 аланіну. Подібну кількість (до 71 г/дм^3) аланіну накопичували у ферментаційному середовищі рекомбінантні штами з введеними генами аланін-дегідрогенази (*Escherichia, Corynebacterium, Brevibacterium*) при обмеженій подачі кисню [1].

Наведені дані щодо мікробного синтезу аланіну свідчать про те, що досягнуті результати в ряді випадків перевищують аналогічні показники для багатьох інших амінокислот, промислове виробництво яких базується на мікробному синтезі. Проте, незважаючи на це, у літературі відсутні відомості про використання цих методів для промислового виробництва аланіну. Існує думка, що мікробний синтез аланіну може стати конкурентоспроможним за умови накопичення продукту в культуральній рідині на рівні не менше 200-400 г/дм^3 [1].

Одним із інструментів для створення нових високопродуктивних штамів-продуцентів є генна інженерія. Дослідження з культивування мікроорганізмів родів *Escherichia, Serratia, Corynebacterium, Arthrobacter*, які мають трансаміназну активність та каталізують реакції між аланіном і піровиноградною кислотою, а також між 2-оксоїзовалеріановою кислотою і валіном, вказують на можливість отримання амінокислот за допомогою рекомбінантних штамів бактерій. Вирощують ці бактерії в аеробних умовах на середовищі, що містить джерела вуглецю, азоту, вітамінів та мінеральних солей (при pH 7,2) протягом 7 діб при температурі 25–40 °С. Також досить часто використовують середовище, що містить джерела вуглецю, азоту, кислоти (оцтову, молочну, бурштинову), сечовину, іони хлору, сульфати, карбонати [1].

Амінокислоти можна отримати з використанням бактерій роду *Escherichia*. На середовищі з глюкозою штами *E. coli 57 і E. coli 103* накопичують 1,5–1,7 г/дм^3 аланіну за 48 годин в аеробних умовах при температурі 30–38 °С. Оптимальний pH складає 6,5–7,2 , а швидкість обертання - 250 об/хв. Склад живильного середовища: глюкоза - 6,0 %, сульфат амонію - 1,5 %, гідрофосфат калію - 0,15 %, сульфат магнію - 0,1 %, тіамін - 100 мкг/дм^3, крейда - 2,0 %; pH під час культивування підтримували аміаком або кислотами. Вказані штами отримані з штаму *E. coli K-12* методом ступінчастої мутації [1].

Крім того, перспективним є штам *E. coli* B0016-200BB, створений в результаті поєднання методів генної інженерії, рекомбінаційних технологій і адаптивної еволюції. Завдяки раціональному метаболічному інжинірингу та еволюційним підходам було значно підвищено його продуктивність і стабільність, що робить цей штам привабливим для промислового виробництва аланіну. *E. coli* B0016-200BB здатний досягати виходу аланіну на рівні 6,65 г/дм^3, що є значним покращенням порівняно з попередніми штамами [3].

Також аланін можна отримати культивуванням *Corynebacterium glutamicum ATCC13869* . Вихід амінокислоти становить до 5,8 г/дм^3. *C. glutamicum* вирощують на середовищі CM_2B, яке містить 1,0 % поліпептону, 1,0% екстракту дріжджів та 0,5 % NaCl також додають глюкозу у різних концентраціях . pH регулюють у межах від 6,0 до 7,0 за допомогою KOH або 0,2 М фосфатного буферного розчину натрію. Клітини вирощують при температурі 28°С [1].

Рекомбінантні штами Δ fasB , Δ fasBR , Δ fasB Δ pks13 і Δ fasBR Δ pks13 від *Corynebacterium glutamicum ATCC13869* були сконструйовані та продемонстрували підвищений вихід аланіну. Продукція була додатково посилена в штамах Δ fasB і Δ fasBR завдяки комбінаторній експресії

гетерологічних генів *Bacillus subtilis alaD*, що кодують аланіндегідрогеназу, і *Escherichia coli alaE,* що кодує білок експорту аланіну [1].

Отже, проаналізувавши усіх промислових продуцентів цільового продукту, можемо дійти висновку, що найбільш економічно доцільним та ефективним є саме штам *E. coli B0016-080BB.*

1.2 Систематичне положення

Таблиця 1.1 - Класифікація мікроорганізму-продуценту за визначником Берджі [42]:

Група 5:	Факультативні анаеробні грам-негативні палички
Царство:	*Bacteria*
Тип:	*Proteobacteria*
Клас:	*Gammaproteobacteria*
Ряд:	*Enterobacteriales*
Родина:	*Enterobacteriaceae*
Рід:	*Escherichia*
Вид:	*Escherichia coli*

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Escherichia coli - це грам-негативна, пряма, паличкоподібна, неспороутворююча бактерія, яка існує поодинці та парами. Клітини, як правило, паличкоподібні, з розміром 1-3 мкм × 0,4-0,7 мкм (мікрометр), довжиною близько 1 мкм, шириною 0,35 мкм і об'ємом 0,6-0,7 мкм (рис. 1.1). *E. coli* рухлива завдяки перитрихальному розташуванню джгутиків, і дуже мало штамів є нерухомими. Оптимальний ріст становить 37 °C , але деякі

лабораторні штами можуть розмножуватися при температурах до 49 °C . Для розмноження в сприятливих умовах потрібно всього 20 хвилин. У деяких *E. coli* виявлено полісахаридну капсулу. Бактерію можна чітко побачити за допомогою процедури фарбування за грамом, які створюють яскравий ореол на темному тлі. Вони мають тонку клітинну стінку лише з одним або двома шарами пептидоглікану. *Escherichia coli* також характеризується наявністю ліпополісахаридів (ЛПС) у зовнішній мембрані, які виконують захисну функцію.

Завдяки своїй високій адаптивності *E. coli* може виживати в різних середовищах, включаючи ґрунт, воду та шлунково-кишковий тракт людини і тварин, що робить її важливим об'єктом мікробіологічних досліджень та біотехнологічних застосувань [3].

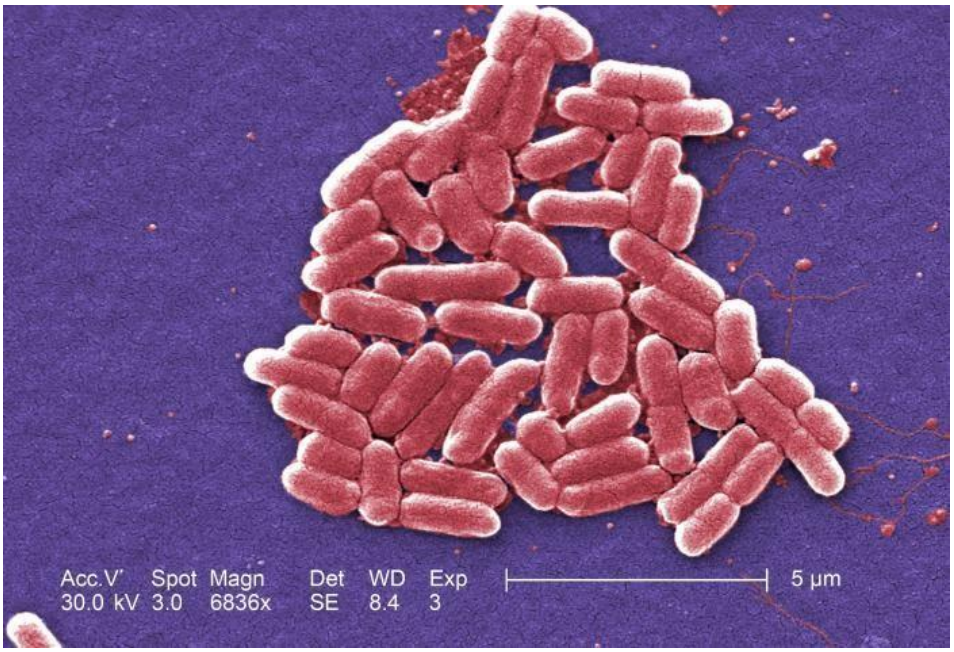


Рис. 1.1 - Скупчення грам-негативних, паличкоподібних бактерій *Escherichia coli* збільшення 6836X [2]

1.4 Культуральні ознаки

Клітини *Escherichia coli* можуть рости як на твердих, так і в рідких поживних середовищах за лабораторних умов. Вона здатна розвиватися на

мінімальному живильному середовищі, що містить глюкозу як джерело вуглецю та енергії, амонійні солі як джерело азоту, а також інші мінеральні солі та мікроелементи. Завдяки невибагливим живильним потребам *E. coli* легко культивується на стандартних поживних середовищах, таких як поживний агар, агар МакКонкі та агар EMB [3].

E. coli може рости при температурах від 10 °C до 40 °C, проте оптимальна температура для більшості штамів становить 37 °C. Деякі лабораторні штами здатні розмножуватися навіть при температурах до 49 °C. Бактерія виживає в діапазоні pH від 4,5 до 9,5, але найкраще її ріст спостерігається при нейтральному значенні pH 7,0. Водночас рівень кислотності, необхідний для росту, може змінюватися залежно від конкретного штаму *E. coli* [3].

На поживному агарі *E. coli* утворює великі, сірувато-білі, вологі, гладкі, непрозорі або напівпрозорі колонії. Свіжі культури мають гладку (S) форму, легко емульгуються у фізіологічному розчині, тоді як старіші культури набувають шорсткої (R) форми з тьмяною поверхнею і можуть аглютинувати (рис. 1.2). Зміна S-R пов'язана з втратою поверхневих антигенів та зниженням вірулентності [3].

Рис. 1.2 - *E. coli* на поживному агарі [3]

На агарі МакКонкі колонії *E. coli* набувають рожевого забарвлення завдяки ферментації лактози (рис. 1.3). Це дозволяє відрізняти їх від інших бактерій, зокрема грам-позитивних мікроорганізмів і видів *Salmonella*, які не ферментують лактозу та утворюють безбарвні колонії [3].

Рис. 1.3 - *E. coli* на агарі МакКонкі [4]

На агарі Ендо бактерії утворюють червоні колонії з характерним металево-зеленим блиском (рис. 1.4). У *E. coli* ця реакція настільки виражена, що фуксин кристалізується, надаючи колоніям інтенсивний зелений відтінок. Селективні агенти, такі як дезоксихолат натрію та лаурилсульфат натрію, пригнічують ріст неколіформних бактерій, дозволяючи *E. coli* ефективно метаболізувати лактозу з утворенням альдегіду та кислоти [4].

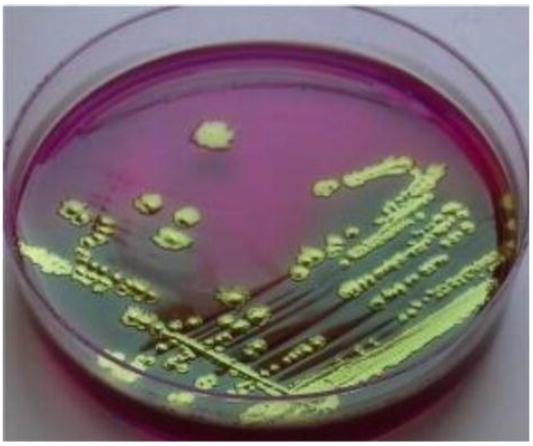


Рис. 1.4 - *E. coli* на агарі Ендо [3]

При вирощуванні *E. coli* на рідкому середовищі протягом 12–18 годин спостерігається рівномірне помутніння середовища через зростання кількості бактерій. Після тривалого інкубування (>72 год) на поверхні середовища утворюється плівка (пелікула) (рис.1.5). Водночас формуються щільні осади, які легко розсіюються при струшуванні [3].

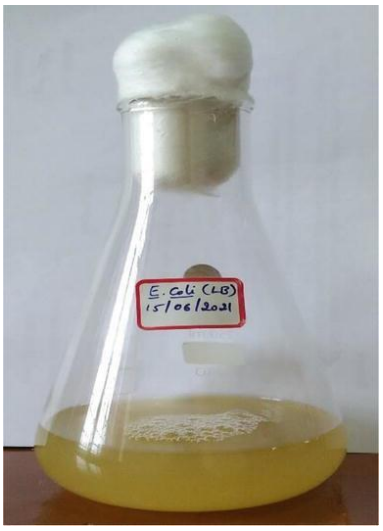


Рис. 1.5 - *E. coli* на рідкому середовищі [3]

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Escherichia coli (E. coli) – це грамнегативна, факультативно-анаеробна, паличкоподібна бактерія, що належить до родини Enterobacteriaceae. Вона є факультативним анаеробом, тобто може використовувати кисень у процесах аеробного дихання, але також здатна до ферментації в анаеробних умовах. Оптимальна температура росту – 37 °C, проте вона може розмножуватися в діапазоні 20–45 °C [5].

Бактерія активно ферментує глюкозу, лактозу, маніт, мальтозу та арабінозу з утворенням кислоти та газу, що є важливою диференційною ознакою. Вона позитивна на β-галактозидазу (ONPG-тест), що підтверджує здатність до ферментації лактози. Також є каталаза-позитивною, що свідчить про наявність ферменту каталази, здатного розкладати перекис водню на воду і кисень, та оксидаза-негативною, що вказує на відсутність цитохромоксидази.

У біохімічних тестах *E. coli* дає позитивну реакцію на індол (розщеплює триптофан з утворенням індолу, що визначається реактивом Ковача) і позитивну реакцію на метилово-червоний тест (MR), який підтверджує утворення змішаних кислот при ферментації глюкози. Однак тест Фогеса-Проскауера (VP), що визначає утворення ацетоїну, є негативним, так само як і тест на ферментацію цитрату (не використовує цитрат як єдине джерело вуглецю). E. coli не продукує уреазу, що є важливою диференційною ознакою, але вона має позитивні реакції на декарбоксилазу лізину та орнітин, що свідчить про її здатність до декарбоксилювання цих амінокислот. Також вона здатна відновлювати нітрати до нітритів, що є важливою діагностичною ознакою [4].

Бактерії *Escherichia coli* можуть зберігати життєздатність у водному та ґрунтовому середовищі протягом кількох місяців, що свідчить про їхню високу стійкість до зовнішніх факторів. Однак вони чутливі до високих температур: при нагріванні до 60 °C гинуть протягом 15 хвилин. Для їхнього знищення ефективними є різні дезінфікуючі засоби: 1 %-й розчин карболової кислоти та 5%-й розчин хлораміну нейтралізують бактерії за 10–15 хвилин, тоді як розчин сулеми у співвідношенні 1:1000 вбиває їх всього за 2 хвилини.

Escherichia coli здатна використовувати різні джерела азоту для свого росту та розвитку. Вона засвоює як неорганічні сполуки, зокрема мінеральні солі амонію, так і органічні речовини, серед яких амінокислоти, пептон, триптон та дріжджовий екстракт. Завдяки такій метаболічній гнучкості *E. coli* може ефективно адаптуватися до різних умов живлення [5].

Як і більшість інших грамнегативних бактерій, *Escherichia coli* розмножується шляхом бінарного поділу (перетяжки), під час якого одна клітина ділиться на дві ідентичні дочірні клітини. Цей процес відбувається без залучення механізмів статевого розмноження, тому передача генетичного матеріалу між клітинами в процесі поділу відсутня. У результаті кожна нова клітина є точною копією материнської, що забезпечує швидке зростання популяції за сприятливих умов [5].

1.6 Поширення в природі

Escherichia coli широко поширена у природі, оскільки є природним мешканцем кишечника теплокровних тварин і людини, звідки потрапляє у довкілля разом із фекаліями. Вона може тривалий час зберігати життєздатність у воді, ґрунті, на рослинах і різних поверхнях, особливо у вологих і прохолодних умовах. Основними джерелами поширення бактерії є забруднена вода, продукти харчування, ґрунт, предмети побуту та контакти з носіями. Виявляється у водоймах, ґрунтах і харчових продуктах, особливо якщо вони контактували із фекальними забрудненнями. У водному та ґрунтовому середовищі може виживати місяцями, добре переносить низькі температури.

У медичній та санітарній практиці *E. coli* використовується як індикатор фекального забруднення води, оскільки її наявність свідчить про можливу присутність інших патогенних мікроорганізмів, таких як віруси, паразити та інші ентеробактерії. Унаслідок своєї високої стійкості до навколишніх факторів та швидкого розмноження, *Escherichia coli* є важливим мікроорганізмом, що відіграє значну роль у екологічному балансі, проте за певних умов може становити загрозу для здоров’я людини [6].

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Цільовий продукт – β-аланін

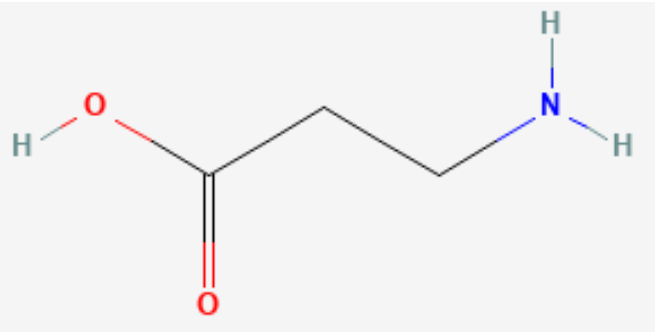


Рисунок 2.1 - Формула β-аланіну [14]

β-аланін, або 3-амінопропанова кислота, є амінокислотою, в якій аміногрупа приєднана до другого атома вуглецю подалі від карбоксилатної групи, також відомої як β-вуглець (рис.2.1). β-аланін є єдиною природною β-амінокислотою, яка зустрічається у тварин, рослин і мікроорганізмів. На відміну від свого ізомеру α-аланіну, β-аланін не має стереоцентру, тому він не має стереоізомерів.

β-аланін був ідентифікований як складова амінокислота карнозину російським ученим Гулевичем на початку 1900-х років. Він класифікується як незамінна амінокислота і утворюється шляхом розкладання дигідроурацилу та карнозину in vivo .

β-аланін не кодується в геномі організмів для складання білка. Хоча він не входить до білків, β-аланін є компонентом багатьох важливих природних

продуктів, включаючи дипептид карнозин , ансерин і пантотенову кислоту, також відому як вітамін B5, компонент коензиму A.

β-аланін є попередником карнозину, дипептиду, який має антиоксидантні властивості та міститься у високих концентраціях у скелетних м'язах, тканинах шлунково-кишкового тракту та мозку людини. Карнозин синтезується з β-аланіну та L-гістидину за допомогою карнозинсинтази у присутності АТФ 2 . Реакція може бути зворотною, коли дипептид розкладається карнозиназою до β-аланіну та L-гістидину [15].

- Молекулярна формула: $C_3H_7NO_2$;
- Молекулярна маса: 89,093 г/моль ;
- Ізоелектрична точка: 6,9 ;
- Кислотність (pKa): 3,55 і 10,24 ;
- Температура плавлення: 200 °C ;
- Розчинність: Розчинний у воді ; Нерозчинний в ефірі та ацетоні ; Малорозчинний в етанолі [14]

2.2 Методи синтезу β-аланіну

Останніми роками ринковий попит на β-аланін демонструє стабільне зростання. Ця сполука входить до списку 12 найперспективніших тривуглецевих платформних сполук у світі. Згідно з даними дослідження Global Info Research, у 2022 році світовий ринок β-аланіну оцінювався в 20 мільйонів доларів США, і очікується, що до 2029 року його обсяг зросте до 31 мільйона доларів США зі середньорічним темпом зростання (CAGR) у 7,0 % протягом прогнозованого періоду (Global Info Research, 2023) [7].

На сьогоднішній день у промисловості для отримання β-аланіну використовують як хімічні, так і біологічні методи. Хімічний підхід характеризується екстремальними умовами реакції, такими як високі температури, тиск, а також застосування сильних кислот або лугів. Це призводить до утворення значної кількості побічних продуктів і потребує

значних енергетичних витрат. У свою чергу, біологічні методи, які включають ферментативну конверсію та синтез із використанням цільної клітини, вирізняються низькою собівартістю виробництва, м'якими умовами реакції, високим рівнем безпеки та екологічністю [7].

2.2.1 Хімічний синтез

Для хімічного синтезу β-аланіну використовуються різні вихідні матеріали, такі як акрилова кислота, акрилонітрил, β-аміноакрилонітрил або сукцинімід. Незважаючи на розвиток нових методів, традиційний процес, розроблений у минулому столітті, досі залишається основним. Найбільш поширеними субстратами в цьому процесі є акрилова кислота та акрилонітрил завдяки їхній доступності та відносно простій хімічній обробці [8].

2.2.1.1 Синтез β-аланіну з акрилової кислоти

Акрилова кислота (або акрилат або акрилатна сіль) вступає в реакцію амоніювання з аміаком за умов високої температури та високого тиску з утворенням β-аланіну, і реакція амоніювання акрилової кислоти проходить так, як показано на (рис. 2.2) [19].

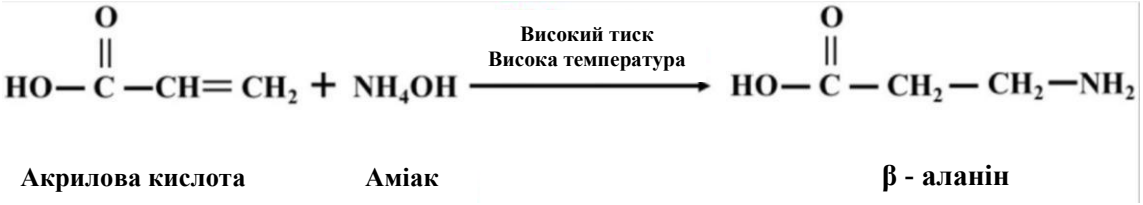


Рис. 2.2 - Реакція амоніювання акрилової кислоти [7]

Контролюючи умови реакції або приймаючи інші заходи оптимізації, кінцевий вихід β-аланіну в реакції амоніювання акрилової кислоти можна збільшити до 90%, з чистотою понад 95%. Цей метод синтезу є простим, має високий вихід і є ідеальним промисловим способом виробництва [8].

2.2.1.2 β-амінопропіонітрил як субстрат

У цьому методі β-амінопропіонітрил використовується як субстрат, а β-аланін може бути синтезований після одностадійного гідролізу ціаногруп .

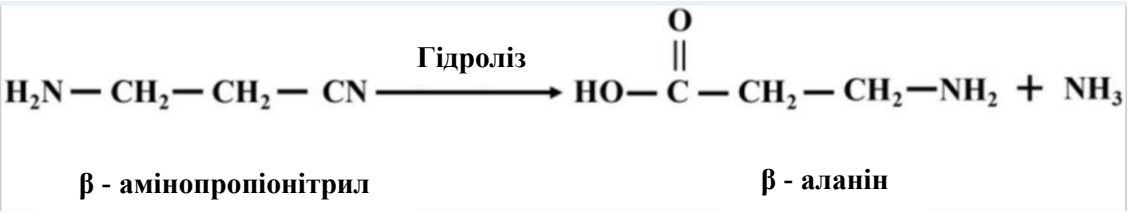


Рис. 2.3 - Реакція гідролізу β-амінопропіонітрилу [7]

Метод можна класифікувати відповідно до різних каталізаторів, що використовуються, як кислотний і лужний гідроліз. Карлсон у 1943 р. повідомив про гідроліз β-амінопропіонітрилу в аміаку при 200 °C протягом 4 годин і вихід β-аланіну приблизно 20 %. Форд у 1945 р. вивчав гідроліз β-амінопропіонітрилу в гідроксиді барію; у 25–50 % розчині гідроксиду барію при температурі реакції 90–95 °C протягом 20–30 хв вихід β-аланіну становив 88–92 %. На практиці для гідролізу β-амінопропіонітрилу використовують рідкий луг (гідроксид натрію або гідроксид калію), а потім кислотну нейтралізацію (рис. 2.3). Цей спосіб характеризується високим виходом реакції, а недоліком є утворення великої кількості солі [7].

2.2.1.3 Сукцинімід як субстрат

Сукцинімід проходить реакцію деградації (реакція Гофмана) у лужному розчині хлорату натрію (суміш гіпохлориту натрію, гідроксиду натрію та карбонату натрію) з утворенням β-аланіну за допомогою реакції (рис. 2.4).

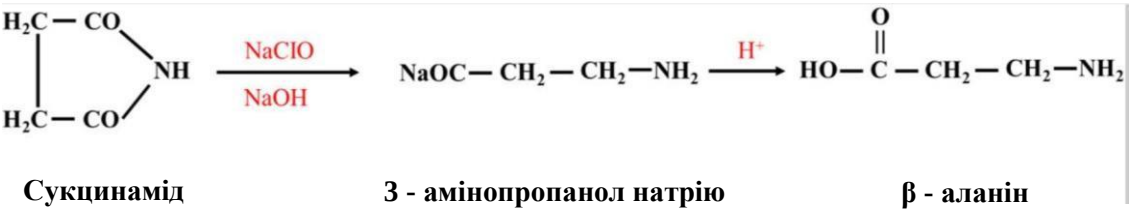
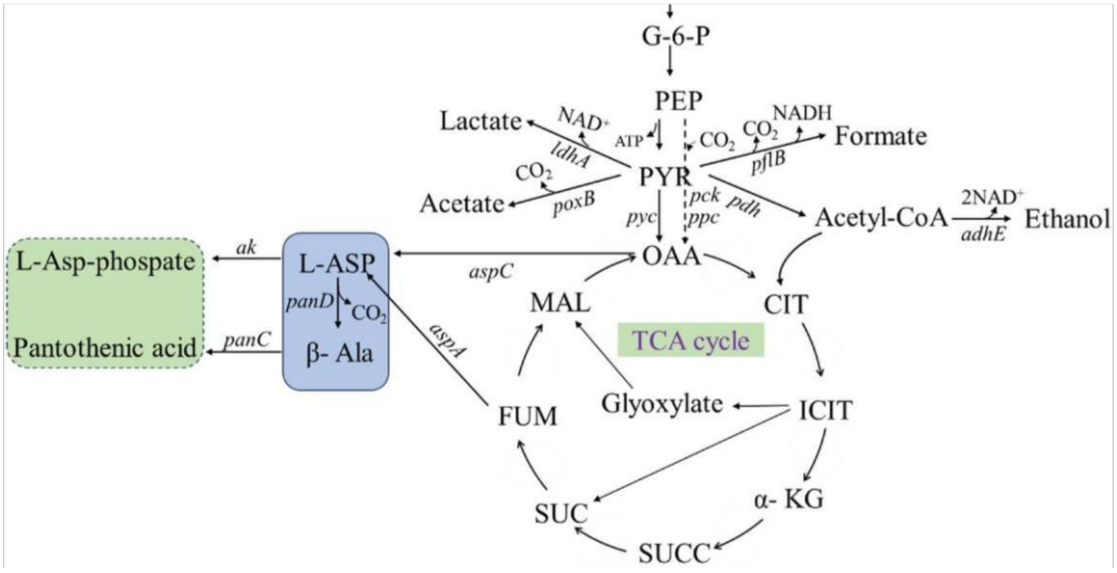


Рис. 2.4 - Деградація (реакція Гофмана) сукциніміду [20]

Однак цей метод дає багато солей, очищення продукту є складним, а вихід невисокий (приблизно 50 %, у перерахунку на сукцинімід), тому він не може бути індустріалізований [7].

2.2.2 Біологічний синтез

Виробництво β-аланіну шляхом мікробної ферментації в основному залежить від шляху синтезу β-аланіну в організмах (рис. 2.5), який виглядає наступним чином:



PEP: фосфоенолпіруват; G-6-P: глюкозо-6 фосфат; PYR: піруват; OAA: оксалоацетат; CIT: лимонна кислота; ICIT: ізолимонна кислота; α-KG: α-Кетоглутарова кислота; SUCC: сукциніл КоА; SUC: бурштинова кислота; ФУМ: фумарова кислота; MAL: яблучна кислота; L-ASP: L-аспартат; β-Ala: β-аланін; adhE: етанолдегідрогеназа; pflB: піруватформіат-ліаза; ldhA: молочнокисла дегідрогеназа; pdh: піруватдегідрогеназа; poxB : піруватоксидаза; pyc : піруватдекарбоксилаза; pck : фосфоенолпіруваткарбоксикіназа; ppc : фосфоенолпіруваткарбоксилаза; ак : аспартокіназа; aspC : аспартатамінотрансфераза; aspA : аспартат аміак-ліаза; panD : L-аспартат-α-декарбоксилаза; panC : пантотенатсинтетаза [7]

Рис. 2.5 - Метаболічні шляхи біосинтезу β-аланіну

Глюкоза транспортується з позаклітинного у внутрішньоклітинний простір, каталізується глюкокіназою з утворенням глюкози-6. -фосфат (G-6-P), а потім фосфоенолпіруват (PEP). PEP проходить три реакції для синтезу β-аланіну:

1. PEP каталізується фосфоенолпіруваткарбоксикіназою та фосфоенолпіруваткарбоксилазою до оксалоацетату (OAA), який потім каталізується аспартатамінотрансферазою з утворенням L-аспартату (L-Asp), а ADC каталізує синтез о β-аланін з L-аспартату.

2. PEP продовжує продукувати піруват (PYR), який у присутності піруваткарбоксилази генерує OAA, який знову вступає в шлях синтезу β-аланіну.

3. PEP генерує ацетилкоензим A (ацетил-КоА) під дією піруватдегідрогенази, яка входить до циклу трикарбонових кислот (TCA-цикл), а проміжний продукт, фумарова кислота, може каталізуватися AspA з утворенням L-аспартату. Потім під дією ADC L-аспартат перетворюється на β-аланін.

Наразі поширеними джерелами є *Corynebacterium glutamicum, Bacillus subtilis , Escherichia coli, Tribolium castaneum і Bacillus tequilensis*. Під час гетерологічної експресії генів panD з різних джерел промотор panD можна оптимізувати для подальшого збільшення виходу β-аланіну. Вихід β-аланіну також можна додатково покращити шляхом збільшення кількості копій panD , але надмірна експресія panD може створити значне метаболічне навантаження на бактерію, що призведе до зниження виходу β-аланіну [8].

2.3 Процес культивування для біосинтезу β-аланіну

Виготовлення препарату бета-аланіну у таблетках передбачає кілька етапів, що включають біохімічні процеси, які здійснюються під час культивування мікроорганізмів у ферментері.

На першому етапі виробництва бета-аланіну використовуються спеціально підібрані штами мікроорганізмів, які здатні синтезувати бета-аланін, шляхом біотехнологічних процесів. В основі цього етапу лежить процес ферментації — один з найбільш ефективних методів отримання амінокислот, зокрема бета-аланіну, використовуючи живі організми, такі як бактерії чи гриби, які мають здатність до активного метаболізму.

Мікроорганізми вибираються на основі їх здатності до синтезу амінокислот, і в даному випадку це саме бета-аланін [9].

У даному дипломному проєкті ми розглядаємо *Escherichia coli*, яка є одним із ключових мікроорганізмів, що використовується для синтезу β-аланіну. Ця грамнегативна, факультативно анаеробна бактерія характеризується швидким ростом, високою ефективністю метаболізму та добре вивченою генетикою. Завдяки своїй здатності легко піддаватися генетичним модифікаціям, *E. coli* широко використовується в біотехнології для конструювання метаболічних шляхів, що сприяють біосинтезу амінокислот, зокрема β-аланіну.

Для отримання бета-аланіну в умовах ферментації, *E. coli* споживає органічні речовини, які слугують джерелом вуглецю, азоту та енергії для їх росту і розвитку. Ці органічні сполуки можуть включати цукри, аміачні солі та інші поживні елементи, що необхідні для підтримки метаболічних процесів у клітинах мікроорганізмів. До складу поживного середовища здебільшого входять: джерела вуглецю (глюкоза або сахароза); джерела азоту (сульфат амонію, аміачна сіль); додаткові компоненти (вітаміни, мінеральні солі).

Під час ферментації, *E. coli* активно споживає ці компоненти середовища і в результаті їх метаболізму утворюються різні продукти, серед яких є бета-аланін. Важливим аспектом цього процесу є підтримка оптимальних умов для росту мікроорганізмів, таких як температура (37-38 °C), pH середовища (7-7,1) , а також концентрація розчинення кисню, оскільки це безпосередньо впливає на ефективність синтезу амінокислот. Бета-аланін є продуктом, який утворюється як результат метаболічних шляхів в організмах, здатних до його біосинтезу.

Виробничий процес зазвичай відбувається в спеціалізованих біореакторах (ферментерах), де забезпечується постійний контроль за умовами культивування - концентрацією поживних речовин, температурою, pH середовища і рівнем аерації. Всі ці фактори взаємодіють і визначають, наскільки ефективно *E. coli* будуть синтезувати бета-аланін.

Процес виробництва бета-аланіну починається з підготовки поживного середовище, яке є основою для виробництва. Для цього обираються такі компоненти середовища, які забезпечують необхідні умови для росту та активного метаболізму, що використовуються для синтезу бета-аланіну.

Середовище містить джерела вуглецю, зокрема такі, як глюкоза або сахароза. Вуглець є важливим елементом для метаболічних процесів , оскільки він використовується для синтезу органічних сполук та утворення енергії в клітинах. Вуглецеві джерела допомагають забезпечити достатній рівень енергії для підтримки активного росту і синтезу необхідних продуктів [10].

Джерела азоту також є важливою складовою середовища. Це можуть бути аміачна сіль або сульфат амонію, які надають азот, необхідний для синтезу амінокислот, білків та інших важливих сполук. Азот є ключовим елементом, що впливає на ріст і ділення клітин, а також на синтез цільового продукту — бета-аланіну.

Крім основних компонентів, до середовища додаються вітаміни та мінеральні солі, які відіграють важливу роль у забезпеченні належного функціонування ферментативних систем, стимулюючи їх активність та метаболізм. Вітаміни та мінерали допомагають підтримувати нормальне функціонування клітин, сприяючи синтезу ферментів, необхідних для метаболічних процесів.

Особлива увага приділяється контролю pH середовища. Оптимальний рівень кислотно-лужного балансу для росту *E. coli,* що використовуються у виробництві бета-аланіну, становить 7-7,1. Такий pH є сприятливим для метаболічних процесів, зокрема для ферментативних реакцій, які сприяють утворенню бета-аланіну. Важливо, щоб pH залишався стабільним протягом всього процесу ферментації, оскільки зміни в кислотно-лужному середовищі можуть негативно вплинути на активність мікроорганізмів і ефективність синтезу продукту.

Завдяки належній підготовці поживного середовище створюються оптимальні умови для культивування, що сприяють високій ефективності виробництва бета-аланіну.

Культивування проводять у ферментері в умовах аеробного процесу, що означає наявність достатньої кількості кисню для підтримки метаболічної активності бактерії. Аеробне середовище є необхідним для більшості штамів мікроорганізмів, які використовуються для виробництва бета-аланіну, оскільки кисень сприяє ефективному окисленню органічних сполук і забезпечує оптимальний енергетичний метаболізм [6].

Для цього в ферментер постійно подається кисень, що дозволяє мікроорганізмам здійснювати дихання та інші аеробні процеси, необхідні для їхнього росту й розвитку. У такий спосіб забезпечується високий рівень активності бактерій, що стимулює їх ріст, розмноження та утворення продуктів обміну, зокрема бета-аланіну. Оскільки мікроорганізми використовують кисень для окислення органічних сполук, це дозволяє їм отримувати енергію, необхідну для життєдіяльності, а також для синтезу бета-аланіну як кінцевого продукту.

Під час культивування відбувається інтенсивний процес росту бактерій, що сприяє накопиченню бета-аланіну в поживному середовищі. Залежно від умов і тривалості ферментації, концентрація бета-аланіну зростає, що робить процес ефективним для подальшого збору амінокислоти.

Для підтримки оптимальних аеробних умов у ферментері, поряд з подачею кисню, контролюються інші параметри процесу, такі як температура, pH, концентрація поживних речовин, що забезпечує стабільність і максимальну продуктивність ферментації. Точний контроль за умовами культивування допомагає досягти високої ефективності синтезу бета-аланіну та підтримати стабільність роботи мікроорганізмів.

Процес ферментації зазвичай триває 24-48 годин, в залежності від виду бактерій та умов культивування. Протягом цього часу бактерії активно

споживають вуглеводи як основне джерело енергії, а також активно метаболізують інші компоненти середовища.

Після завершення процесу ферментації на наступному етапі відбувається виділення бета-аланіну з культуральної рідини. Оскільки в результаті ферментації мікроорганізми продукують бета-аланін, але також залишаються в рідкому середовищі, необхідно відокремити бактерії від цієї рідини для подальшого очищення та концентрації продукту.

Одним із найбільш ефективних методів для відокремлення бактерій від рідини є центрифугування. Під час центрифугування суміш, що складається з рідкого середовища та мікроорганізмів, піддається обертальному руху. Через дію відцентрової сили бактерії осідають на дні центрифужної трубки, утворюючи осад. Таким чином, рідина, яка містить бета-аланін, може бути акуратно відокремлена від бактерій і зібрана для подальшої обробки [6].

Після того, як бактерії були успішно відокремлені, залишкова рідина, що містить бета-аланін, піддається подальшій очистці. Очищення зазвичай включає кілька етапів, таких як фільтрація, сорбція або використання спеціальних мембранних технологій для видалення домішок і залишкових органічних сполук, які можуть бути присутніми в рідині. Це дозволяє підвищити чистоту бета-аланіну та забезпечити високий рівень його концентрації.

На наступному етапі проводиться концентрація продукту, що дозволяє збільшити його вміст у рідкому середовищі до бажаного рівня. Це може бути досягнуто за допомогою випаровування, ультрафільтрації або інших методів, що дозволяють знизити об'єм рідини без втрати корисних компонентів.

Після очищення та концентрації бета-аланіну цей продукт може бути підготовлений до подальших стадій переробки, таких як сушка, упаковка або приготування препаратів, зокрема таблеток, для кінцевого використання в промисловості чи медичних цілях.

Очищення бета-аланіну з культуральної рідини є важливим етапом у процесі його виробництва, оскільки під час ферментації можуть утворюватися

різноманітні домішки, які необхідно видалити для підвищення чистоти кінцевого продукту. Для цього широко застосовують методи фільтрації та осадження.

Фільтрація дозволяє ефективно видаляти дрібні тверді частки та суспензії з рідини. Це може бути досягнуто за допомогою різних типів фільтрів - від простих механічних до більш складних мембранних технологій, таких як ультрафільтрація або нано-фільтрація. Ці методи допомагають знизити вміст небажаних органічних або неорганічних домішок, що можуть залишитися в рідині після завершення ферментації.

Після очищення бета-аланін може бути виділений в кристалічній формі або як концентрат. У випадку кристалізації процес включає поступове охолодження або випаровування розчинника, що дозволяє бета-аланіну утворити кристали. Цей процес також дозволяє зберегти високу чистоту кінцевого продукту, оскільки кристали будуть містити мінімальну кількість домішок. Концентрат бета-аланіну є більш концентрованою формою продукту, що може бути використаний у подальших етапах виробництва, таких як виготовлення таблеток, порошків або інших фармацевтичних форм.

Таким чином, за допомогою фільтрації, осадження та кристалізації вдається значно покращити якість бета-аланіну, зменшуючи кількість небажаних домішок та підвищуючи його чистоту. Це дозволяє отримати продукт, який відповідає високим вимогам для використання в різних галузях, зокрема в фармацевтичній промисловості та для виробництва добавок.

Після очищення та стабілізації бета-аланіну наступним етапом є формування препарату у вигляді таблеток. Цей процес включає кілька ключових кроків, що забезпечують отримання продукту з бажаними фізичними та хімічними властивостями.

Першим етапом є підготовка суміші для таблетування. До очищеного бета-аланіну додаються допоміжні компоненти, які виконують різні функції у складі таблетки. Наповнювачі, які використовуються для збільшення об'єму таблетки та забезпечення її правильних розмірів. До таких речовин можуть

належати інертні речовини, наприклад, кальцію фосфат, лактоза або крохмаль [11].

Стабілізатори, які допомагають зберегти стабільність активної речовини протягом часу зберігання, попереджаючи її деградацію або реакції з іншими компонентами таблетки. До стабілізаторів можуть входити антиоксиданти або добавки, що запобігають гігроскопічності та зберігають властивості препарату.

Зв'язувальні речовини, які утримують усі компоненти таблетки разом, забезпечуючи її цілісність та міцність. Це можуть бути різноманітні полімери, наприклад, целюлоза або повідон.

Речовини, що покращують розчинність, якщо це необхідно для досягнення оптимального засвоєння бета-аланіну організмом після його потрапляння в шлунково-кишковий тракт.

Після ретельного змішування цих компонентів утворюється однорідна порошкова суміш, яка готова до пресування.

Процес формування таблеток здійснюється за допомогою спеціальних прес-форм. На цьому етапі суміш порошку піддається пресуванню в спеціальних пристроях, які надають продукту відповідну форму і щільність. Пресування забезпечує необхідну міцність таблетки, а також визначає її розміри та вагу.

Таблетки отримують бажану форму, наприклад, круглу або овальну, а також потрібну щільність, щоб вони не розпадались при звичайному використанні, але також добре розчинялись у шлунку. Під час пресування важливо забезпечити однакову дозування бета-аланіну в кожній таблетці.

Завершальний етап після пресування включає окреме пакування таблеток, яке здійснюється в захисні упаковки, що запобігають їх впливу на вологу, світло та інші фактори, які можуть знизити якість препарату. Виробничий процес завершується контролем якості готових таблеток на відповідність всім вимогам, які стосуються активних і допоміжних інгредієнтів, зовнішнього вигляду та механічної міцності.

Таким чином, формування препарату бета-аланіну у вигляді таблеток є важливим етапом, що вимагає точності і контролю на всіх етапах, щоб забезпечити безпеку і ефективність кінцевого продукту.

Останнім етапом виробництва препарату бета-аланіну є пакування таблеток. На цьому етапі забезпечується належний захист кінцевого продукту, що гарантує його ефективність та безпеку для споживачів.

Перед пакуванням таблетки перевіряються на відповідність встановленим стандартам, зокрема, на правильність дозування активної речовини, розміри та форму. Кожна таблетка повинна містити певну кількість бета-аланіну, яка забезпечує його терапевтичну ефективність відповідно до встановленої дозування. Пакування таблеток є важливим для збереження стабільності та якості препарату протягом усього терміну зберігання.

Таблетки пакуються в спеціальні контейнери, які виконують кілька функцій [12]:

1. Захист від впливу вологи. Вологість може негативно впливати на якість препарату, сприяючи його деградації або порушенню структури. Тому пакування часто включає використання вологозахисних матеріалів, таких як герметичні контейнери або пакети з контрольованою вологістю;
2. Захист від світла. Світло може сприяти руйнуванню деяких активних речовин у складі препарату. Тому таблетки часто упаковуються в непрозорі матеріали або упаковки, що захищають від прямих сонячних променів;
3. Захист від механічних пошкоджень. Для цього використовуються спеціальні пакувальні матеріали, які можуть амортизувати удари або інші фізичні впливи, що можуть виникати під час транспортування та зберігання;
4. Захист від інших факторів навколишнього середовища, таких як повітря чи агресивні хімічні речовини. Препарат упаковується таким чином, щоб мінімізувати ризики забруднення або реакцій із зовнішнім середовищем.

Найчастіше таблетки пакуються в пластикові або скляні флакони, які оснащені захисними елементами, такими як контрольована ковпачкова система або пломби, що гарантують, що упаковка не була порушена до моменту споживання. Також можливе пакування в блістери — спеціальні осередки, які захищають таблетки від пошкоджень і забруднення, а також забезпечують зручність дозування.

Після пакування кожна упаковка проходить етикетування, на якому вказуються всі необхідні дані: інформація про виробника, термін придатності, умови зберігання, інструкція по застосуванню і інші важливі дані для споживача.

Таким чином, пакування є важливим етапом, що гарантує збереження всіх властивостей препарату до моменту його використання, забезпечуючи максимальну якість і ефективність.

Усі етапи виробництва, від ферментації до упаковки, строго контролюються відповідно до стандартів якості та безпеки, що забезпечує виготовлення високоякісного препарату , готового до використання у медичних та спортивних цілях.

Контроль таблеток проводять відповідно до вимог монографій ДФУ: опис, ідентифікація, середня маса і однорідність дозованих одиниць; розчинність - проводять для підтвердження вивільнення АФІ; розпадність; стираність, стійкість до розчавлення, втрата в масі або вода; супутні домішки, залишкові кількості органічних розчинників (при використанні їх у технології); мікробіологічна чистота, кількісне визначення та ін [13].

2.4 Методи очистки цільового продукту

При промисловому виробництві β-аланіну очищення є важливим етапом, що визначає якість кінцевого продукту та його відповідність технологічним і регуляторним вимогам. Процес спрямований на видалення залишкових реагентів, побічних продуктів синтезу, механічних домішок та розчинників. Залежно від масштабів виробництва та необхідного рівня

чистоти застосовуються різні методи, кожен із яких має свої переваги та недоліки.

Одним із найефективніших і водночас економічно вигідних методів є кристалізація, яка базується на різній розчинності аланіну та домішок у різних розчинниках при зміні температури. У промислових умовах застосовують рекристалізацію з водно-спиртових сумішей, що дозволяє отримати високочистий продукт. Цей метод має значні переваги, зокрема простоту реалізації, низьку собівартість та можливість масштабування. Проте він не забезпечує повного видалення всіх розчинних домішок і потребує додаткових етапів очищення.

Для глибшого очищення аланіну використовують іонообмінну хроматографію, яка дозволяє ефективно усувати залишки неорганічних солей та каталітичних домішок. Іонообмінна хроматографія ґрунтується на використанні спеціальних іонообмінних смол, які зв’язують небажані іони (катіони або аніони) та дозволяють отримати більш чистий продукт . Даний метод ефективний для видалення залишкових кислот, солей та каталітичних домішок, які не можуть бути усунуті шляхом кристалізації. Він забезпечує високу чистоту кінцевого продукту, але має високу вартість, потребує складного обладнання та регулярної регенерації сорбентів, що ускладнює його застосування у великомасштабному виробництві.

Ще одним методом очищення є екстракція, яка використовується для видалення органічних домішок, що можуть залишатися після синтезу. Процес передбачає використання органічного розчинника, у якому домішки розчиняються краще, ніж сам аланін. Метод добре підходить для видалення небажаних побічних продуктів, проте вимагає застосування потенційно токсичних розчинників, які необхідно ретельно видаляти, щоб не забруднити кінцевий продукт.

Додатковими фізичними методами очищення є фільтрація та центрифугування, які дозволяють механічно видалити нерозчинні домішки та великі частинки після реакції або кристалізації. Вони є простими у реалізації,

не потребують хімічних реагентів та можуть бути легко впроваджені у виробничий процес. Проте ці методи не дозволяють позбутися розчинних домішок, тому їх зазвичай застосовують як попередній етап очищення перед іншими методами.

Остаточний етап очищення включає сушіння та термічну обробку, які сприяють видаленню залишкової вологи та летких домішок. Процес може проводитися у вакуумних або конвекційних сушильних установках. Він забезпечує стабільність продукту при зберіганні, однак не видаляє хімічні домішки та є скоріше допоміжним процесом.

З огляду на всі методи, найбільш оптимальним для промислового очищення β-аланіну є поєднання кристалізації та іонообмінної хроматографії. Кристалізація забезпечує високу економічну ефективність і дозволяє отримати основний обсяг очищеного продукту, а іонообмінна хроматографія гарантує видалення залишкових неорганічних домішок, що значно покращує якість кінцевого продукту. Таке поєднання методів дозволяє досягти необхідного рівня чистоти при оптимальних витратах, що робить його найкращим вибором для промислової реалізації [16].

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

β-аланін виконує важливі фізіологічні функції в метаболізмі тварин, рослин і мікроорганізмів. Одна з основних функцій β-аланіну в клітинах полягає в тому, щоб служити попередником для синтезу карнозину, молекули, яка допомагає регулювати рівень pH у клітинах.

Карнозин діє як буфер, нейтралізуючи накопичення іонів водню, які можуть призвести до закислення клітини. β-аланін поглинається клітинами і використовується для синтезу карнозину, покращуючи ріст і життєздатність клітин.

Оскільки β-аланін сприяє підвищенню вироблення карнозину, який допомагає регулювати рівень pH у клітинах, його часто використовують як добавку для культивування клітин. Карнозин нейтралізує іони водню в

культуральному середовищі, тому додавання β-аланіну може запобігати його закисленню, покращуючи ріст і життєздатність клітин.

Не всі клітинні лінії потребують β-аланіну в своєму культуральному середовищі. Його доцільність залежить від різних факторів, зокрема типу клітинної лінії, її метаболічних потреб, рівня pH середовища та тривалості культивування. Наприклад, скелетні, серцеві та гладенькі м'язові клітини мають вищу потребу в карнозині, тому можуть отримати користь від β-аланіну для підтримки оптимального рівня pH. Також нейрональні клітини та деякі ракові клітинні лінії можуть позитивно реагувати на додавання цієї амінокислоти.

Однак β-аланін може бути не лише непотрібним, а й навіть мати негативний вплив на деякі інші клітини. Наприклад, незлоякісні MCF-10a та злоякісні MCF-7 епітеліальні клітини молочної залози продемонстрували пригнічення міграції та проліферації клітин шляхом додавання β-аланіну.

β-аланін також діє як попередник ансерину, іншого дипептиду, який синтезується в клітині. Доведено, що і карнозин, і ансерин мають антиоксидантні та протизапальні властивості та можуть сприяти підтримці здоров'я та функціонування клітин . Таким чином, потік β-аланіну відіграє цитопротекторну роль для клітин, які піддаються гіпоксичному стресу.

β-аланін також є низькомолекулярним нейромедіатором. Він є неселективним агоністом рецепторів гліцину та лігандом зв'язаного з G-білком орфанного рецептора TGR7 (MrgD) у нейронах 3 . β-аланін вивільняється з нейронів, коли вони відповідають на електричну стимуляцію, і пригнічує збудження нейронів.

У *E. coli* β-аланін також є прямим попередником у біосинтезі пантотенової кислоти, або вітаміну B5, і має вирішальне значення для біотехнологічного виробництва вітаміну B_5 [15].

РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Протягом останнього століття *Escherichia coli* стала одним із найбільш вивчених організмів на Землі. Завдяки таким характеристикам, як генетична доступність, сприятливі умови зростання, добре вивчена біохімія та фізіологія, а також наявність різноманітних інструментів генетичної маніпуляції, *E. coli* є ідеальною платформою для промислового виробництва. Штами *E. coli* легко культивувати, вони мають короткий час подвоєння і здатні розвиватися в різних умовах. Найважливішим фактором є можливість легкої генетичної маніпуляції, що значно спрощує дослідження фізіології клітин і створення нових фенотипів. Завдяки широкому набору методів молекулярного клонування та генетичних інструментів, розроблених для *E. coli*, швидкий розвиток нових штамів може значно знизити витрати на промислове виробництво.

Генетичний матеріал *Escherichia coli* представлений у вигляді дволанцюгової молекули ДНК, маса якої становить приблизно 3×10^9 дальтонів. Ця ДНК має кільцеву структуру, що забезпечує її компактне розташування в клітині. Процес реплікації відбувається біспрямовано: синтез нових ланцюгів починається з певної стартової точки, звідки утворюються дві реплікаційні вилки. Вони просуваються у протилежних напрямках уздовж кільцевої молекули ДНК, поки не зійдуться в кінцевій точці, де завершується формування дочірніх молекул, і новосинтезовані ДНК відокремлюються одна від одної [18].

Генетичний апарат *E. coli* складається з кільцевої дволанцюгової молекули ДНК, загальна довжина якої становить 4639211 пар нуклеотидів. На

ілюстрації 3.1 представлено схему генетичної карти хромосоми штаму *E. coli K-12*. На цій схемі відображено шкалу пар нуклеотидів, що починається з першої нуклеотидної пари в некодуючій послідовності, розташованій між генами lasT і thrL, а також шкалу часу, виражену в хвилинах.

Геном *E. coli* (рис. 3.1) у своїй структурі містить різні функціональні ділянки. Найбільша частка припадає на білкові гени, які займають 87,8% усієї геномної послідовності. Окрім цього, 0,8% нуклеотидного складу відведено під стабільні молекули РНК, необхідні для життєдіяльності клітини. Некодуючі повторювані послідовності складають 0,7% геному. Решта 11% охоплює регуляторні елементи, що контролюють експресію генів та інші клітинні процеси [17].

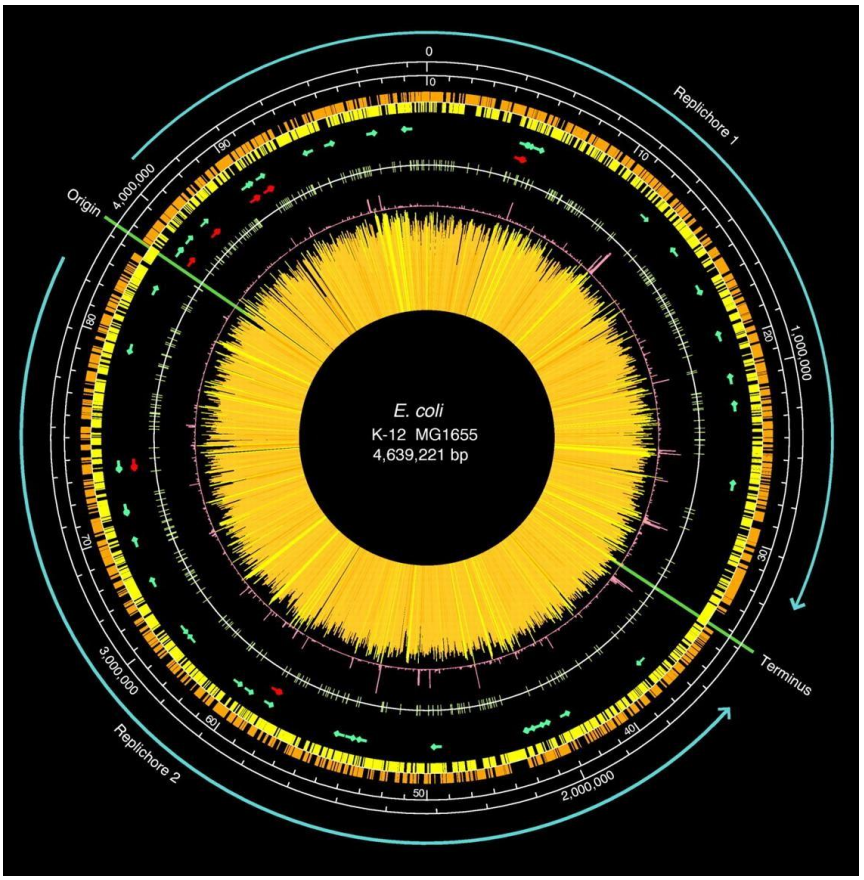


Рисунок 3.1 – Генетична карта *E. coli K-12* [17]

На ілюстрації процес ініціації та завершення реплікації представлений у вигляді блакитних ліній, доповнених стрілками, які вказують напрямок. Ці

графічні елементи відображають два реплікона, позначені як 1 і 2, які є окремими ділянками молекули ДНК, що піддаються процесу реплікації.

Генетичний розподіл здійснюється в двох зовнішніх кільцеподібних структурах. На зображенні гени, що знаходяться на представленому ланцюзі, позначені помаранчевими прямокутниками, тоді як жовті прямокутники вказують на гени, розташовані на протилежному ланцюзі ДНК. Червоні стрілки візуалізують місця розташування та напрямок транскрипції генів рРНК, у той час як зелені стрілки вказують на локалізацію генів, що кодують тРНК.

Наступне кільце містить інформацію про розташування REP-послідовностей у межах геному, що представлені у вигляді радіального маркування. У самому центрі схеми розміщене помаранчеве кільце, що представляє собою зворотну гістограму CAI (Codon Adaptation Index) – показника, який використовується для оцінки варіацій у частоті використання синонімічних кодонів у кодуючих ділянках ДНК [19].

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

3.2.1 Використання природного та штучного добору

Природний добір є малоефективним для отримання високопродуктивних промислових штамів *E. coli*, оскільки через низьку частоту спонтанних мутацій процес відбору займає надто багато часу. Наприклад, щоб знайти колонії мутантів (Lac-), які втратили здатність зброджувати лактозу, серед колоній дикого типу (Lac+), необхідно перевірити приблизно 100 000 колоній. Натомість застосування методів штучного відбору значно прискорює цей процес, оскільки дозволяє вибірково культивувати бактерії у специфічних умовах, у яких вихідний штам не здатний рости. Якщо популяція початково є генетично різноманітною, селекцію можна проводити без застосування мутагенних агентів, тоді як у випадку генетично однорідної культури використовують мутагени для стимулювання змін у ДНК. Завдяки

такому підходу можна цілеспрямовано отримувати мутантні штами E. coli, що здатні засвоювати нові джерела поживних речовин, а також мають підвищену стійкість до бактеріофагів, антибіотиків, фізичних впливів та інших чинників, що гальмують метаболічну активність [23].

3.2.2 Використання індукованого мутагенезу

Escherichia coli є одним із найпопулярніших мікроорганізмів, які використовуються для створення високопродуктивних промислових штамів шляхом індукованого мутагенезу. Це обумовлено низкою переваг, зокрема простотою культивування, невибагливими умовами для зростання, добре вивченою фізіологією та біохімічними процесами, а також детально дослідженим генетичним апаратом. Під впливом різноманітних мутагенних агентів, таких як хімічні сполуки, ультрафіолетове випромінювання або інші фізичні фактори, у геномі бактерії відбуваються зміни, що можуть сприяти посиленню синтезу певних метаболітів або біологічно активних речовин. У деяких випадках мутації спричиняють перебудову метаболічних шляхів, унаслідок чого клітина набуває здатності синтезувати сполуки, які за нормальних умов вона не виробляє. Це дає змогу цілеспрямовано отримувати штами *E. coli*, що продукують високі концентрації корисних речовин для біотехнологічної, фармацевтичної та харчової промисловості [22].

Отримання мутантних штамів *Escherichia coli* можливе шляхом впливу мутагенних агентів, оскільки ця бактерія не формує спор і, відповідно, є чутливою до змін у навколишньому середовищі. Вибір конкретного мутагену залежить від типу бажаної мутації: фізичні (наприклад, ультрафіолетове або рентгенівське випромінювання), хімічні (алкілюючі агенти, нітрозогуанідин) або біологічні (транспозони, вірусні вектори) чинники можуть спричиняти делеції, точкові заміни чи зсув рамки зчитування. Крім того, рівень застосованої дози визначається на основі рівня виживаності клітин, щоб забезпечити утворення мутацій без надмірного зниження життєздатності бактерій [24].

Мутагенний вплив може призводити до значних змін клітинного метаболізму *E. coli*, що сприяє як посиленню синтезу власних (ендогенних) речовин, так і появі нових метаболітів, які в природних умовах кишкова паличка не продукує. Такі ефекти досягаються за рахунок збільшення швидкості поглинання та ефективнішої утилізації субстратів, запобігання небажаним побічним реакціям синтезу, зменшення внутрішньоклітинної трансформації продуктів, а також порушення механізмів негативної регуляції біосинтезу, що веде до підвищеної експресії генів, відповідальних за синтез ферментів та інших корисних речовин. Додатково відбувається посилення механізмів позитивного контролю синтезу та ефективна екскреція кінцевих продуктів метаболізму.

Після впливу мутагену оброблені клітини висівають на тверді поживні середовища, де формуються окремі колонії, кожна з яких тестується на рівень продуктивності. Якщо серед них виявляють штами з покращеними характеристиками, процес мутагенезу та селекції повторюють, щоб отримати ще ефективніші мутанти. Однак, незважаючи на високу ефективність методу, прогресивна селекція має певні недоліки, серед яких значна трудомісткість процесу та поступове накопичення шкідливих мутацій, що можуть негативно впливати на життєздатність бактерій або стабільність отриманих штамів [25].

3.2.3 Використання гібридизації

Для створення промислових штамів, що поєднують у собі різні корисні властивості або мають гібридні характеристики з підвищеним рівнем корисних якостей, застосовуються методи гібридизації. У прокаріотичних організмів, зокрема в бактерій виду *Escherichia coli*, існує кілька механізмів рекомбінації генетичного матеріалу, які дозволяють обмінюватися фрагментами ДНК між різними клітинами. До таких механізмів належать:

- Кон'югація – процес, за якого між двома бактеріальними клітинами встановлюється тимчасовий контакт через спеціальні структури, наприклад, пілі, що дозволяє передавати генетичний матеріал у вигляді плазмід або окремих фрагментів ДНК.

- Трансформація – механізм, при якому бактерії здатні поглинати вільні молекули ДНК із навколишнього середовища та вбудовувати їх у власний геном, що сприяє появі нових ознак.
- Трансдукція – процес перенесення генетичного матеріалу від однієї бактеріальної клітини до іншої за допомогою бактеріофагів – вірусів, які заражають бактерії й можуть інтегрувати частини ДНК попереднього хазяїна у геном нового.
- Злиття протопластів – метод, що включає руйнування клітинної стінки бактерій із подальшим злиттям їхніх клітинних мембран, що забезпечує об'єднання генетичного матеріалу двох різних клітин.

Завдяки цим природним та індукованим методам рекомбінації вчені можуть створювати промислово значущі бактеріальні штами з новими або покращеними властивостями [26].

3.2.4 Використання методів генної інженерії

Генетична інженерія *Escherichia coli* є ключовою складовою біотехнології та синтетичної біології, що дозволяє створювати модифіковані бактеріальні штами з покращеними або новими функціональними властивостями. *E. coli* широко використовується як модельний організм завдяки добре вивченій генетиці, швидкому росту та простоті маніпуляцій.

Основними методами генної інженерії *E. coli* є трансформація плазмідами, редагування геному за допомогою CRISPR-Cas, гомологічна рекомбінація, трансдукція за участю бактеріофагів та кон’югація. Трансформація дозволяє вводити в клітину плазміди з бажаними генами, CRISPR-Cas забезпечує точкові зміни в геномі, а гомологічна рекомбінація застосовується для заміни або видалення генетичних фрагментів. Трансдукція використовує бактеріофаги для перенесення генетичного матеріалу, тоді як кон’югація забезпечує горизонтальну передачу генів між бактеріями.

Генетично модифіковані штами *E. coli* знаходять застосування у виробництві біофармацевтичних препаратів (інсулін, гормон росту людини), промислових ферментів для харчової та хімічної галузей, а також у

синтетичній біології для створення біосенсорів, що виявляють токсини та забруднювачі. Метаболічна інженерія дозволяє модифікованим *E. coli* синтезувати біопаливо, біопластики та інші цінні речовини. Крім того, такі штами використовуються в дослідженнях антибіотиків та розробці вакцин.

Завдяки простоті генної модифікації та наявності потужних молекулярних інструментів *E. coli* залишається однією з найважливіших моделей у біотехнології, сприяючи розробці інноваційних рішень для медицини, промисловості та екології. Під впливом сучасних досягнень у галузі біоінформатики та штучного інтелекту вчені можуть моделювати складні генетичні модифікації, що ще більше розширює можливості використання *E. coli* у науці та промисловості [27].

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

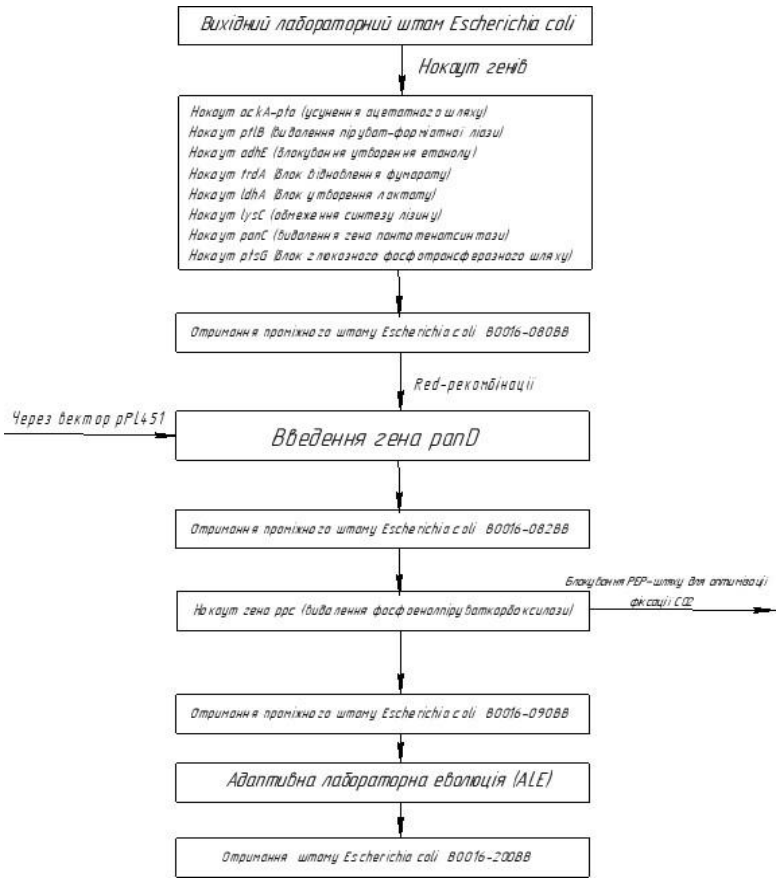


Рисунок 3.2 – Блок-схема отримання промислового продуцента *E. coli B0016-200BB*

На початку роботи ми отримали штам B0016-080BB, який містить ген panD із Corynebacterium glutamicum (CgpanD).

Штам B0016-080BB, що містить ген panD із C. glutamicum і касету km-cits857-pR-pL, яка дозволяє ефективно індукувати штам зміною температури, також був створений у цьому дослідженні.

Метод рекомбінації, опосередкованої системою Red, використовувався для маніпуляцій із хромосомою.

Для створення штаму B0016-082BB касета km-CgpanD, що містить ген стійкості до канаміцину та ген CgpanD, була клонована для заміни ендогенного гена panD у штамі B0016-080BB.

Фрагмент kan було ампліфіковано з плазміди pKD13 за допомогою праймерів EcoRI-pkd13F і EcoRI-pkd13R, що дало фрагмент розміром 1721 пар основ (п.о.); цей фрагмент був клонований у плазміду pPL451-panD, утворюючи нову плазміду pPL451-panD-kan, яка містила касету km-CgpanD.

Касета km-CgpanD була потім ампліфікована з pPL451-panD-kan за допомогою праймерів panD-pkd13F і panD-pkd13R і електротрансформована в штам B0016-080BB, що містив плазміду pKD46 з Red-рекомбіназою.

Наявність мутації panD::kan-CgpanD була підтверджена за допомогою колоніальної ПЛР із використанням праймерів YpanDF і YpanDR, що дозволило ампліфікувати фрагмент розміром 561 п.о. для дикого типу panD і 1901 п.о. для panD::kan-CgpanD.

Потім у мутацію panD::kan-CgpanD була електротрансформована плазміда pCP20, після чого штам культивували при 42°C, щоб видалити плазміду pKD46 і усунути фрагмент kan, що привело до отримання штаму B0016-082BB (panD::CgpanD) [21].

Потім провели видалення ppc (гена фосфоенолпіруваткарбоксилази). З метою блокування PEP-шляху для оптимізації фіксації CO_2. І на останньому етапі використавши адаптивну лабораторну еволюцію (ALE) отримали наш штам B0016-200BB який має 6,65 г/л виходу аланіну, в порівнянні якщо б залишили штам B0016-080BB вихід становив би 5,80 г/л.

Адаптивна лабораторна еволюція (ALE) є ефективним методом як для покращення характеристик мікроорганізмів, так і для вивчення біологічних механізмів. Цей метод дозволяє відібрати мутанти з покращеними характеристиками виживання в певному середовищі. На відміну від раціонального метаболічного інжинірингу, який вимагає великих знань про метаболічні шляхи, ALE дозволяє виявити корисні мутації без повного розуміння всіх біохімічних процесів. Для покращення утворення OAA у нежиттєздатному PPC-дефіцитному штамі B0016-090BB ми застосували ALE, щоб отримати мутанти з покращеною здатністю до росту, які компенсують нестачу OAA через фермент PCK [20].

Штами *E. coli* культивували на агаризованих пластинках із середовищем Лурія-Бертані (LB) (2 % агар) або в рідкому середовищі LB для активного росту, маніпуляцій із генами та створення плазмід.

Передпосівне культивування проводили у колбах при 37°C на шейкері з частотою 200 об/хв протягом ночі.

Осад після центрифугування при 12 000 об/хв при 4°C протягом 2 хв ресуспендували в середовищі M9.

Культури *E. coli* інкубували в середовищі M9 при 37 °C і 200 об/хв, поки *OD600>2*. Клітини висівали на агар M9, виділяли мутантів із найшвидшим ростом, заморожували (-80°C) і використовували для роботи.

Середовище M9 містило (на 1 л): 6 г Na_2HPO_4; 3 г KH_2PO_4; 1 г NH_4Cl; 0,5 г NaCl; 13,21 г $(NH_4)_2SO_4$; 5 г гліцерину та 5 мл розчину мікроелементів.

Щоб упевнитися, що в культуральному середовищі рекомбінантний штам дійсно накопичує β-аланін, проводили аналіз методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням о-фталевальдегідної (OPA) дериватизації. Зразки центрифугували, фільтрували через мембранний фільтр з порами 0,22 мкм, дериватизували OPA та аналізували за допомогою пре-колоночної дериватизації на системі Agilent HPLC (Agilent 1200, США) з детекторами типу DAD і хроматографічною колонкою XBridge C18 (50 мм, Waters) [21].

РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевий продукт виробництва — це таблетки бета-аланіну, що є результатом біотехнологічного процесу, включаючи культивування мікроорганізмів, ферментацію, очищення, концентрацію та стабілізацію активної речовини, а також формування таблеток і їх пакування. Бета-аланін, основна активна речовина препарату, є амінокислотою, що широко використовується в спортивному харчуванні для покращення фізичної витривалості та зниження втоми під час інтенсивних фізичних навантажень.
Таблетки мають певну кількість бета-аланіну, що забезпечує його ефективність. Зазвичай, одна таблетка містить від 500 мг до 1 г активної речовини, що відповідає стандартним дозуванням для терапевтичних і спортивних цілей. Формула таблеток також включає допоміжні компоненти, які додаються для покращення їх фізичних властивостей, таких як стабільність і зручність у прийомі. До таких компонентів відносяться наповнювачі (наприклад, целюлоза, лактоза, магнезії карбонат) та стабілізатори.

Таблетки мають однорідну структуру, без тріщин чи дефектів. Вони є стабільними за фізико-хімічними властивостями, зокрема мають високу розчинність у воді, що сприяє швидкому всмоктуванню в організмі. Водночас, продукт повинен бути стійким до негативних впливів таких факторів, як вологість, світло і температура, що забезпечується правильними умовами зберігання та пакування.

Мікробіологічна чистота є важливою характеристикою кінцевого продукту, що означає відсутність патогенних мікроорганізмів і токсичних домішок. Це гарантується за допомогою контролю на кожному етапі

виробництва та застосування стерильних умов. Також, таблетки мають гарантований термін придатності, зазвичай від 1 до 3 років, якщо їх зберігати в належних умовах.

Кінцевим продуктом виробництва є бета-аланін, який представляє собою амінокислоту, що активно використовується в біотехнологічних і фармацевтичних процесах, а також у спортивному харчуванні [7].

Продукція відповідає вимогам діючих нормативно-технічних документів (НТД), зокрема стандартам для харчових добавок та біологічно активних добавок (БАД). Реєстраційний номер і конкретний НТД залежать від призначення кінцевого продукту, у разі використання його в фармацевтиці або харчовій промисловості. Наявність реєстраційного номера регулюється органами охорони здоров'я та харчової промисловості. Вказаний номер повинен підтверджувати відповідність стандартам та нормам безпеки для кінцевого споживача.

Бета-аланін відноситься до біологічно активних добавок (БАД), що використовуються в спортивному харчуванні, а також у фармацевтичній промисловості для виготовлення лікарських препаратів (якщо його застосовують для корекції метаболічних порушень).

Фармакологічні властивості (для лікарських форм, якщо застосовується у фармацевтичній практиці): Бета-аланін є амінокислотою, яка бере участь у синтезі карнозину — дипептиду, що знижує кислотність в м'язах під час фізичних навантажень. Це має позитивний ефект на покращення витривалості, зменшення м'язової втоми та підтримання фізичної працездатності. Для спортсменів та осіб, що займаються фізичними навантаженнями, бета-аланін є важливим компонентом для підвищення результативності тренувань.

Бета-аланін в чистому вигляді є білим кристалічним порошком. Він добре розчиняється у воді, не має запаху.

Фізико-хімічні властивості:

Молекулярна формула: $C_3H_7NO_2$

Молекулярна маса: 89,09 г/моль

Розчинність: Розчиняється у воді та етанолі.

Точка плавлення: 195–197 °C (з декомпозицією).

Молекула бета-аланіну має одну аміногрупу ($-NH_2$) та одну карбоксильну групу (-COOH), що характерно для амінокислот.

Бета-аланін упаковується в пластикові або скляні контейнери, що забезпечують герметичність та захист від вологи та світла. У випадку таблетованої форми, упаковка має бути зручна для використання та забезпечувати збереження препарату. Усі упаковки мають бути марковані відповідно до вимог діючих стандартів для БАД.

Маркування продукту повинно містити [28]:

– Назву продукту (бета-аланін);

– Масу або об'єм;

– Термін придатності;

– Умови зберігання (у прохолодному, сухому місці, захищеному від прямих сонячних променів);

– Інформацію про виробника.

Продукція транспортується в упаковках, що захищають від пошкоджень та впливу несприятливих умов навколишнього середовища. Транспортування повинно здійснюватися в сухих, чистих і закритих транспортних засобах.

Бета-аланін слід зберігати при температурі не вище 25 °C, в сухому, темному місці, захищеному від вологості.

Термін придатності бета-аланіну залежить від його фізико-хімічних властивостей, але зазвичай він складає 2–3 роки за умови правильного зберігання.

В Україні є кілька виробників, які спеціалізуються на виготовленні біологічно активних добавок та спортивного харчування, серед яких можна виділити компанії, що випускають бета-аланін у вигляді порошку або таблеток. Комерційні назви можуть варіюватися в залежності від бренду.

В Європі бета-аланін виробляється компаніями, що спеціалізуються на спортивному харчуванні, такими як "MyProtein", "Bulk Powders" та іншими.

Препарати часто постачаються у вигляді порошку або капсул, що містять бета-аланін як активну речовину. Продукти мають хорошу репутацію серед спортсменів завдяки їхній ефективності у покращенні витривалості.

Серед світових лідерів можна виділити компанії, такі як "NOW Foods", "Kre-alkalyn", які виробляють бета-аланін у вигляді порошку чи капсул. Продукція цих брендів активно використовується в спортивному харчуванні, зокрема серед бодібілдерів та інших спортсменів.

Комерційні назви препаратів, що містять бета-аланін:

1. "CarnoSyn" — висококонцентрований бета-аланін, що виробляється в США і використовується для підвищення витривалості та зниження м'язової втоми.

2. "Beta Alanine by MyProtein" — популярний продукт на основі бета-аланіну для покращення спортивних результатів [6].

Кожен із цих препаратів має власну анотацію, яка містить рекомендації щодо дозування та способу використання, що допомагає користувачам ефективно застосовувати продукт для досягнення бажаних результатів.

Бета-аланін в таблетках є безпечним для вживання, за умови дотримання рекомендованих доз. Він не викликає побічних ефектів, коли його застосовують за призначенням, що підтверджується відповідними дослідженнями та сертифікатами якості. Загалом, кінцевий продукт є ефективним, безпечним і зручним у використанні для людей, які прагнуть покращити свої спортивні результати або підтримати фізичну витривалість.

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.1 відображає перелік основних компонентів і матеріалів, які використовуються на різних етапах виробництва. Для кожної категорії вказані нормативні документи (НТД), за якими перевіряються їх якісні показники, а також конкретні параметри, які обов’язково перевіряються в процесі виробництва.

Таблиця 4.1 - Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1 Глюкоза	ДСТУ 4464:2005	Органолептичні показники. Масова частка вологи. Мікробіологічні показники. Вміст домішок	Компонент поживного середовища
1.2 Триптон	ДСТУ 8381:2015	Органолептичні показники. Масова частка вологи. Мікробіологічні показники. Вміст домішок	Компонент поживного середовища
1.3 Дріжджовий Екстракт	ТУ 9385-007-39484474-2003.	Органолептичні показники. Масова частка вологи, масова частка золи, кислотність. Мікробіологічні показники. Вміст домішок	Компонент поживного середовища
1.4 Na_2HPO_4	ДСТУ 8145:2015	Усі показники відповідно до ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.5 KH_2PO_4	ДСТУ 8145:2015	Усі показники відповідно до ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.6 Вода питна	ДСТУ 7525:2014	Усі показники відповідно до ДСТУ	Для миття обладнання, приміщень; для приготування поживних середовищ;

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
1.7 NH_4Cl	ДСТУ 4725:2007	Усі показники відповідно до ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.8 Гліцерин	ДСТУ ISO 1614:2003	Усі показники відповідно до ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.9 $(NH_4)_2SO_4$	ДСТУ ISO 8968-2:2005	Усі показники відповідно до ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.10 $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$	ГОСТ 4172-76	Усі показники відповідно до ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.11 Дигідрофосфат калію	ДСТУ 7949:2015	Усі показники відповідно до ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.12 Хлорид натрію	ДСТУ ISO 2479-2001	Усі показники відповідно до ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.13 Хлорид кальцію	ГОСТ 450-77	Усі показники відповідно до ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.14 Амоній ацетат	ДСТУ 7274:2012	Усі показники згідно ДСТУ	Компонент поживного середовища
2. Допоміжна сировина			
2.1 Лактоза	ДСТУ 8059:2015	Усі показники згідно ДСТУ	Для грануляту «Луділрес»
2.2 Колідон 30 і Колідон CL	СТ-Н МОЗУ 42-3.6:2023	Усі показники згідно стандартизація міністерства охорони здоров'я України	Наповнювач, зв'язуючий, ковзний і розпушуючий засіб для грануляту «Луділрес»
2.3 Засіб миючий та дезінфікуючий	ДСТУ 2972:201	Усі показники відповідно до ДСТУ	Дезінфекція підлоги приміщень, зовнішніх поверхонь робочого обладнання та трубопроводів

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
2.4 Магній стеарат	ТУ 6-09-16-1533-90	Усі показники відповідно до ТУ	Для грануляту «Луділрес»
2.5 Стабілізатори (крохмаль, желатин)	ДСТУ 2211-93 ГОСТ 11293-89	Усі показники відповідно до ГОСТ та ДСТУ	Покращують стабільність і якість кінцевого продукту
2.6 Сухий азот	ДСТУ ГОСТ 9293:2009	Усі показники відповідно до ГОСТ та ДСТУ	Для барабанної сушарки
2.7 Розчин аміаку	ГОСТ 9-92	Масова частка аміаку	Для елюювання з катіоніту
2.8 Амоній сульфат	ДСТУ ISO 3332:2008	Усі показники відповідно до ДСТУ	Для процесу кристалізації
3. Матеріали			
3.1. Скловолокно	ГОСТ 19170-2001	Діаметр (10 мкм) Усі показники відповідно до ГОСТ	Для головного фільтру Для фільтру попередньої очистки
3.2. Базальтове супертонке волокно	ТУУВ. 2.7-26.8-32673353-001:2007	Діаметр (0,01 - 1 мкм)	Для індивідуального фільтру
3.3 Бутлі пластикові	ГОСТ 32686-2014	Усі показники відповідно до ГОСТ	Для зберігання води очищеної
3.4 Пробірки та колби	ДСТУ ISO 1042:2005	Усі показники відповідно до ДСТУ	Для вирощування посівного матеріалу
3.5 Халат медичний жіночий	ГОСТ 24760-81	Усі показники відповідно до ГОСТ	Захисний одяг для персоналу
3.6 Халат медичний чоловічий	ГОСТ 25194-62	Усі показники відповідно до ГОСТ	Захисний одяг для персоналу
3.7 Блістери	ДСТУ ISO 15378:2019	Усі показники відповідно до ДСТУ	Для фасування таблеток
4. Напівпродукти			
4.1. Музейна культура	Відповідно до технологічних регламентів	Усі показники відповідно до регламенту	Для отримання посівного інокуляту

4.3 Опис технологічного процесу

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу

Співробітники проходять медичний огляд та проходять курс, що стосується санітарно-гігієнічних вимог та особистої гігієни. Також дуже ретельно обробляється одяг, який призначений для захисту продукту від небажаних частинок на виробництві.

ДР 1.2 Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів

Процес створення розчинів із водою для ефективного очищення та знезараження поверхонь. Процес забезпечує чистоту і знезараження, важливі в санітарних умовах

Дезінфікуючі розчини, що використовуються на підприємствах хіміко-фармацевтичної промисловості, повинні мати дозвіл на застосування та бути затвердженими Міністерством охорони здоров'я України. Їх приготування здійснюється відповідно до «Методичних рекомендацій щодо приготування та застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків», затверджених Наказом МОЗ України № 502 від 14 грудня 2001 року.

ДР 1.2.1. Приготування синтетичного миючого засобу

Для приготування мийного розчину, що використовується для очищення, 50 грамів синтетичного мийного засобу розчиняють в 10 літрах води. Температура води повинна знаходитися в діапазоні від 40 до 50 градусів Цельсія. Готовий розчин зберігається протягом 14 діб у герметично закритій тарі.

ДР 1.2.2 Приготування розчину дезинфікуючого засобу Дезактину

Для приготування робочого розчину дезактиваційного засобу "Дезактин" у вигляді рідини, 10 грамів сухого порошку цього засобу ретельно розчиняють у 9990 мілілітрах води, що відповідає приблизно 10 літрам. Процес розчинення здійснюється в спеціально промаркованій тарі, щоб

уникнути помилок у концентрації. Для забезпечення повного розчинення порошку необхідно інтенсивно перемішувати суміш протягом 1-2 хвилин.

З метою прискорення процесу розчинення допускається використання теплої води, температура якої становить 60 ± 5 градусів Цельсія. Важливо дотримуватися цього температурного діапазону, щоб не знизити ефективність засобу. Готовий розчин зберігається протягом 14 діб у герметично закритій тарі [29].

ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень

На підприємстві, щоб підтримувати належний рівень чистоти, щодня проводиться поточне прибирання всіх приміщень, а також щомісяця організовується генеральне прибирання.

Процес прибирання виробничих зон здійснюється спеціально навченою групою працівників, які пройшли відповідне інструктування з техніки безпеки та правил прибирання. Цим працівникам видається спеціальний одяг, взуття, захисні рукавиці та необхідний інвентар для прибирання.

Для дезінфекції підлог виробничих приміщень, зовнішніх поверхонь обладнання та трубопроводів використовуються спеціально підготовлені розчини мийних засобів. Після використання ці розчини збираються та відправляються на знешкодження.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1 Мийка обладнання та комунікацій

Обладнання омивають водою протягом 2-5-ох хвилин та подальше миття здійснюють приготованим дезінфікуючим засобом упродовж 40 хв. Відпрацьований розчин відправляється до ділянки знешкодження відходів.

ДР 1.4.2 Ополіскування обладнання

Процес ополіскування здійснюється з використанням очищеної води. Відпрацьована вода відводиться на ділянку, де відбувається знешкодження відходів.

ДР 1.4.3 Перевірка обладнання на герметичність

Перевірка здійснюється шляхом подачі насиченої водяної пари всередину обладнання під тиском, який коливається в межах від 0,05 до 0,06 мегапаскалів (МПа).

Для визначення герметичності обладнання, тиск пари всередині нього вимірюється протягом 30 хвилин. Якщо протягом цього часу тиск не знижується більш ніж на 0,005 МПа, це свідчить про те, що обладнання є герметичним і готове до використання.

Фланцеві з'єднання, які є критичними точками з точки зору герметичності, перевіряються за допомогою нанесення мильної води. При тиску пари, що також становить від 0,05 до 0,06 МПа, мильна вода дозволяє виявити будь-які витоки, які проявляються у вигляді бульбашок.

ДР 1.4.4 Стерилізація обладнання

Стерилізацію проводять подачею гострої пари безпосередньо в апарат через барботер. Попередньо спускають відпрацьоване повітря. При досягненні в апараті температури стерилізації (130 °С) закривають усю запірну арматуру та витримують 30-40 хв.

ДР 2. Підготовка повітря

ДР 2.1 Підготовка вентиляційного повітря

ДР 2.1.1 Забір повітря

Атмосферне повітря відбирається у зоні з мінімальним рівнем забруднення та найнижчою концентрацією газових домішок за допомогою повітрозабірного пристрою, розташованого на висоті від 10 до 15 метрів.

ДР 2.1.2. Механічна (попередня) очистка повітря

Повітря проходить через фільтр грубої очистки з розміром пор 5-8 мкм. Це дозволяє осідати механічним домішкам та пилу, після чого очищене повітря подається до компресора.

ДР 2.1.3. Нагнітання повітря

Процес подачі повітря під тиском здійснюється за допомогою компресора, який стискає його до рівня 0,3 МПа. Унаслідок цього стиснення температура повітря підвищується до діапазону 120–140 °С. Для створення

оптимальних умов, необхідних для вирощування мікроорганізмів, таке нагріте повітря потребує подальшої стабілізації.

ДР 2.1.4 Стабілізація термодинамічних показників повітря

Повітря надходить у теплообмінник, в якому здійснюється його охолодження до температури 25-30 ºС. Наступним кроком є подача охолодженого повітря у ресивер, що відповідає за стабілізацію та усереднення термодинамічних показників (тиск 0,4 МПа, вологість 40-60%).

ДР 2.2 Підготовка технологічного аераційного повітря

ДР 2.2.1 Забір повітря з атмосфери

Атмосферне повітря надходить через спеціально обладнані шахти висотою 20–25 метрів, які встановлюються в найменш забруднених зонах території підприємства. Під час забору повітря рівень його вологості знаходиться в межах 60–90%.

ДР 2.2.2 Попереднє очищення повітря

На касетних фільтрах, заповнених скловолокнистим матеріалом, здійснюється затримання механічних і біологічних частинок розміром понад 10 мкм. Ефективність очищення варіюється в межах 60–90%. Перепад тиску не перевищує 150 Па. Рекомендується проводити заміну фільтрів після 200–250 годин експлуатації або в разі різкого збільшення перепаду тиску.

ДР 2.2.3 Стиснення повітря

Стиснення повітря відбувається в компресорі або турбоповітродувках, у процесі чого температура повітря підвищується до 120-200°С.

ДР 2.2.4 Охолодження повітря та конденсація вологи

Охолодження стисненого повітря здійснюється шляхом зниження його температури до "точки роси" (25-30°С), що призводить до конденсації вологи. Цей процес відбувається у кожухотрубчастих теплообмінниках, де повітря, проходячи через міжтрубний простір, охолоджується до 25°С і зневоднюється до рівня вологості 60%. У труби подається питна вода з температурою 20°С. Конденсат, що утворюється в міжтрубному просторі, разом із використаною водою направляється до збірника для подальшої нейтралізації.

ДР 2.2.5 Стабілізація тиску в системі

Процес здійснюється в ресиверах, де тиск повітря знижується до 0,4 МПа. Одночасно відбувається видалення вологи до рівня 40%. Утворений конденсат спрямовується до збірника для нейтралізації.

ДР 2.2.6 Нагрівання повітря

Повітря нагрівають до температури 49-50 °С у відповідному теплообміннику для стабілізації показників тиску та температури. Вологість повітря має становити 50%.

ДР 2.2.7 Стерилізація повітря на головному фільтрі

Охолоджене повітря спрямовується на очищення в головний фільтр, де в якості фільтрувального матеріалу використовується шар базальтового волокна. Цей матеріал ефективно затримує біологічні та механічні частинки розміром понад 2 мкм. Допустиме значення перепаду тиску у фільтрах знаходиться в межах 220–380 Па, а ефективність очищення досягає 95%.

ДР 2.2.8 Стерилізація повітря на індивідуальному фільтрі

Завершальним етапом підготовки повітря є його подача на фільтр тонкого очищення. Структура фільтрувального матеріалу має пори діаметром 0,25 мкм, що забезпечує найвищий рівень очищення, досягаючи ефективності 99,9999%.

ДР 2.3 Підготовка повітря для барабанної сушарки

ДР 2.3.1 Забір повітря

Відбір атмосферного повітря виконується у найбільш сприятливому з точки зору екологічної чистоти місці, тобто там, де рівень забруднення та загазованості є найнижчим. Для цього використовується спеціальний забірний пристрій, який установлюється у найвищій доступній точці споруди або конструкції, на висоті, що становить від 10 до 12 метрів над рівнем землі.

ДР 2.3.2 Механічна (попередня) очистка повітря

Повітря проходить через фільтр грубої очистки з розміром пор 5-8 мкм. Це дозволяє осідати механічним домішкам та пилу, після чого очищене повітря подається до компресора.

ДР 2.3.3 Нагнітання повітря

Процес подачі повітря під тиском здійснюється за допомогою компресора, який стискає його до рівня 0,3 МПа. Унаслідок цього стиснення температура повітря підвищується до діапазону 120–140 °С. Для створення оптимальних умов, необхідних для вирощування мікроорганізмів, таке нагріте повітря потребує подальшої стабілізації.

ДР 2.3.4 Стабілізація термодинамічних показників повітря

Повітря надходить у нагрівальну колону за допомогою вентилятора, який забезпечує необхідний тиск і напрямок потоку. У середині колони відбувається процес вирівнювання (усереднення) та стабілізації фізико-хімічних характеристик повітряного потоку. Зокрема, температура повітря знижується до оптимального значення у межах 20–22 °С. Одночасно з цим регулюється рівень відносної вологості, який досягає показників у межах 30–60 %, що сприяє забезпеченню стабільних умов для подальшої обробки. Заключний етап процесу відбувається у спеціалізованому повітряному фільтрі, що містить фільтруючий матеріал з порами діаметром 1,2 мікрометри. У цьому фільтрі здійснюється очищення повітря від твердих частинок (пилу) та мікроорганізмів, що забезпечує високий рівень його чистоти.

ДР 3. Підготовка води очищеної

ДР 3.1 Забір води

Здійснюють забір води з міського трубопроводу на висоті 25-30 м.

ДР 3.2 Відстоювання води

Вода відстоюється упродовж 6-10 годин. За цей час повинні осісти найбільші частки.

ДР 3.3 Фільтрування на фільтрах грубої очистки

Здійснюється на піщаних фільтрах. Спочатку вода проходить верхнє дно фільтру, а потім надходить до нижнього. Швидкість фільтрації становить – 0,15-0,25 см/год.

ДР 3.4 Фільтрування вугільним фільтром

Вугільні фільтри забезпечують видалення токсичних газів та неприємних запахів. Переміщення повітря здійснюється за допомогою багатофункціональних вентиляторів.

ДР 3.5 Одержання очищенної води на установці зворотного осмосу

Очищення води на установці зворотного осмосу ефективно видаляє розчинені солі завдяки використанню надлишкового тиску, який забезпечує примусове проходження води крізь мембрану для фільтрації. При цьому тиск повинен перевищувати осмотичний, щоб процес відбувався належним чином.

ДР 3.6 Зберігання води

Воду зберігають у спеціальних бутлях упродовж 2-3 діб.

ДР 4. Приготування грануляту "Лудіпрес" для таблетування

Гранулят «Лудіпрес» – суміш лактози моногідрату та двох полімерів: Колідону 30 і Колідону CL – використовується як наповнювач, зв'язуючий, ковзний і розпушуючий засіб [30].

ДР 4.1 Змішування сировинних компонентів

У змішувач вносять лактозу, яка виступає як наповнювач, та колідон 30 і Колідон CL. Суміш ретельно перемішують, щоб забезпечити однорідний розподіл інгредієнтів у складі. У цьому змішувачі встановлено ножі або роторно-статорні механізми, що забезпечують швидке й рівномірне змішування компонентів.

ДР 4.2 Зволоження суміші

У змішувач за допомогою дозатору рідин вносять стерильну воду . Це сприяє зв'язуванню частинок.

ДР 4.3 Грануляція

Суміш піддається формуванню гранул через агломерацію. Процес відбувається у грануляторі протягом 40 хв. Внаслідок чого отримаємо гранули які є однорідними за розміром і формою.

ДР 4.4 Сушіння гранул

Процес відбувається у барабанній сушарці протягом 1 години при температурі 65°C, обертання барабану 3–10 об/хв. Процес проводять для видалення вологи з гранул. Вологість у результаті становить 1-3%.

ДР 4.5 Змішування з додатковими компонентами

У змішувач додають кростаргель який сприяє швидкому розпаду таблеток і змащувальний агент (магній стеарат) для полегшення пресування. Відбувається плавний перемішуючий рух для запобігання пошкоджень гранул. Змішування відбувається протягом 30 хв.

ДР 5 Приготування піногасника

Як піногасник використовують олеїнову кислоту, яку додають до реактора зі змішувачем і розбавляють водою, що надходить з трубопроводу. Отриману суміш піддають стерилізації при температурі 90–100 °C упродовж 30 хвилин до однієї години.

ДР 6. Підготовка поживного середовища

ДР 6.1 Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу

ДР 6.1.1 Змішування компонентів

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор вносять: $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$; KH_2PO_4; NaCl та стерильної води. Через 20 хвилин додають $CaCl_2$ щоб уникнути осадження та після цього ще через 20 хв натрій фумарат і амоній ацетат. Використання оцтової кислоти замість глюкози як джерела вуглецю дозволяє вирішити дві важливі проблеми: підвищити аспартазну активність клітин та забезпечити досягнення максимального рівня активності на стаціонарній фазі, коли клітинний урожай досягає максимальних значень. Кукурудзяний екстракт додається останнім через його природну в'язкість. Змішування відбувається протягом 2 годин, pH становить 7,0. Середовище перемішують турбінною мішалкою частотою обертів – 300 об/хв [8]. Також вносимо антибіотик канаміцин та ампіцилін, щоб перевіряти присутність плазміди.

ДР 6.1.2 Фільтрація

Фільтрацію проводимо на мембранному фільтрі . Температурний оптимум 20– 25°С , час проведення процесу 2-3 години.

ДР 6.1.3 Стерилізація

Процес проводиться у апараті Р28 протягом 120 хвилин при температурі 130°С. Для підтримання необхідних умов у сорочку апарата подається насичена водяна пара. Простерилізоване поживне середовище подається у ферментер Р44.

ДР 6.2 Приготування поживного середовища для висіву культури

ДР 6.2.1 Змішування компонентів

Використовуємо середовище Бульйон Лурія (Міллера LB).

Бульйон LB — це поживне середовище, багате на поживні речовини, розроблене Ленноксом для вирощування та підтримки рекомбінантних штамів *E. coli*, яке використовується в молекулярній біології та мікробіологічних процедурах.

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор вносять: триптон - постачає азот, вітаміни, мінерали та амінокислоти, необхідні для росту; дріжджовий екстракт - є джерелом вітамінів, особливо групи В; хлорид натрію - забезпечує необхідні електроліти для транспорту та осмотичного балансу та заливають водою. Середовище перемішують турбінною мішалкою частотою обертів – 300 об/хв [31]. Змішування відбувається протягом 2 годин.

Крім того, асептично у невеликій кількості додаємо стерильний 20% розчин глюкози і ретельно перемішуємо для кращого росту.

Термолабільний компонент - глюкозу, стерилізують окремо від інших компонентів наступним чином: розігріту глюкозу з додаванням води, глухим паром нагрівають до 121°С і витримують 30 хв., після чого охолоджують до 25-30°С і вносять до інших вже простерилізованих змішаних компонентів.

ДР 6.2.2 Стерилізація поживного середовища

Процес здійснюється в апараті Р29 при температурі 121 °С протягом 15 хвилин

ДР 6.3 Приготування поживного середовища для посівного матеріалу

ДР 6.3.1 Змішування компонентів

Використовуємо середовище М9.

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор вносять: Na_2HPO_4, KH_2PO_4, NH_4Cl, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, гліцерин та розчин металів [21]. Також вносимо антибіотик канаміцин та ампіцилін, щоб перевіряти присутність плазміди.

Середовище перемішують турбінною мішалкою частотою обертів – 400 об/хв. Змішування відбувається протягом 2 годин.

ДР 6.3.2 Стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу

Процес здійснюється в апараті для вирощування посівного матеріалу (інокуляторі) протягом 120 хвилин при температурі 25-30°С. Для забезпечення потрібного режиму насичена водяна пара під тиском 0,2 МПа подається у сорочку апарата.

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу

ТП 7.1. Відновлення музейної культури *E. coli B0016-200BB*

Культуру висівають у стерильних умовах у пробірки і інкубують у термостаті при температурі 37°С протягом 24-48 год. Після інкубації виросліколонії ретельно перевіряють за морфологічними та культуральними властивостями, а також оцінюють їх мікробіологічну чистоту.

ТП 7.2 Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках

Культуру пересівають в асептичних умовах у 250 мл колби Ерленмейєра і інкубують при температурі 37 °С протягом 24 годин на шейкері, частотою обертання 200 об/хв.

ТП 7.3. Вирощування посівного матеріалу першої генерації в інокуляторі

Після завершення процесу в термостаті посівний матеріал з колб переноситься в інокулятор 0,1 $м^3$, який заздалегідь наповнений стерильним поживним середовищем М9. Культивування в інокуляторі проводиться при температурі 37°С і триває 24 години.

ТП 7.4. Вирощування посівного матеріалу другої генерації в інокуляторі

Після завершення процесу посівний матеріал переноситься в

інокулятор 1 $м^3$, який заздалегідь наповнений стерильним поживним середовищем М9. Культивування в інокуляторі проводиться при температурі 37°С і триває 42 години.

ТП 8. Виробниче культивування

До ферментера об'ємом 10 м³ подається стерильна суміш поживного середовища.

Через трубу в ферментер подається посівний матеріал з інокулятора. Також відбувається подача аераційного повітря. Виробничий біосинтез проходить при температурі 37 ºС протягом 42-52 годин. Також ферментер оснащений перемішуючим пристроєм (3000 об/хв). Також до середовища додають 0,1% стерильного синтетичного піногасника

Кожні 2–3 години відбирають пробу для мікробіологічного контролю, визначаючи концентрацію біомаси та аланіну.

ТП 9 Відділення біомаси

ТП 9.1. Центрифугування

Далі культуральна рідина яка містить аланін з ферментеру за допомогою насоса подається до центрифуги. Частота обертання – 20000 об/хв. Час процесу – 15-20 хв .

ТП 10 Очищення та концентрування аланіну

ТП 10.1 Ультрафільтрація

На першому етапі процесу супернатант за допомогою насоса подається на ультрафільтраційну установку з мембранами (пори 0,002 мкм). Тут з рідини видаляють небажані компоненти — механічні домішки, білки, солі та інші забруднення. У результаті утворюються два потоки: фільтрат, який надходить на стадію знешкодження, і концентрат з цільовим продуктом, що накопичується у збірнику для подальшого очищення. Процес відбувається при температурі 20–21 °С і надлишковому тиску 1,4 МПа, що забезпечує ефективне розділення.

ТП 10.2 Іонообмінна хроматографія

Супернатант надходить до іонообмінної колонки з аніонітом QAE-Sephadex A-50 для тонкого очищення. На цьому етапі іонообмінна

хроматографія дозволяє видалити залишкові солі, домішки й побічні продукти, покращуючи чистоту аланіну.

Після сорбції аланіну на тверду фазу його подальше вилучення (елуція) проводиться шляхом промивання водою кімнатної температури, що дозволяє делікатно зняти цільову речовину з носія.

Елюат за допомогою насоса надходить у колонку з сульфат-катіонітом, де аланін додатково очищують шляхом повторної елюції 3% водним розчином аміаку (NH_3) при температурі 45–50 ºС для ефективного вилучення цільової сполуки.

ТП 10.3 Кристалізація

У іонообмінну колону подається сульфат амонію. Температурний оптимум процесу становить - 2-5 ºС. Внаслідок чого утворюється кристалічна суспензія.

ТП 10.4 Ультрафільтрація кристалічної суспензії

Кристалічна суспензія, отримана на попередньому етапі технологічного процесу, направляється до ультрафільтраційної установки, яка оснащена мембранами з розміром пор 0,002 мкм. Основною метою цього етапу є ретельне очищення суспензії від залишкових сторонніх речовин і реагентів, що застосовувались у процесі елюції. Уся процедура виконується за умов постійної температури в межах 20–21 ºС та під дією надлишкового тиску 1,4 МПа

ТП 11 Сушіння

ТП 11.1 Сушіння в барабанній сушарці

Процес відбувається у барабанній сушарці. При проходженні процесу подається холодоагент сухий азот. Швидкість обертання барабану 4-12 об/хв. Час проходження 1-2 год.

ТП 12 Підготовка сировини для таблетування

ТП 12.1 Подрібнення

Кристали аланіну подрібнюються до дрібнодисперсного порошку, щоб забезпечити однорідність кінцевого продукту. Для подрібнення

використовуємо кульковий млин. Частота обертів зазвичай знаходиться в межах 60-100 об/хв. Час 30-60 хв.

ТП 12.2 Змішування з допоміжними речовинами

Змішування відбувається у спеціалізованому апараті типу «п'яна бочка», який характеризується нахиленим положенням обертового барабана. Під час кожного повного оберту барабана, завдяки особливостям його конструкції, вміст всередині апарата здійснює дворазове пересипання у вертикальній площині. При цьому частинки продукту поступово зміщуються вздовж осі обертання, що забезпечує одночасне вертикальне і осьове переміщення. Такий режим руху матеріалу сприяє рівномірному, делікатному і високоефективному перемішуванню компонентів без порушення їх фізичної структури, що особливо важливо для збереження властивостей чутливих речовин.

Як допоміжна речовина застосовують гранулят «Луділрес» – суміш лактози моногідрату та двох полімерів: Колідону 30 і Колідону CL – використовується як наповнювач, зв'язуючий, ковзний і розпушуючий засіб.

ТП 13 Таблетування

Таблетування проводять на таблетковому пресі марки «Manesty». На прес закріплюють етикетку із зазначенням назви препарату, номера операції, серії, дати та прізвища оператора.

ПМВ 14 Пакування та фасування

ПМВ 14.1 Фасування

Готові таблетки пакуються у блістери на які кріпиться маркування. Процес фасування зазвичай автоматизований.

ПМВ 14.2 Пакування

Готові блістери пакуються пачками , далі поміщаються у вторинну упаковку — картонні коробки з маркуванням, яке містить інформацію про препарат, серію, термін придатності, умови зберігання та інструкції для пацієнта.

ЗВ 15 Знешкодження відходів

Використані розчини мийних і мийно-дезінфікуючих засобів, а також воду та повітря для аерації піддають знезараженню.

ПВ 16. Переробка відходів

Фільтрувальні матеріали, а також органічні розчинники, які застосовуються у процесі, піддаються спеціальній процедурі очищення та регенерації після завершення технологічного циклу. Після відповідної обробки вони повертаються до повторного використання в наступних виробничих операціях, що дозволяє зменшити обсяг відходів, оптимізувати витрати сировини та підтримувати сталість технологічного процесу без втрати ефективності очищення.

4.4 Матеріальний баланс

Матеріальний баланс є важливою складовою частиною процесу виробництва, оскільки дозволяє здійснити облік усіх використовуваних сировинних ресурсів та отриманих продуктів. Правильний матеріальний баланс забезпечує ефективне використання ресурсів і дозволяє контролювати втрати на різних етапах виробництва. У процесі виробництва бета-аланіну важливо враховувати не лише основні компоненти, але й допоміжні матеріали, напівпродукти, а також відходи, що утворюються на кожному етапі.

Баланс складено для стадії, що проходить у інокуляторі об'ємом 1 м^3 (коеф. заповнення - 0,8).

$$V_{\text{середвища}} = 1 \cdot 0{,}8 = 800 \text{ м}^3 \text{ (800 л)}$$

Таблиця 4.2 – Матеріальний баланс виробництва

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість		
	кг	шт	л		кг	шт	л
ДР 5. Підготовка поживних середовищ ДР 5.1 Приготування та стерилізація ПС для виробничого біосинтезу							

Продовження таблиці 4.2

$NaHPO_4 \cdot 12H_2O$	97,96			Стерильне ПС			8000
Кукурудзяний екстракт	57,15						
KH_2PO_4	96,01						
NaCl	11,20						
$CaCl_2$	2,74						
Натрій фумарат	57,15						
Амоній ацетат	8,80						
Стерильна вода			7668				
Всього:	8000			Всього:	8000		
ДР 5.2 Приготування поживного середовища для висіву культури							
Триптон	13,3			Стерильне ПС			80
Дріжджовий екстракт	6,7			Бульйон Лурія (Міллера LB)			
Хлорид натрію	13,3						
Вода	33,3						
20% р-н глюкози			13,3				
Всього:	80				80		
ДР 5.3 Приготування та стерилізація ПС для посівного матеріалу							
Na2HPO4	154,32			Стерильне ПС М9			800
KH2PO4	82,16						
NH4Cl	31,72						
NaCl	14,86						
(NH4)2SO4	331,10						
Гліцерин	23,72						
Розчин металів			121,6				
Канаміцин	40						
Всього:	800			Всього:	800		
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу							
ТП 6.2 Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках							
Стерильне ПС			80	Готовий посівний матеріал у колбах			80,7
Посівний матеріал			0,7				
Всього:	80,7				80,7		
ТП 6.3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі							
Готовий посівний матеріал			80,7	Готовий посівний матеріал в інокуляторі			880,69
Стерильне ПС			800	Втрати			0,01
Всього:	880,7			Всього:	880,7		
ТП 7. Виробниче культивування							

Продовження таблиці 4.2

Стерильне ПС Інокулят Втрати (частка)			8000 880,7 0,1	Культуральна рідина Втрати (частка)			8841,24 39,56
Всього:	8880,8			Всього:	8880,8		
ТП 8 Відділення біомаси ТП 8.1. Центрифугування							
Культуральна рідина			8841,24	Супернатант Втрати при центрифугуванні (3%)			8576 265,28
Всього:	8841,24			Всього:	8841,24		
ТП 9 Очищення та концентрування аланіну ТП 9.1 Ультрафільтрація							
Супернатант			8576	Відфільтрований супернатант Втрати при ультрафільтрації (3%)			8318,7 257,28
Всього:	8576			Всього:	8576		
ТП 9.2 Іонообмінна хроматографія							
Відфільтрований супернатант Сорбент			8318,7 625	Елюат Втрати (3%)			8675,4 268,31
Всього:	8943,7			Всього:	8943,7		
ТП 9.3 Кристалізація							
Елюат Сульфат амонію	286		8675,4	Кристалічна суспензія Втрати (1%)			8871,8 89,6
Всього:	8961,4			Всього:	8961,4		
ТП 9.4 Ультрафільтрація кристалічної суспензії							
Кристалічна суспензія			8871,8	Фільтрат Втрати при ультрафільтрації (3%)			8605,6 266,2
Всього:	8871,8			Всього:	8871,8		
ТП 10 Сушіння ТП 10.1 Сушіння в барабанній сушарці							
Фільтрат Сухий азот	723		8605,6	Кристали Конденсат Втрати	8605,59		 723 0,01

Продовження таблиці 4.2

Всього:	9328,6			Всього:	9328,6		
ТП 11 Підготовка сировини для таблетування ТП 11.2 Змішування з допоміжними речовинами							
Кристали Гранулят «Луділпрес»			8605,59 2056	Готова сировина	10662		
Всього:	10661,59			Всього:	10662		
ТП 12 Таблетування							
Готова сировина	10662			Таблетки Втрати (2%)	10449 213		
Всього:	10662			Всього:	10662		

4.5 Контроль виробництва

У таблиці 4.3 подано перелік виробничих контрольних точок, які впроваджуються з метою постійного моніторингу та перевірки якості продукції на різних стадіях її виготовлення. Ці контрольні етапи гарантують, що кінцевий продукт відповідатиме всім встановленим нормам і вимогам нормативно-технічної документації, що регламентує його характеристики та параметри.

Таблиця 4.3 - Контроль виробництва

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1 Підготовка персоналу Км 1.1	Чистота робочого одягу та рук, стан здоров'я, мікробна контамінація	Мікробіологічний	Раз на місяць	Після обробки не повинні містити м-о. У процесі роботи – не більше 10 КУО у змивах з рук працівника

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 1.2.1. Приготування синтетичного миючого засобу Км, Кх 1.2.1	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	Не більше вказаної в регламенті концентрації
ДР 1.2.2 Приготування розчину дезинфікуючого засобу «Дезактину» Км, Кх 1.2.2	Концентрація дезінфікуючого засобу «Дезактину»	Хімічний метод	Після приготування розчину	Не більше вказаної в регламенті концентрації
ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень Кт 1.3	Підлога, стіни, вікна, двері, робочі поверхні, чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Відсутність бруду та пилу, КУО< 500/с $м^2$
ДР 1.4.1 Мийка обладнання та комунікацій Кт 1.4.1	Концентрація мийного р-ну, час миття, температура, чистота	Термометр, технічний годинник	Під час операції	Т= 35-40 ºС, t =40 год, чисте обладнання
ДР 1.4.3 Перевірка обладнання на герметичність Кт 1.4.3	Герметичність обладнання, час перевірки, тиск	Манометр, технічний годинник	Під час операції	Р=0,05-0,06 МПа, t =30 хв
ДР 1.4.4 Стерилізація обладнання Кт 1.4.4	Температура , тиск, тривалість	Технічний манометр, годинник, технічний термометр	Під час операції	Т=130 ºС, Р=0,6 МПа, t=30 хв
ДР 2.1.1 Забір повітря Кт 2.1.1	Висота забору повітря	Висота труби повітря	Протягом усього періоду	Н= 10-15 м

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 2.1.2. Механічна (попередня) очистка повітря Кт 2.1.2	Рівень ефективності очищення повітряного потоку після його проходження через фільтрувальний елемент, а також показник різниці тиску, який утворюється між вхідною та вихідною частинами фільтра під час його експлуатації	Проведення контролю ефективності очищення повітря фільтрувальним елементом відповідно до технічних характеристик та нормативів, зазначених у паспорті фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	-
ДР 2.1.3. Нагнітання повітря Кт 2.1.3	Температура, тиск	Технічний манометр, термометр технічний	Під час операції	Т=120-140 ºС Р=0,3 МПа
ДР 2.1.4 Стабілізація термодинамічних показників повітря Кт 2.1.4	Температура, вологість, тиск	Термометр технічний, манометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря та видалення вологи	Т=25-30 ºС, W= 40-60 %, Р=0,4 МПа
ДР 2.2.1 Забір повітря з атмосфери Кт 2.2.1	Висота забору повітря	Висота труби повітря	Протягом усього періоду	Н= 20-25 м

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 2.2.2 Попереднє очищення повітря Кт 2.2.2	Рівень ефективності очищення повітряного потоку після його проходження через фільтрувальний елемент, а також показник різниці тиску, який утворюється між вхідною та вихідною частинами фільтра під час його експлуатації.	Проведення контролю ефективності очищення повітря або іншого середовища фільтрувальним елементом відповідно до технічних характеристик та нормативів, зазначених у паспорті фільтра	Після очистки на касетних фільтрах	E= 60-90 %
ДР 2.2.4 Охолодження повітря та конденсація вологи Кт 2.2.4	Температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Під час операції	T=25-30 ºC W= 60 %
ДР 2.2.5 Стабілізація тиску в системі Кт 2.2.5	Вологість, тиск	Манометр технічний, психрометричний метод	Під час операції	W=40 %, P=0,4 МПа
ДР 2.2.6 Нагрівання повітря Кт 2.2.6	Температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Під час операції	T= 49-50 ºC W= 50%

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 2.2.7 Стерилізація повітря на головному фільтрі Кт 2.2.7	Рівень ефективності очищення повітряного потоку після його проходження через фільтрувальний елемент, а також показник різниці тиску, який утворюється між вхідною та вихідною частинами фільтра під час його експлуатації.	Проведення контролю ефективності очищення повітря або іншого середовища фільтрувальним елементом відповідно до технічних характеристик та нормативів, зазначених у паспорті фільтра	Після очистки на головному фільтрі	E= 95 %
ДР 2.2.8 Стерилізація повітря на індивідуальному фільтрі Кт 2.2.8	Рівень ефективності очищення повітряного потоку після його проходження через фільтрувальний елемент, а також показник різниці тиску, який утворюється між вхідною та вихідною частинами фільтра	Проведення контролю ефективності очищення повітря або іншого середовища фільтрувальним елементом відповідно до технічних характеристик та нормативів, зазначених у паспорті фільтра	Після очистки на індивідуальному фільтрі	E= 99,9999 %

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 2.3.1 Забір повітря Кт 2.3.1	Висота забору повітря	Висота труби повітря	Протягом усього періоду	Н= 10-15 м
ДР 2.3.2 Механічна (попередня) очистка повітря Кт 2.3.2	Рівень ефективності очищення повітряного потоку після його проходження через фільтрувальний елемент, а також показник різниці тиску, який утворюється між вхідною та вихідною частинами фільтра під час його експлуатації	Проведення контролю ефективності очищення повітря або іншого середовища фільтрувальним елементом відповідно до технічних характеристик та нормативів, зазначених у паспорті фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	-
ДР 2.3.3 Нагнітання повітря Кт 2.3.3	Температура, тиск	Технічний манометр, термометр технічний	Під час операції	Т= 120-140 ºС, Р=0,3 МПа
ДР 2.3.4 Стабілізація термодинамічних показників повітря Кт 2.3.4	Температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Під час операції	Т= 20-22 ºС, W= 30-60 %
ДР 3. Підготовка води очищеної Кт, Кмб 3	Мікробна контамінація, вміст мікроорганізмів у воді	Методи мікробіологічного аналізу	Після кожної операції	КУО < 500/м^3

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 4.1 Змішування сировинних компонентів Кт 4.1	Час	Годинник технічний	Кожну операцію	t=30-40 хв
ДР 4.2 Зволоження суміші Кт 4.2	Час	Годинник технічний	Кожну операцію	t=15 хв
ДР 4.3 Грануляція Кт 4.3	Час	Годинник технічний	Кожну операцію	t=40 хв
ДР 4.4 Сушіння гранул Кт 4.4	Частота обертання, температура, час, вологість	Тахометр, Термометр, технічний , годинник технічний психрометричний метод	Кожну операцію	T= 65 ºC, W= 1-3 %, t=60 хв, n= 3-10 об/хв
ДР 4.5 Змішування з додатковими компонентами Кт 4.5	Час	Годинник технічний	Кожну операцію	t=30 хв
ДР 5.1.1 Змішування компонентів Кт 5.1.1	Маса компонентів ПС в дозаторі, pH, час, частота обертання турбінної мішалки	Дозатор, тахометр, візуальний, годинник технічний, датчик pH	Кожну операцію	pH= 7,0 , t= 2 год , n= 300 об/хв
ДР 5.1.2 Фільтрація Кт 5.1.2	Рівень ефективності очищення після його проходження через фільтр, час, температура	Термометр, технічний , годинник технічний, візуальний	Кожну операцію	T= 20-25 ºC, t= 2-3 год, Відсутність домішок та прозорість

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 5.1.3 Стерилізація Кт 5.1.3	Насичена водяна пара, температура, час	Візуальний, термометр технічний , годинник технічний	Кожну операцію	Т= 130 ºС, t= 120 хв
ДР 5.2.1 Змішування компонентів Кт 5.2.1	Маса компонентів ПС в дозаторі, час, частота обертання турбінної мішалки	Дозатор, тахометр, візуальний, годинник технічний	Кожну операцію	t= 2 год , n= 300 об/хв
ДР 5.2.2 Стерилізація поживного середовища Кт 5.2.2	Процес, час, температура	Візуальний, термометр технічний , годинник технічний	Кожну операцію	Т= 121 ºС, t= 15 хв
ДР 5.3.1 Змішування компонентів Кт 5.3.1	Маса компонентів ПС в дозаторі, час, частота обертання турбінної мішалки	Дозатор, тахометр, візуальний, годинник технічний	Кожну операцію	t= 2 год , n= 400 об/хв
ДР 5.3.2 Стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу Кт 5.3.2	Насичена водяна пара, температура, час, тиск	Візуальний, термометр технічний , годинник технічний, технічний манометр	Кожну операцію	Т= 120 ºС, t= 25-30 хв, Р=0,2 МПа
ТП 6.1. Відновлення музейної культури *E. coli B0016-200BB* Кт, Кмб 6.1	Відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій, час, температура	Мікробіологічний контроль, термометр технічний , годинник технічний	Кожну операцію	Т= 35 ºС, t= 24-48 год

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 6.2 Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках Кт, Кмб 6.2	Мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, час температура, частота обертів	Мікробіологічний контроль, термометр технічний , годинник технічний, тахометр	Кожну операцію	Т= 37 ºС, t= 24 год n= 200 об/хв
ТП 6.3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Кт, Кмб 6.3	Мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів, концентрація біомаси, час, температура	Мікробіологічний контроль, термометр технічний , годинник технічний	Кожну операцію	Т= 33 ºС, t= 42 год
ТП 7. Виробниче культивування Кт, Кмб, Кх 7	Тривалість процесу, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль	Мікроскопіювання – кожні 2-3 години, всі інші показники контролюються автоматично	Т= 30-35 ºС, t= 42-52 год n= 3000 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 8.1. Центрифугування Кт 8.1	Швидкість обертів, час	Датчики швидкості, годинник	Кожну операцію	t= 15-20 хв, n= 20000 об/хв
ТП 9.1 Ультрафільтрація Кт 9.1	Температура, тиск, концентрат	Візуальний, термометр технічний , технічний манометр	Кожну операцію	Т= 20-21 ºС Р= 1,4 МПа Відсутність сторонніх домішок
ТП 9.2 Іонообмінна хроматографія	Параметри іоніту, температура	Регулятор, термометр технічний	Кожну операцію	Згідно до технології Т= 45-50 ºС

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 9.3 Кристалізація Кт 9.3	Кількість затравки, температура, час	Ваги, термометр технічний , годинник технічний	Кожну операцію	Т= 2-5 ºС, t= 25-30 год
ТП 9.4 Ультрафільтрація кристалічної суспензії Кт 9.4	Температура, тиск, суспензія	Візуальний, термометр технічний , технічний манометр	Кожну операцію	Т= 20-21 ºС Р= 1,4 МПа Відсутність сторонніх речовин
ТП 10.1 Сушіння в барабанній сушарці Кт 10.1	Частота обертання, час кількість затравки	Ваги, тахометр, годинник технічний	Кожну операцію	t= 1-2 год, n= 4-12 об/хв
ТП 11.1 Подрібнення Кт 11.1	Частота обертання, час	Тахометр, годинник технічний	Кожну операцію	t= 30-60 хв, n= 60-100 об/хв
ПМВ 13 Пакування та фасування Кт 13	Маса, цілісність, вологість, стійкість, готовий продукт, показники якості	Візуальний, фізичний, лабораторний	Кожну операцію	Відповідно до технологічного регламенту
ЗВ 14 Знешкодження відходів Кт, Кмб, Кх 14	Концентрація	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних правил і норм

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обгрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Інокулятор, призначений для культивування мікробного посівного матеріалу на основі рідких поживних середовищ, виступає одним із ключових і найспецифічніших апаратів у сфері біотехнологічного виробництва. Його функціональне призначення полягає в створенні оптимальних умов для росту і розвитку мікроорганізмів, що досягається за рахунок:

- підтримки необхідного рівня розчиненого кисню у поживному середовищі;
- ефективного відведення вуглекислого газу, який утворюється внаслідок життєдіяльності мікроорганізмів;
- формування рівномірного розподілу компонентів поживного середовища по всьому об’єму інокулятора;
- інтенсивного теплообміну та масообміну, що є критично важливими для стабільного біопроцесу.

Незважаючи на розмаїття конструкцій інокуляторів, що використовуються для культивування різних штамів мікроорганізмів, більшість із них мають схожу конструктивну основу. В залежності від вимог до процесу культивування, усі інокулятори поділяються на дві основні категорії: перша - без подачі стерильного повітря, призначена для анаеробних бактерій, і друга - з примусовою подачею повітря, яка використовується для аеробних мікроорганізмів.

Інокулятори класифікуються також за способом передачі енергії, необхідної для забезпечення процесу перемішування поживного середовища. В залежності від цього параметра виділяють такі основні типи конструкцій:

- Інокулятори з енергетичною підтримкою з боку газової фази - до цієї категорії належать барботажні, ерліфтні та тарілчасті апарати. В цих системах перемішування відбувається за рахунок підйому та руху газових бульбашок через середовище, що сприяє одночасному масообміну та аерації.
- Інокулятори з комбінованим способом перемішування - це апарати, в яких передбачене одночасне використання механічних пристроїв для змішування (наприклад, мішалок) та елементів, що забезпечують розпилення або барботування газу. Такий підхід дозволяє досягти високої ефективності змішування та гнучкості процесу.
- Інокулятори з механічною системою перемішування - у таких апаратах поживне середовище приводиться в рух за допомогою обертових мішалок. Ці пристрої можуть відрізнятись як конструктивно (формою та розташуванням лопатей), так і за параметрами обертання (швидкість, напрямок, частота). Механічне перемішування дозволяє досягати високого ступеня гомогенізації середовища та ефективного тепло- і масообміну [32].

У моєму дипломному проєкті посівний матеріал культивується в інокуляторі, який обладнаний механічною системою перемішування. Зокрема, використовується відкрита турбінна мішалка, яка функціонує з частотою обертання 220 обертів за хвилину. Крім того, у конструкції передбачено барботер, що забезпечує інтенсивне насичення поживного середовища технологічним повітрям, необхідним для ефективної аерації. Така комбінація механічного та газового перемішування дозволяє створити оптимальні умови для росту та розвитку аеробних мікроорганізмів.

5.1.1 Вибір посівного ферментера

Сталеві або емальовані чавунні реактори призначаються для здійснення різноманітних фізико-хімічних процесів у промислових умовах. Ці апарати зазвичай мають вертикальну циліндричну форму та виготовляються в широкому діапазоні об'ємів - від 0,1 м³ до понад 100 м³. Зовні корпус реактора може бути обладнаний пароводяною сорочкою, яка виконує функцію теплообміну. Сорочка може бути двох типів: гладка приварна або конструкція з напівтруб.

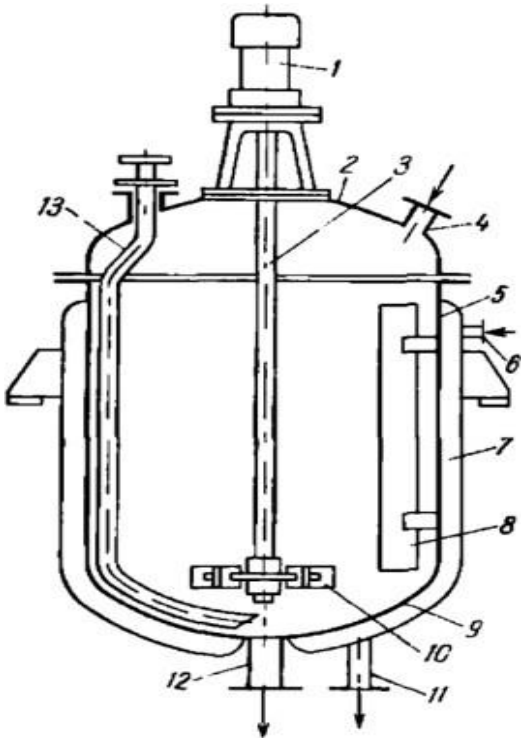
У внутрішній частині реактора розташовується пристрій для перемішування середовища - як правило, це мішалка відкритого турбінного типу, яка забезпечує ефективне гомогенізування складників у робочому об’ємі.

Для апаратів, оснащених напівтрубчастою сорочкою, дозволяється експлуатація під робочим тиском до 1,6 МПа. У випадку використання гладкої приварної сорочки допустимий тиск є нижчим - до 0,4 МПа. Як теплоносій у систему теплообміну можуть подаватися як водопровідна, так і оборотна (рециркуляційна) вода, а також пара або високотемпературні органічні теплоносії, в залежності від умов технологічного процесу.

Реактори-змішувачі можуть бути виготовлені як у зварній монолітній конструкції, так і з можливістю розбирання. Зазвичай вони мають еліптичне днище та верхню кришку. На корпусі реактора передбачено наявність великої кількості технологічних штуцерів: для подачі і відведення теплоносія, для переливу готового продукту, введення або перевалювання сировини, а також наявні штуцери для технологічних трубопроводів, термометрів і запобіжної арматури. Додатково присутній завантажувальний люк для введення компонентів вручну або механізованим способом.

Після того як до апарата подається необхідна кількість води, здійснюється завантаження твердих (сипучих) інгредієнтів. Цей процес реалізується за допомогою гнучкого механічного транспортного пристрою. Далі відбувається автоматичне нагрівання середовища до встановленої технологічної температури за допомогою системи автоматичного управління,

що дозволяє точно підтримувати необхідні параметри для перебігу реакцій [33].



1 – двигун з привідом; 2 – кришка; 3 – вал мішалки; 4 – штуцер для подачі зжатого повітря; 5 – корпус; 6 та 11 – штуцери для входу и виходу теплоносія; 7 – сорочка; 8 – відбивач перегородок; 9 – днище; 10 –мішалка; 12 – штуцер для зливу продукту; 13 – труба перемішуюча

Рис. 5.1 - Інокулятор з мішалкою [33]

Корпус апарата (рис. 5.1), як правило, складається з кількох основних елементів: вертикальної циліндричної обичайки (5), верхньої кришки (2), на якій монтується привід мішалки (1), та нижнього днища (9). У тих моделях апаратів, де передбачене функціонування під тиском, що відрізняється від атмосферного, конструктивно застосовуються еліптичні кришки та днища. Це обумовлено необхідністю підвищеної міцності та надійності під тиском. У великих за діаметром апаратах верхню кришку та днище, як правило, виготовляють нерознімними — тобто зварюють суцільно з основним корпусом. Однак, для забезпечення доступу до внутрішньої частини апарата з метою технічного огляду, обслуговування або очищення, у таких конструкціях передбачено встановлення люків великого діаметра.

Для реалізації теплообміну між середовищем у апараті та зовнішнім теплоносієм, корпус оснащується спеціальною сорочкою (7), яка охоплює зовнішню поверхню циліндричної частини апарата.

Привід мішалки здійснюється за допомогою електродвигуна, який з'єднується з мішальним валом безпосередньо або через проміжну передачу, занижену по висоті. У випадках, коли необхідно знизити частоту обертання мішального вала порівняно з обертами електродвигуна, в конструкцію вбудовують редуктори різних типів, що забезпечують відповідну передавальну функцію [34].

5.1.2 Вибір мішалки

Основним конструктивним елементом апарата, який забезпечує рух рідкого середовища всередині робочого об'єму, є мішалка. Практичний досвід експлуатації обладнання свідчить, що більшість технологічних задач, пов'язаних із перемішуванням, можуть бути ефективно реалізовані з використанням обмеженої кількості типових конструкцій мішалок. Для кожного з типів мішалок існують характерні сфери застосування, а також оптимальні діапазони геометричних співвідношень між окремими елементами.

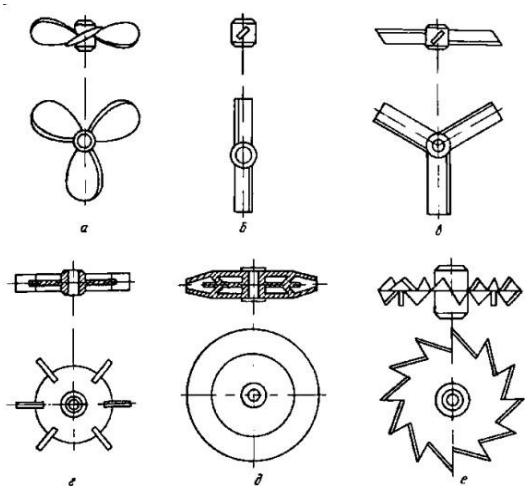
Так, наприклад, при необхідності обробки високов'язких середовищ за умов ламінарного режиму потоку, доцільним є застосування стрічкових, шнекових або скребкових мішалок. Особливо скребкові мішалки демонструють високу ефективність у процесах, де важливо посилити тепловіддачу між рідким середовищем та стінками апарата. Скребки у таких мішалках фіксуються на основному каркасі за допомогою пружин, що забезпечує їх постійне щільне прилягання до внутрішньої поверхні апарата, таким чином підтримуючи високий рівень теплопередачі.

У випадках, коли потрібно перемішувати рідини з помірною в'язкістю, особливо в умовах теплової обробки, тобто при використанні апаратів із теплообмінною сорочкою, застосовують тихохідні мішалки якірного або рамного типу. Такі мішалки забезпечують рівномірне перемішування по

всьому об’єму апарата без значних гідродинамічних збурень, що важливо для підтримання стабільного температурного режиму [33].

Швидкохідні мішалки лопатевого, турбінного або пропелерного типу (рис. 5.2) характеризуються тим, що співвідношення діаметра мішалки (D) до діаметра вала (d) зазвичай перевищує значення 1,5. Основна особливість таких мішалок полягає в їхній здатності формувати виражений осьовий циркуляційний потік рідини у робочому об’ємі апарата.

У випадку, коли конструкція апарата не передбачає наявності внутрішніх направляючих або інших допоміжних елементів, ці мішалки здатні створювати так званий помповий ефект - тобто інтенсивне вертикальне переміщення рідини вздовж осі мішалки. Зазначений ефект може бути вдвічі потужнішим порівняно з ефектом, який забезпечують стандартні мішалки аналогічного розміру, що робить такі пристрої особливо ефективними для швидкого змішування та гомогенізації компонентів.



а – пропелерна; б – дволопатева; в – трилопатева; г – турбіна відкрита; д – турбіна закрита; е - фрезерна

Рис. 5.2 - Швидкохідні мішалки [35]

Серед різновидів мішалок, які застосовуються в хімічних та біотехнологічних апаратах, окреме місце займають якірні мішалки, що можуть виготовлятися як у стандартному, так і в посиленому варіанті. Їхня конструкція включає вигнуті під форму апарата лопаті, які закріплюються на розбірній маточині. Для підвищення жорсткості до лопат додаються ребра

жорсткості. У посиленому виконанні до верхньої частини мішалки додатково приварюють поперечину з ребрами. Якірні мішалки використовуються при в’язкості середовища в діапазоні μс = 1÷10000 (МН·с)/м² та швидкості перемішування v = 0,5–5,5 м/с, особливо для обробки важких в’язких рідин, посилення теплообміну та запобігання осіданню компонентів на внутрішній поверхні апарата.

Аналогічного призначення рамні мішалки, також орієнтовані на роботу з високов’язкими рідинами, складаються з кількох лопатей, що утворюють жорстку рамну структуру. Типова конструкція включає дві лопаті, з’єднані з нижньою розбірною ступицею, і дві поперечини — з'єднані з верхньою і середньою маточинами. Для міцності всі елементи підсилюються ребрами жорсткості. Рамні мішалки ефективно перемішують рідину по всій товщині шару та працюють при μс = 10÷40000 (МН·с)/м² з швидкістю обертання v = 0,8–7 м/с залежно від в’язкості середовища.

Пропелерні мішалки, мають лопаті гвинтового типу з поступово змінюваним кутом нахилу — від 45° біля основи до 20° на кінці. Це дозволяє створювати інтенсивний осьовий потік, що охоплює всі шари рідини у апараті. Вони працюють з рідинами в’язкістю μс = 1÷100 (МН·с)/м² при швидкості обертання 2–8 об/с для вузьких і 3–30 об/с для рухливих рідин, забезпечуючи рівномірне змішування по всьому об’єму.

Лопатеві мішалки складаються з двох або більше лопатей, розташованих перпендикулярно або під нахилом до осі вала. Вони створюють переважно ламінарні радіальні потоки та перемішують лише прилеглі до лопатей шари при кінцевій швидкості 1–5 м/с. Для збільшення зони змішування використовуються багатоярусні конструкції, в яких кілька лопатей кріпляться на валу на різній висоті. Похилі лопаті сприяють посиленню осьового потоку. До цього типу також відносять спеціалізовані варіанти — якірні, рамні та планетарні мішалки. Лопатеві мішалки застосовують при в’язкості до μс = 1÷3000 (МН·с)/м² для змішування взаємно розчинних рідин, суспензій із

твердими частинками до 90% масової частки, повільного розчинення, вирівнювання температури та процесів кристалізації.

Турбінні мішалки поділяються на відкриті та закриті, з плоскими або похилими лопатями. Вони генерують осьові та радіальні потоки, забезпечуючи ефективне перемішування в усьому об’ємі при частоті обертання 2–30 об/с. Зі зростанням частоти виникає тангенціальний рух рідини, що може утворити "воронку" і знизити ефективність перемішування. Тому необхідно уникати перевищення допустимої швидкості. Типова конструкція турбінної мішалки — це диск із закріпленими прямокутними лопатями та центральною маточиною. У закритих типах лопаті з’єднуються конусоподібними елементами зверху і знизу. Відкриті турбінні мішалки працюють при в’язкості до μс = 1÷40000 (МН·с)/м² і швидкості v = 2,5–10 м/с, закриті — до μс = 1÷25000 (МН·с)/м² при v = 2,5–12 м/с.

Щоб покращити рух рідини та зменшити небажану циркуляцію по колу, в апаратах встановлюють відбивні перегородки. Вони зменшують тангенціальну складову потоку та сприяють зростанню осьової й радіальної швидкостей. Для підсилення помпового ефекту часто використовують напрямні труби (дифузори), які ефективні як при ламінарному, так і при турбулентному режимах, особливо в комбінації зі шнековими або пропелерними мішалками.

У апаратах з об’ємом менше 5 м³ змійовики зазвичай розташовуються співвісно з валом. У більших апаратах допускається встановлення кількох змійовиків по периферії. При цьому концентричне розташування декількох трубчастих елементів є небажаним через ймовірне погіршення умов перемішування та теплообміну в міжтрубному просторі [35].

Отже, доцільно застосувати турбінну відкриту мішалку, яка належить до категорії швидкохідних перемішувальних пристроїв і вирізняється низкою технологічних переваг. Такий тип мішалки забезпечує інтенсивне перемішування за рахунок створення комбінованих осьових та радіальних потоків, що дозволяє досягати високої ефективності масо- та теплообміну в

середовищі. Крім того, турбінні мішалки мають надійну конструкцію, добре працюють у широкому діапазоні в'язкостей та забезпечують рівномірне розподілення компонентів у всьому об’ємі апарата.

5.1.3 Вибір матеріалу для виробництва апарату

Під час проектування та виготовлення технологічного обладнання до вибору конструкційних матеріалів висуваються кілька основоположних вимог:

- Хімічна та корозійна стійкість — матеріал повинен витримувати вплив агресивного середовища, враховуючи концентрацію речовин, температуру та тиск, що супроводжують технологічний процес. Також важливою є стійкість до різних видів корозії, включно з міжкристалітною, точковою та щілинною.
- Механічна міцність — матеріал має забезпечувати надійну роботу апарата при робочих параметрах (тиск, температура), а також витримувати додаткові навантаження, які виникають під час експлуатації: вітрові, вагові, динамічні, випробувальні та інші.
- Технологічність у зварюванні та обробці — перевага надається матеріалам, які добре зварюються, утворюють міцні та корозійностійкі шви, легко піддаються формуванню, вигину та обробці тиском.
- Економічна доцільність і доступність — бажано використовувати недефіцитні, порівняно дешеві матеріали, доступні на внутрішньому ринку, без необхідності залучення додаткових виробничих ресурсів. При цьому можуть розглядатися варіанти з двошаровими сталями або сталями з неметалевими покриттями.

У межах даного дипломного проєкту як конструкційний матеріал для виготовлення виробничого апарата обрано нержавіючу сталь марки 12Х18Н10Т. Цей сплав вирізняється високою міцністю та стійкістю до корозійного впливу, що забезпечує тривалий термін експлуатації обладнання.

- Твердість матеріалу знаходиться в межах НВ 101–179 МПа, що є достатнім для технологічних навантажень.

- Густина сталі становить 7920 кг/м³, що відповідає середнім показникам нержавіючих сплавів.
- Температурні режими обробки: кування виконується при 1200 °C на початку процесу і до 850 °C в його завершенні; гартування здійснюється при температурах 1050–1100 °C.
- За умов підвищених температур сталь відноситься до 2–3 групи стійкості при 650 °C та до 4–5 групи — при 750 °C, що свідчить про її термостійкість.
- Зварюваність сталі 12Х18Н10Т не викликає труднощів і не має обмежень, що робить її надзвичайно зручною для виготовлення складних зварних конструкцій [36,37].

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Необхідно розрахувати інокулятор для посівного матеріалу. Загальний об'єм апарату $V_Н$ = 1 м^3, коефіцієнт заповнення $К_з$=0,8. Температура в апараті підтримується на рівні t_c = 33 °С. Витрати повітря у посівному апараті складають $V_г$ = 3 м^3⁄с.

5.2.1 Розрахунок реактора

За ГОСТ 20680-86 приймаємо внутрішні діаметр апарату:

$$D_{вн} = 1000 \text{ мм} = 1 \text{ м}.$$

Висота корпусу:

$$Н = 1450 \text{ мм} = 1{,}45 \text{ м}.$$

Розрахуємо розміри днища апарату. Висота еліптичної частини днища:

$$h_{ел.дн} = 0{,}25 \cdot D_{вн} \qquad (5.1)$$

$$h_{ел.дн} = 0{,}25 \cdot 1 = 250 \text{ мм} = 0{,}25\text{м}$$

За ГОСТ 6533– 78 знаходимо решту конструктивних розмірів днища

Внутрішня поверхня еліптичного днища : $F = 0{,}09$ м^2

Висота відбортованої частини: $h_1 = 25$мм = 0,025 м

Товщина стінки еліптичного днища : $S_{дн}$ = 8мм = 0,008 м

Об'єм еліптичного днища : $V_{дн}$ = 3,3 дм^3 = 0,0033 м^3

Маса днища : $m_{дн}$ = 5,9 кг

Повна висота еліптичного днища: $H_{дн}$ = 0,025 +0,25 = 0,275 м

Повний об'єм:

$$V = V_{ц} + 2V_{дн} =\gg V_{ц} = V - 2V_{дн} \quad (5.2)$$

$$V_{ц} = 1 - 2 \cdot 0{,}0033 = 0{,}993 \text{ м}^3$$

Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{ц} = \frac{V_{ц} \cdot 4}{\pi \cdot D_{вн}^2} \quad (5.3)$$

$$H_{ц} = \frac{0{,}993 \cdot 4}{3{,}14 \cdot 1^2} = 1{,}265 \text{ м}$$

Висота рівня рідкого поживного середовища в циліндричній частині апарату:

$$H_{рц} = \frac{4(К_з - V_{дн})}{\pi \cdot D_{вн}^2} \quad (5.4)$$

$$H_{рц} = \frac{4(0{,}8 - 0{,}0033)}{3{,}14 \cdot 1^2} = 1{,}015 \text{ м}$$

Висота стовпа рідини в реакторі:

$$H_{р} = H_{рц} + H_{дн} \quad (5.5)$$

$$H_{р} = 1{,}015 + 0{,}275 = 1{,}29 \text{ м}$$

Загальна висота реактору без штуцерів та опор:

$$H_{заг} = H_{ц} + 2 \cdot H_{дн} \quad (5.6)$$

$$H_{заг} = 1{,}265 + 2 \cdot 0{,}275 = 1{,}815 \text{ м}$$

5.2.2 Розрахунок перемішуючого пристрою посівного апарату

У конструкції інокулятора головним елементом, що забезпечує процес перемішування середовища, є мішалка турбінного типу з відкритою геометрією, яка розміщується безпосередньо всередині апарата..

Діаметр турбінної мішалки визначаємо за ГОСТ 20680-86:

$$d_{м} = 450 \text{ мм}; \frac{Dвн}{d_{м}} = 2{,}667$$

Розрахуємо розміри мішалки:

Висота лопаті:

$$h_л = 0,2 \cdot d_м = 0,2 \cdot 0,45 = 0,09 \text{ м}$$

Ширина лопаті:

$$l_л = 0,25 \cdot d_м = 0,25 \cdot 0,45 = 0,113 \text{ м}$$

Висота від днища до мішалки:

$$h = 0,5 \cdot d_м = 0,5 \cdot 0,45 = 0,225 \text{ м}$$

Коефіцієнт гідравлічного опору мішалки: $\xi_м = 8,4$

Колова швидкість для турбінної мішалки: w= (2,5…10) м/с, приймаємо 4 м/с.

Частота обертання:

$$n = \frac{w}{\pi d_м} = \frac{4}{3,14 \cdot 0,45} = 2,83 \text{ с}^{-1}$$

Для того щоб визначити, чи є потреба у встановленні відбиваючих перегородок, необхідно виконати розрахунок глибини утвореної воронки. Одним із ключових критеріїв для такого аналізу є число Рейнольдса:

$$Re_{вц} = \frac{n \cdot d_м^2 \cdot p_c}{\mu_c} \quad (5.7)$$

$$Re_{вц} = \frac{2,83 \cdot 0,45^2 \cdot 1060}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 3,92 \cdot 10^5$$

Параметр висоти завантаження апарата :

$$\gamma(Г) = 8 \cdot \frac{H_р}{D} + 1 \quad (5.8)$$

$$\gamma(Г) = 8 \cdot \frac{0,809}{1,2} + 1 = 6,393$$

Параметр гідравлічного опору мішалки Е:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_м z_м Re_{вц}^{0,25}} \quad (5.9)$$

$$E = \frac{6,393}{8,4 \cdot 1 \cdot (3,92 \cdot 10^5)^{0,25}} = 0,0304$$

Глибина воронки в посівному апараті без відбиваючих перегородок:

$$h_в = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_м^2}{2} = \frac{19 \cdot 1^2 \cdot 0,45^2}{2} = 1,923$$

В — це параметр, числове значення якого визначається за допомогою

номограми [41], залежно від величини Е та конструктивного типу мішалки.

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{\text{гр}} = \text{H}_\text{р} - h = 1{,}29 - 0{,}225 = 1{,}065$$

$$h_\text{в} > h_{\text{гр}}$$

Оскільки глибина воронки перевищує допустиме значення, необхідно встановити відбивальні перегородки.

Розрахуємо ширину перегородки:

$$b = 0{,}1 \cdot d_\text{м} = 0{,}1 \cdot 450 = 45 \text{ мм.}$$

5.2.3 Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

$$N = K_N \rho_c n^3 d_\text{м}^5 \qquad (5.10)$$

За графіком нормалі (рис.5.1) знаходимо значення $K_N = f(Re)$:

$$K_N = 4$$

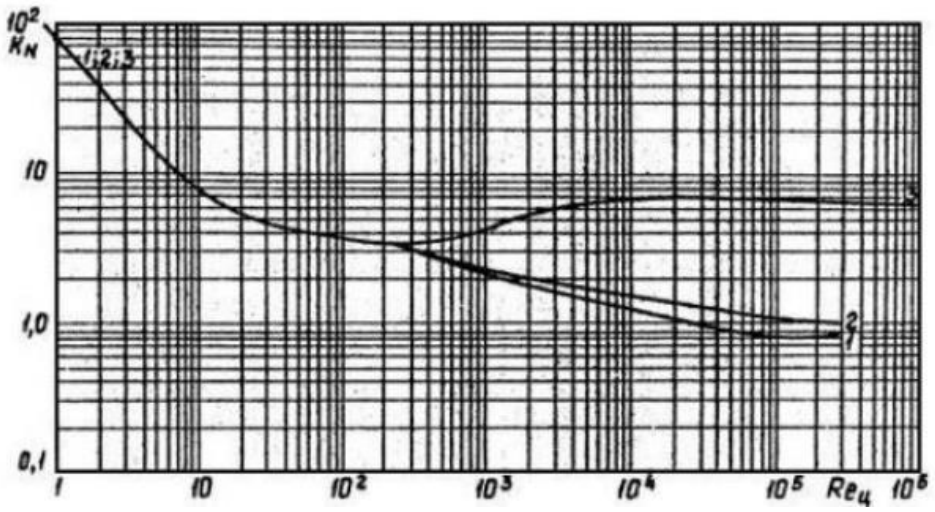


Рис. 5.1 Графік нормалі для турбінної мішалки [41]

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_n p_p n^3 d_m^5 \qquad (5.11)$$

$$N = 4 \cdot 1056 \cdot 1^3 \cdot 0{,}45^{\,5} = 77{,}94 \text{ Вт}$$

$$d_\text{в} = \text{C} \cdot d_\text{м} \qquad (5.12)$$

$$d_\text{в} = 0{,}117 \cdot 0{,}45 = 0{,}053 \text{ м}$$

Потужність, що витрачається на подолання тертя ущільнення валу мішалки:

$$N_{\text{ущ}} = 6020 \cdot d_{\text{в}}^{1,3}\ 6020 \cdot 0{,}053^{1,3} = 132{,}18\ \text{Вт} \qquad (5.13)$$

Тоді, потужність привода мішалки:

$$N_{\text{ел}} = \frac{K_n \cdot K_H \cdot \sum K_i \cdot N \cdot N_{\text{ущ}}}{\varphi} = \frac{1{,}25 \cdot 1{,}14 \cdot 2{,}2 \cdot 77{,}94 \cdot 132{,}18}{0{,}87} = 37123\ \text{Вт}$$

K_n — це коефіцієнт, який відображає відсутність у конструкції апарата відбиваючих перегородок і має значення 1,25

K_i — це коефіцієнт, що враховує вплив внутрішніх елементів конструкції апарата. У даному випадку враховано наявність термометра та манометра, кожен з яких додає до загального значення коефіцієнта по 1,1. Таким чином, сумарне значення Кі становить 2,2

$$K_H = \left(\frac{H_p}{D}\right)^{0,5} = \left(\frac{1{,}29}{1}\right)^{0,5} = 1{,}14$$

φ – ККД двигуна (0,85..0,9)

5.2.4 Тепловий розрахунок посівного апарату

Основною метою теплового розрахунку є визначення теплового навантаження на інокулятор, а також розрахунок площі теплообміну теплообмінних елементів апарата.

У процесах нагрівання або охолодження робочого середовища в посівних апаратах теплова енергія подається або відводиться за допомогою теплоносія, який подається у теплообмінні пристрої, такі як зовнішня сорочка апарата та/або вбудований змійовик.

Розрахунок об’ємів поживного середовища і посівного матеріалу:

$$V_p = V_{\text{мп}} + V_{\text{пм}} \qquad (5.14)$$

$$V_{\text{пс}} = 0{,}9 \cdot V_p = 0{,}9 \cdot 0{,}8 = 0{,}72\ \text{м}^3$$

$$V_{\text{пм}} = 0{,}1 \cdot V_p = 0{,}1 \cdot 0{,}8 = 0{,}08\ \text{м}^3$$

Номінальний об’єм апарату розраховуємо:

$$V_H = \frac{V_p}{K_{\text{з}}} \Rightarrow V_p = V_H \cdot K_{\text{з}} = 1 \cdot 0{,}8 = 0{,}8\ \text{м}^3$$

$K_з$ – коефіцієнт заповнення

Теплофізичні властивості поживного середовища при визначальній температурі – $t_{ср} = 33°C$.

$$\rho_{кр} = \rho_{пс} = \rho_{пм} = 1060 \frac{кг}{м^3}$$

$$c_{кр} = c_{пс} = c_{пм} = 3946 \frac{кг}{м^3}$$

Розрахунок маси поживного середовища, посівного матеріалу та культуральної рідини:

$$M_х = \rho_х \cdot V_х \qquad (5.15)$$

$$M_{пс} = \rho_{пс} \cdot V_{пс} = 1056 \cdot 0{,}72 = 760 \text{ кг}$$

$$M_{пм} = \rho_{пм} \cdot V_{пм} = 1056 \cdot 0{,}08 = 84 \text{ кг}$$

$$M_{кр} = \rho_{кр} \cdot V_{кр} = 1056 \cdot 0{,}8 = 845 \text{ кг}$$

Надходження енергії в інокулятор для вирощування посівного матеріалу відбувається :

1) з поживним середовищем

$$E_{пс} = M_{пс} \cdot C_{пс} \cdot t_{пс} = 760 \cdot 3{,}946 \cdot 10^3 \cdot 33 = 98{,}9 \text{ МДж}$$

2) з посівним матеріалом

$$E_{пм} = M_{пм} \cdot C_{пм} \cdot t_{пм} = 84 \cdot 3{,}946 \cdot 10^3 \cdot 33 = 10{,}9 \text{ МДж}$$

3) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв

$$E_{дис1} = N_{уст} \cdot \tau_{пр} = 100 \cdot 162000 = 16{,}2 \text{ МДж}$$

4) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від повітря

$$E_{дис2} = V_г \cdot \Delta\rho \cdot \tau_{пр} = V_г \cdot \rho_с \cdot g \cdot H_р \cdot \tau_{пр}$$

$$E_{дис2} = 0{,}016 \cdot 1056 \cdot 9{,}81 \cdot 0{,}809 \cdot 162000 = 21{,}7 \text{ МДж}$$

5) з повітрям

$$E_{пов} = M_{пов} \cdot C_{пов} \cdot t_{пов} = \rho_{пов} \cdot V_г \cdot \tau_{пов} \cdot C_{пов} \cdot t_{пов} \qquad (5.16)$$

де $\rho_{пов}$ = 1,15 кг /м^3 – густина повітря при температурі 33°С,

$C_{пов}$ = 100,5 Дж/кг · К − питома теплоємність повітря,

$t_{пов}$ = 33°C – початкова температура повітря,

$\tau_{пр}$ = 48 год = 162000 с– тривалість процесу культивування,

$V_г$ = 0,016 м^3/с – витрати повітря,

$$E_{пов} = 1{,}15 \cdot 0{,}016 \cdot 162000 \cdot 100{,}5 \cdot 33 = 9{,}86 \text{ МДж}$$

Сумарна кількість надходження теплоти в інокулятор:

$$\sum E_{надх} = E_{пс} + E_{пм} + E_{пов} + E_{дис1} + E_{дис2} \quad (5.17)$$

$$\sum E_{надх} = 98{,}9 + 10{,}9 + 9{,}86 + 16{,}2 + 21, = 157{,}56 \text{ МДж}$$

Витрати теплової енергії здійснюються:

1) з культуральною рідиною

$$E_к = M_{пм} \cdot C_{к.} \cdot t_к \quad (5.18)$$

$$E_к = 84 \cdot 3946 \cdot 33 = 10{,}9 \text{ МДж}$$

2) з повітрям

$$E_{пов} = \rho_{пов} \cdot V_г \cdot \tau_{пов} \cdot C_{пов} \cdot t_{пов} = 1{,}15 \cdot 0{,}016 \cdot 162000 \cdot 100{,}5 \cdot 33 = 9{,}86 \text{ МДж}$$

3) втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні

$$E_{втр} = 0{,}02 \cdot (E_к + K_{пов}) \quad (5.19)$$

$$E_{втр} = 0{,}02 \cdot (10{,}9 + 9{,}86) = 0{,}415 \text{ МДж}$$

Сумарні витрати становлять:

$$\sum E_{витр} = E_к + E_{пов} + E_{втр} \quad (5.20)$$

$$\sum E_{витр} = 10{,}9 + 9{,}86 + 0{,}415 = 21{,}175 \text{ МДж}$$

Теплове навантаження у інокуляторі становить:

$$E_m = \sum E_{витрат} - \sum E_{надх} = 21{,}175 - 157{,}5 = -136{,}385 \text{ МДж}$$

Отже, у посівному апараті відбувається нагрівання (E_m < 0)

Для того щоб правильно визначити необхідну площу теплообмінної поверхні, спочатку потрібно розрахувати коефіцієнт тепловіддачі з боку теплоносія, який рухається у сорочці апарата. Паралельно слід також визначити коефіцієнт тепловіддачі від середовища, яке заповнює внутрішній об'єм посівного апарата. Після цього розраховують загальний

коефіцієнт теплопередачі через стінку апарата, який враховує сумарний опір теплопередачі між теплоносієм та середовищем.

Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія:

$$\alpha = \frac{D_c - 2\delta_{ст} - D}{2} \quad (5.21)$$

Приймаємо до конструкції наступні параметри:

$\delta_{ст} = 0{,}007$ м – товщина стінки

$D_c = 1{,}3$ м – діаметр сорочки

$$\alpha = \frac{1{,}3 - 2 \cdot 0{,}007 - 1}{2} = 0{,}143 \text{ м}$$

$$b = 0{,}15 - \alpha = 0{,}15 - 0{,}143 = 0{,}007 \text{ м}$$

Еквівалентний діаметр:

$$d_{екв} = \frac{2ab}{a+b} \quad (5.22)$$

$$d_{екв} = \frac{2 \cdot 0{,}143 \cdot 0{,}007}{0{,}143 + 0{,}007} = 0{,}013 \text{ м}$$

Середній діаметр :

$$D_{ср} = D_с - \alpha = 1{,}3 - 0{,}143 = 1{,}157 \text{ м}$$

Щоб визначити площу поверхні теплообміну, необхідно розрахувати коефіцієнти тепловіддачі як від теплоносія, що циркулює в сорочці апарата, так і від поживного середовища, розташованого в посівному апараті. Крім того, слід знайти загальний коефіцієнт теплопередачі між цими середовищами.

Розрахунок коефіцієнта тепловіддачі від поживного середовища до внутрішньої поверхні стінки апарата здійснюється на основі визначення критерію Нуссельта. Для цього використовується відповідне критеріальне рівняння, яке враховує режим теплового і гідродинамічного процесу, фізико-хімічні властивості середовища, а також геометричні характеристики обладнання. Отримане значення критерію Нуссельта дає змогу обчислити коефіцієнт тепловіддачі, що є необхідним етапом у подальшому визначенні ефективності теплообміну.

$$Nu_c = 1{,}35 Re_c^{0{,}59} \cdot Pr_c^{0{,}38} \cdot Fr_c^{0{,}1} (\frac{\mu_c}{\mu_{ст}})^{0{,}14} \quad (5.23)$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{\rho_c \cdot n \cdot d_м^2}{\mu_c} = \frac{1060 \cdot 1 \cdot 0{,}45^2}{1{,}55 \cdot 10^{-3}} = 138{,}5 \cdot 10^4$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c C_c}{\lambda_c} = \frac{1{,}55 \cdot 10^{-3} \cdot 3820}{0{,}543} = 10{,}90$$

Критерій Фруда:

$$Fr_c = \frac{d_м n^2}{g} = \frac{0{,}4 \cdot 1^2}{9{,}81} = 0{,}0459$$

$$Nu_c = 1{,}35 \cdot (138{,}5 \cdot 10^4)^{0{,}59} \cdot 10{,}90^{0{,}38} \cdot 0{,}0459^{0{,}1} \cdot 1 = 10332$$

Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини становить:

$$\alpha = \frac{Nu \cdot \lambda}{D} \quad (5.24)$$

$$\alpha = \frac{10332 \cdot 0{,}543}{1} = 5610 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

Розраховуємо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія, який рухається в сорочці апарата

Об’ємні витрати теплоносія:

$$V_т = \frac{G_т}{\rho_т} \quad (5.25)$$

де $\rho_т$ = 994 – густина теплоносія при температурі $t_т$ = 33°С.

$$V_т = \frac{0{,}015}{994} = 0{,}000015 \text{ м}^3/\text{с}$$

Швидкість руху теплоносія:

$$W_т = \frac{V_т}{ab} \quad (5.26)$$

$$W_т = \frac{0{,}000015}{0{,}143 \cdot 0{,}007} = 0{,}0149 \frac{м}{с}$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_т = \frac{w_т d_{екв}}{v_т} \quad (5.27)$$

де $\nu_т$ = 0,771·10^{-6} м^2/с– кінематична в’язкість теплоносія при температурі $t_т$ = 33℃

$$Re_т = \frac{0{,}0149 \cdot 0{,}013}{0{,}771 \cdot 10^{-6}} = 251$$

З розрахунків бачимо, що $Re_т$ < 10000, то критерій Нуссельта визначаємо за критеріальним рівнянням:

$$Nu_т = 0{,}037 Re_т^{0{,}8} \cdot Pr_т^{0{,}43} \quad (5.28)$$

де $\mu_т$ = 3,53 · 10^{-3} Па · с – коефіцієнт динамічної в’язкості теплоносія при температурі $t_т$ = 33℃,

$C_т$ = 3985 Дж⁄кг · К – питома теплоємність теплоносія при $t_т$ = 33℃,

$\lambda_т$ = 0,623 Вт/ м·К – питома теплопровідність теплоносія при $t_т$ = 28℃.

$$Pr_т = \frac{3{,}53 \cdot 10^{-3} \cdot 3985}{0{,}623} = 22{,}58$$

$$Nu_т = 0{,}037 \cdot 251^{0{,}8} \cdot 22{,}58^{0{,}43} = 11{,}75$$

Коефіцієнт тепловіддачі теплоносія в сорочці:

$$\alpha_т = \alpha_{т1}(1 + 3{,}54\frac{d_{екв}}{D_{ср}}) \quad (5.29)$$

$$\alpha_{т1} = \frac{Nu_т \cdot \lambda_т}{d_{екв}} = \frac{11{,}75 \cdot 0{,}623}{0{,}013} = 563{,}09 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

$$\alpha_т = 563{,}09 \left(1 + 3{,}54\frac{0{,}013}{1{,}3}\right) = 583{,}1 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

Коефіцієнт теплопередачі:

$$К = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_с} + \frac{\delta_{ст}}{\lambda_{ст}} + \frac{1}{\alpha_т}} \quad (5.30)$$

де, $\lambda_{ст}$ = 16 Вт⁄м · К – теплопровідність стінки

$$К = \frac{1}{\frac{1}{4675} + \frac{0{,}07}{16} + \frac{1}{583{,}1}} = 159 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

Розрахункова поверхня теплообміну:

$$F_р = \frac{Q}{К \cdot \Delta t_{ср} \tau_{пр}} \quad (5.31)$$

$$F_р = \frac{22{,}57 \cdot 10^6}{87 \cdot 10 \cdot 162000} = 0{,}160 \text{ м}^2$$

Дійсна поверхня теплообміну:

$$F_{\text{д}} = \pi D H_c \qquad (5.32)$$

$$H_c = H_{\text{р}} - h_{\text{дн}} = 1{,}29 - 0{,}25 = 1{,}04 \text{ м}$$

$$F_{\text{д}} = 3{,}14 \cdot 1 \cdot 1{,}04 = 3{,}266 \text{ м}^2$$

Умова теплообміну виконується, оскільки: $F_{\text{р}} < F_{\text{д.}}$

Отже, можна зробити висновок, що площа теплообмінної поверхні сорочки апарата є достатньою для підтримання необхідного температурного режиму протягом усього циклу роботи обладнання. Це свідчить про ефективність теплопередачі між теплоносієм і середовищем у посівному апараті, а також про відповідність конструкції апарата технологічним вимогам процесу.

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

5.3.1 Вибір привода

Метою вибору валового привода при розрахунках є забезпечення високої надійності та ефективності роботи приводного механізму, включаючи вибір оптимального типу привода, розрахунок потужності, швидкості та вибір необхідних компонентів для передачі руху, забезпечуючи безперебійну роботу та відповідність потребам ферментаційного процесу.

За каталогом обираємо електродвигун загального призначення:

ABB M3BP 90 SLC6

Асинхронний загальнопромисловий трьохфазний електромотор. Потужність 0,75 кВт. Номінальна швидкість обертання 1000 об/хв, частота перемінного струму 50 Гц, напруга 400 В [38].

Для отримання потрібного числа обертів та передачі руху у необхідному напрямку, за каталогом обирається циліндричний двоступінчастий редуктор: редуктор РЦД-250, з передатним числом і = 20, номінальне радіальне навантаження на тихоходному валу = 10000 Н, номінальний момент, що крутить, на тихохідному валу = 431 Нм, ККД = 0,94.

5.3.2 Вибір калориферів

Виходячи з розрахованої площі теплообміну, здійснюємо підбір відповідного калорифера згідно з типорозміром КВс1-П. Обраний калорифер має такі габаритні характеристики: довжина (А) — 530 мм, висота (Б) — 378 мм, діаметр умовного проходу патрубків становить 32 мм. Конструкція передбачає наявність двох груп теплообмінних труб з числом кроків 4 та 2 відповідно. Маса однієї секції складає 43,9 кг.

5.3.3 Вибір дозаторів

Для забезпечення точного дозування рідких продуктів у готову тару було обрано масовий рідинний дозатор типу ДЖМ-1. Даний тип дозатора призначений для об'ємного дозування і функціонує в напівавтоматичному режимі. У процесі роботи оператор виконує встановлення тари, подає команду на початок дозування, а також приймає вже заповнену тару. Такий принцип роботи забезпечує достатню точність і зручність при експлуатації обладнання.

5.3.4 Вибір опори

Метою вибору опори при розрахунках є забезпечення стійкості, безпеки та оптимального розподілу навантаження для інокулятору, включаючи вибір оптимального типу опори, розрахунок міцності та жорсткості, забезпечуючи надійну підтримку та стабільність пристрою під час ферментаційного процесу.

Виходячи зі значних значень висоти апарата та маси під час максимального завантаження за ГСТУ 3-17-193-2000 обираємо опору: опора 1-1000-0,32-0,125-1200.

5.3.5 Вибір насосу

Основною метою гідравлічних розрахунків насосного обладнання є встановлення необхідного напору, який повинен створювати насос, а також визначення потужності електродвигуна, що забезпечить подачу рідини з заданою витратою. Підбір конкретної моделі насоса здійснюється з використанням відповідних каталогів або згідно з вимогами державних стандартів (ГОСТів), при цьому обов’язково враховуються фізико-хімічні

властивості рідини, яка підлягає транспортуванню — зокрема, її в'язкість, густина та агресивність.

$$H_1 = \frac{\Delta P_1}{\rho_1 \cdot g} \quad (5.33)$$

Коефіцієнтів гідравлічного опору:

$$\xi = \frac{17}{Re_T^{0,25}} = \frac{17}{251^{0,25}} = 4,27$$

Розрахунок гідравлічного опору теплообмінника по потоку теплоносіїв:

$$\Delta P_1 = \frac{x_1 \cdot \xi \cdot (\frac{L}{d_{\text{екв}}}) \cdot (\rho_1 \cdot \omega_1)^2}{2} \quad (5.34)$$

$$\Delta P_1 = \frac{3 \cdot 4,27 \cdot (\frac{0,1}{0,013}) \cdot (996 \cdot 0,0036)^2}{2} = 633,4 \text{ Па}$$

$$H_1 = \frac{633,4}{996 \cdot 9,81} = 0,065 \text{ м}$$

Корисна потужність, що затрачується на переміщення середовища:

$$N_{n1} = \frac{\rho_1 \cdot g \cdot H_1}{1000} = \frac{996 \cdot 9,81 \cdot 0,065}{1000} = 0,64 \text{ КВт}$$

Потужність, яку необхідно забезпечити електродвигуном:

$$N_{\text{дв1}} = N \cdot \frac{n_1}{\tilde{n}_н} \quad (5.35)$$

$$N_{\text{дв1}} = 1 \cdot \frac{0,14}{0,6} = 0,23$$

$\tilde{n}_н = 0,6$ – коефіцієнт корисної дії для насоса середньої продуктивності.

Потужність, яку споживає двигун від мережі при $\eta_{дв} = 0,7$

$$N_1 = \frac{N_{\text{дв}}}{\eta \text{дв}} = \frac{0,23}{0,7} = 0,33 \text{ КВт}$$

З урахуванням коефіцієнта запасу потужності β = 2, вибираємо електродвигун із номінальною потужністю, що вдвічі перевищує розраховану необхідну потужність, тобто встановлюємо двигун потужністю:

$$N_{\text{ус1}} = N_1 \cdot \beta \qquad (5.36)$$

$$N_{\text{ус1}} = 0{,}33 \cdot 2 = 0{,}66 \text{ КВт}$$

На основі розрахованих параметрів вибирається вертикальний насос типу 8008-2,5/100 (32В-12), який відповідно до стандарту ГОСТ 19740-74 забезпечує подачу 9000 м³/год (або 2,5 м³/с) при напорі 100 м.

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Інокулятор — це обладнання, що використовується для введення мікроорганізмів у живильне середовище з метою культивування. Робота з інокулятором передбачає контакт з біологічними агентами, стерильними матеріалами та потенційно небезпечними речовинами. Тому дотримання правил охорони праці та вимог екологічної безпеки є обов'язковим.

Вимоги регламентуються Законом України «Про охорону праці», а також основними положеннями ДСТУ ISO 45001 (системи управління охороною праці) та ДСТУ ISO 14001 (екологічне управління).

До роботи з апаратом допускаються лише працівники, які пройшли вступний та первинний інструктаж з охорони праці, медичний огляд та спеціальне навчання щодо безпечного поводження з біологічними матеріалами. Перед початком роботи необхідно переконатися в справності обладнання: перевірити цілісність корпусу, з'єднань, фільтрів, відсутність витоків або сторонніх запахів. Робоче місце має бути обладнане витяжною вентиляцією або ламінарною шафою для запобігання поширенню аерозолів.

Під час роботи з інокулятором обов'язковим є використання засобів індивідуального захисту. Працівник повинен бути одягнений у лабораторний халат або комбінезон, захисну шапочку та змінне взуття. Обов'язковими є одноразові рукавички, які необхідно змінювати після кожної критичної операції. Для захисту дихальних шляхів і очей застосовуються маски (респіратори класу FFP2 або FFP3) та захисні окуляри або щиток. У разі

роботи з патогенними мікроорганізмами використовуються засоби захисту підвищеного рівня відповідно до вимог біологічної безпеки.

Експлуатація апарату має здійснюватися відповідно до інструкцій. Забороняється відкривати кришки, знімати трубопроводи або втручатися в роботу пристрою під час його роботи або під тиском. Після завершення процесу необхідно повністю зупинити обладнання, провести дезінфекцію внутрішніх поверхонь та зовнішніх елементів, а також безпечно утилізувати всі залишки біологічного матеріалу [40].

Приміщення, в якому працює інокулятор, повинне відповідати санітарно-гігієнічним нормам.

Особливу увагу слід приділяти профілактиці аварійних ситуацій. У разі розливу біологічного матеріалу або виходу обладнання з ладу працівник зобов'язаний негайно зупинити роботу, повідомити відповідальну особу, ізолювати зону та провести дезінфекцію відповідно до затвердженої інструкції. У приміщенні має бути наявний аварійний комплект — дезінфектанти, абсорбенти, захисні пакети та засоби для збору забруднених матеріалів.

Постійне дотримання правил особистої гігієни також є важливою складовою безпеки. Працівникам забороняється вживати їжу або напої, зберігати особисті речі в лабораторії, а також торкатися обличчя під час роботи з мікроорганізмами. Обов'язковим є регулярне миття рук до і після кожного етапу [40].

Усі відходи, що утворюються в процесі роботи з , умовно поділяються на кілька груп: рідкі та тверді біологічні відходи (залишки культур мікроорганізмів, використані живильні середовища, фільтри, інструменти), хімічні реагенти (дезінфікуючі розчини, залишки стерилізаційних агентів) і допоміжні матеріали (одноразовий лабораторний посуд, ЗІЗ). Біологічні відходи перед утилізацією підлягають обов'язковому знезараженню: автоклавуванню при температурі не нижче 121 °C протягом щонайменше 20

хвилин або обробці дезінфікуючими засобами з підтвердженою біоцидною ефективністю (наприклад, 1–2% розчин гіпохлориту натрію, 70% етанол, розчини на основі ЧАС). Тільки після знезараження такі відходи можуть бути передані на централізовану утилізацію спеціалізованими ліцензованими організаціями.

Для рідких відходів передбачене тимчасове накопичення у спеціально маркованих контейнерах із герметичними кришками, які захищають від викиду парів та мікроорганізмів у повітря. Злив рідких біологічних залишків у каналізаційну мережу категорично заборонений без попереднього знезараження. Аналогічні правила діють для фільтрів повітря та повітроводів, які можуть накопичувати біоаерозолі — після відпрацювання ресурсу вони мають демонтуватися в умовах біобокса, поміщатись у герметичну тару та знезаражуватись.

Окрім технічних заходів, важливою складовою екологічного контролю є ведення відповідної документації — журналів обліку утворених відходів, актів знезараження, маршрутних листів утилізації, а також проведення внутрішнього аудиту екологічної безпеки не рідше ніж раз на рік. Це дозволяє вчасно виявляти порушення, запобігати неконтрольованому впливу на довкілля та підтримувати екологічну відповідальність виробництва [41].

ВИСНОВКИ

У дипломному проєкті розроблено та обґрунтовано біотехнологічну схему отримання β-аланіну шляхом мікробного синтезу із застосуванням генетично модифікованого штаму *Escherichia coli*.

1. Обґрунтовано доцільність використання штаму *E. coli B0016-080BB* як продуцента β-аланіну, який характеризується високим рівнем біосинтетичної активності та стабільністю у процесі ферментації.

2. На основі морфолого-фізіологічних досліджень встановлено оптимальні параметри культивування: температура – 37–38 °C, pH – 7,0–7,2, аерація – не менше 0,8 м³ повітря на 1 м³ культуральної рідини.

3. Побудовано та описано повну технологічну схему виробництва β-аланіну з етапами підготовки живильного середовища, ферментації, очищення та таблетування готового продукту.

4. Визначено біохімічні шляхи синтезу β-аланіну в клітині, зокрема реакції декарбоксилювання аспартату, що каталізуються ферментом панD, та окреслено шляхи генетичної оптимізації для підвищення виходу продукту.

5. Розглянуто процес виробництва твердих лікарських форм (таблеток): описані етапи змішування β-аланіну з допоміжними речовинами, пресування таблеток, пакування, маркування та контроль якості згідно з вимогами Державної фармакопеї України.

6. Проведено повний техніко-технологічний розрахунок інокулятора для культивування E. coli, включаючи геометричні параметри апарата, потужність мішалки, теплове навантаження та площу теплообміну.

7. Сформульовано вимоги охорони праці при роботі з інокулятором: розроблено перелік необхідних засобів індивідуального захисту (ЗІЗ), наведено правила поводження з біологічними агентами, описано дії у разі аварійної ситуації. Акцентовано на важливості попереднього інструктажу та навчання персоналу.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Краснопольский Ю. М., Клещев Н. Ф. Фармацевтична біотехнологія: Виробництво біологічно активних речовин. Харків : НТУ «ХПІ», 2013. 192 с.

2. Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics. In: *Escherichia coli - Old and New Insights*. IntechOpen, 2022. Chapter 1. Веб-сайт . URL: https://www.intechopen.com/chapters/84764 (дата звернення: 27.02.2025).

3. Organismus: Escherichia coli – Biologie // Vetpharm – Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, Universität Zürich.

4. Сергійчук М., Позур В., Фурзікова Т. Мікробіологія : підручник. Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2008. 541 с.

5. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», Державна Фармакопея України, 1-е вид. Харків: РІРЕГ, 2008

6. Gordon M. D., Cowling A. The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects // Microbiology. – 2003. – Vol. 149, No. 12. – С. 3575–3586. – Веб-сайт . URL: https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/149/12/mic1493575.pdf (дата звернення: 02.03.2025).

7. Advances in the synthesis of β-alanine // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – Веб-сайт. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10639138/ (дата звернення: 04.03.2025).

8. Liu, L., et al. (2020). Microbial production of β-alanine from renewable resources. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 47(3), 271-280

9. Zhang X., Wang Y., Li H. Method for synthesizing beta-alanine by biological catalysis: пат. CN102851333A. – 2013. – Веб-сайт. – URL: https://patents.google.com/patent/CN102851333A/en (дата звернення: 01.05.2025).

10. Ryu, H., & Kim, J. (2019). Recent advances in microbial fermentation for β-alanine production. Biotechnology Letters, 41(1), 1-11.

11. Song, L., et al. (2016). High-yield production of β-alanine in engineered Escherichia coli. Metabolic Engineering, 37, 1-10.

12. Zhao, Q., & Xu, P. (2018). Optimization of fermentation conditions for the microbial production of β-alanine. Bioprocess and Biosystems Engineering, 41(5), 663-674

13. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с. : іл. 4, табл. 21, бібліогр. 130 назв.

14. Beta-Alanine // PubChem, National Center for Biotechnology Information. – Веб-сайт. – URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/239#section=2D-Structure (дата звернення: 21.03.2025).

15. М. В. Стасевич, Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості: підручник (для вищ. навч. закл.). Львів: “Новий світ-2000,” 2016.

16. Blattner F. R., Plunkett G. III, Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12 // Science. – 1997. – Vol. 277, No. 5331. – C. 1453–1462.

17. Escherichia coli as a host for metabolic engineering. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29689382/ (дата звернення: 03.04.2025).

18. M. Niersbach, F. Kreuzaler, R. H. Geerse, P. W. Postma, and H. J. Hirsch, “Cloning and nucleotide sequence of the Escherichia coli K-12 ppsA gene, encoding PEP synthase,” MGG Mol. Gen. Genet., vol. 231, no. 2, pp. 332–336, 1992

19. Jian X., Zhou L., Meng Y. Novel Mode Engineering for β-Alanine Production in Escherichia coli with the Guide of Adaptive Laboratory Evolution. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education. 2021. URL: https://www.mdpi.com/2076-2607/9/3/600 (дата звернення: 19.04.2025).

20. Ko Y.-S., Kim J. W., Lee J. A., Han T., Kim G. B., Park J. E., Lee S. Y. Systematic engineering of the rate-limiting step of β-alanine biosynthesis in Escherichia coli // Electronic Journal of Biotechnology. – 2021. – Vol. 50. – С. 1–7. – Веб-сайт. – URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345821000105 (дата звернення: 07.05.2025).

21. Сергійчук М., Позур В., Фурзікова Т. Мікробіологія : підручник. Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2008. 541 с.

22. L. Guo et al., “Enhancing tryptophan production by balancing precursors in Escherichia coli,” Biotechnol. Bioeng., vol. 119, no. 3, pp. 983–993, 2022, doi: 10.1002/bit.28019.

23. J. Wang, L. K. Cheng, J. Wang, Q. Liu, T. Shen, and N. Chen, “Genetic engineering of Escherichia coli to enhance production of L-tryptophan,” Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 97, no. 17, pp. 7587–7596, 2013, doi: 10.1007/s00253-013-5026-3.

24. L. Chen, M. Chen, C. Ma, and A. P. Zeng, “Discovery of feed-forward regulation in L-tryptophan biosynthesis and its use in metabolic engineering of E. coli for efficient tryptophan bioproduction,” Metab. Eng., vol. 47, pp. 434–444, 2018, doi: 10.1016/j.ymben.2018.05.001

25. G. A. Sprenger, “From scratch to value: Engineering Escherichia coli wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate,” Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 75, no. 4, pp. 739–749, 2007, doi: 10.1007/s00253-007-0931-y.

26. Lingna Tian 1,2, Daiwei Wang 2, Yueying Liu 2, Mingjie Wei 2, Xuexue Han 2, Xiaomei Sun 1, Liang Yin 2 and Guanghong Luo 1,2 « Construction of Genetically Engineered Escherichia coli Cell Factory for Enhanced Cadmium Bioaccumulation in Wastewater »

27. Kang, H., & Zhang, W. (2020). Engineering microbial strains for the production of β-alanine: A comprehensive review. Frontiers in Microbiology, 11, 1556.

28. Алгоритм практичної навички «Приготування дезінфікуючих розчинів» // Алгоритми виконання практичних навичок. Навчальний посібник. – Веб-сайт. – URL: http://akusherstvo.ltd.ua/files/Algorytmy_2015/assets/basic-html/page23.html (дата звернення: 24.04.2025).

29. Madzak C. Engineering Yarrowia lipolytica for Use in Biotechnological Applications: A Review of Major Achievements and Recent Innovations. Mol. Biotechnol. 2018. Vol. 60, № 8. P. 621–635.

30. Бульон LB Broth (Lennox). Веб-сайт. URL: https://micro-lab.org/wp-content/uploads/1231-bulon-LB.pdf (дата звернення: 26.04.2025).

31. Стасевич М.В. Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв: навч. Посібник для студ. вищ. навч. заклад./ М.В. Стасевич, А.О. Миланич, І.О. Гузьова; за ред. В.Н. Новікова. – Вінниця: Нова Книга, 2012.-408с.

32. Сидоров Ю., Влязло Р., Новіков В. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості / Інтедект-Захід. 2008. 737 с.

33. Соколов В.Н., Яблокова М.А. Апаратура мікробіологічної промисловості. – Л.: Машинобудування. Ленінградське відділення, 1988. – 278 с.

34. Основи проєктування хімічних виробництв : підручник для закладів вищої освіти / за ред. А. І. Михайличенка. – Київ : ІКЦ «Академкнига», 2010. – 371 с.

35. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. / Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002.

36. Jong An Lee, Sang Yup Lee, in Comprehensive Biotechnology (Third Edition), 2019.

37. Стренк Ф. Перемішування й апарати з мішалками / Ф. Стренк ; пер. з польськ. під ред. І. А. Шупляка. – Л. : Хімія, 1975. – 384 с.

38. Електродвигун трифазний ABB M3BP 90 SLC6 0,75 кВт 1000 об/хв Веб-сайт. – URL: https://ovk.ua/ua/shop/product/elektrodvigatel-trehfaznyi-abb-m3bp-90-slc6-075-kvt-1000-ob-min (дата звернення: 15.05.2025).

39. Калунянц К. А., Голгер Л. І., Балашов В. Є. Обладнання мікробіологічних виробництв. – М. : Агропромиздат, 1987. – 398 с.

40. Пряников А. І., Родіонова А. І. Техніка безпеки і виробнича санітарія : довідник для працівників хімічної промисловості. У двох томах. Т. 2. Виробнича санітарія. – М. : Хімія, 1979. – 320 с.

41. Петрова М. С., Петров С. В., Вольхін С. М. Охорона праці на виробництві та в навчальному процесі. – М. : [б. в.], 2006. – 344 с.

42. "Визначник бактерій Берджі"; У 2 томах. Ред. Хоулт, Дж.; Крік, Н.; Сніт, П. та ін.; Видавництво: М.: Мир, 1997 р. – С. 210–224.