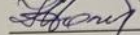


НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ  
СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри



Наталія ГОЛУБ

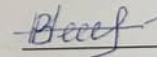
«    »

2023 р.

Дипломний проєкт  
на здобуття ступеня бакалавра  
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»  
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
на тему: «Технологія виробництва кормового концентрату лізину. Дільниця  
культивування»

Виконала:

студентка IV курсу, групи БМ-91  
Ворона Анастасія Віталіївна



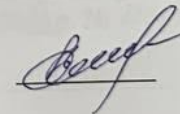
Керівник:

Доцент кафедри біоенергетики, біоінформатики  
та екобіотехнології, к.т.н., с.н.с.  
Маринченко Лоліта Вікторівна



Консультант з проєктування:

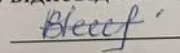
Професор кафедри біоенергетики, біоінформатики  
та екобіотехнології, д.т.н., професор  
Саблій Лариса Андріївна



Рецензент:

Доцент кафедри промислової біотехнології  
та біофармації, к.б.н.  
Дзигун Лариса Петрівна



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

Київ – 2023 року

Національний технічний університет України «Київський політехнічний  
інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

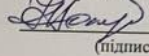
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри



(підпис)

Наталія ГОЛУБ

(ім'я прізвище)

«    »                      2023 р.

**ЗАВДАННЯ**

на дипломний проєкт студентці

**Вороні Анастасії Віталіївні**

1. Тема проєкту «Технологія виробництва кормового концентрату лізину. Дільниця культивування», керівник проєкту доцент КББЕ, к.т.н., с.н.с. Маринченко Лоліта Вікторівна, затверджені наказом по університету від «22» Травня 2022 р. № 1888-с

2. Термін подання студентом проєкту 05.06.2023

3. Зміст пояснювальної записки:

- провести аналіз наукових літературних даних щодо досягнень у біотехнології отримання лізину;



- розглянути методи отримання промислових штамів та обґрунтувати вибір ефективного продуцента, провести аналіз його морфолого-фізіологічних та культуральних особливостей;

- розробити та описати ефективну технологію виробництва кормового концентрату лізину згідно з необхідними розділами дипломного проєкту, визначити процедури контролю якості виробництва;

- виконати креслення технологічної та апаратурної схеми для виробництва препарату кормового концентрату лізину;
- здійснити технологічний, тепловий та конструктивний розрахунки ферментера та виконати креслення вибраного ферментера для проведення біосинтезу та отримання якісного продукту;
- описати заходи з охорони праці для розробленого виробництва.

4. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1, креслення загального виду ферментера – 1 арк. А1, презентація на захист.

5. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Графічна частина дипломного проєкту (проєктування)	д.т.н., проф. Саблій Л.А.		

6. Дата видачі завдання 17 квітня 2023 р.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1	Провести аналіз наукових літературних даних щодо досягнень у біотехнології отримання лізину	30.04.2023 р.	<i>Виконано</i>
2	Розглянути методи отримання промислових штамів та обґрунтувати вибір ефективного продуцента, провести аналіз його	30.05.2023 р.	<i>Виконано</i>

	морфолого-фізіологічних та культуральних особливостей		
3	Розробити та описати ефективну технологію виробництва кормового концентрату лізину згідно з необхідними розділами дипломного проєкту, визначити процедури контролю якості виробництва	07.05.2023 р.	Виконано
4	Виконати креслення технологічної та апаратурної схеми для виробництва препарату кормового концентрату лізину	14.05.2023 р.	Виконано
5	Здійснити технологічний, тепловий та конструктивний розрахунки ферментера та виконати креслення вибраного ферментера для проведення біосинтезу та отримання якісного продукту	21.05.2023 р.	Виконано
6	Описати заходи з охорони праці для розробленого виробництва	29.05.2023 р.	Виконано
7	Оформити пояснювальну записку, підготувати презентацію	01.06.2023 р.	Виконано


Студент



Анастасія ВОРОНА

(підпис)

Керівник проєкту



Лоліта МАРИНЧЕНКО

(підпис)

## ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проект	2	
2	A4	ДП БМ91. 02.000 ПЗ	Пояснювальна записка	82	
3	A1	ДП БМ91. 02.001 ТС	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП БМ91. 02.002 АС	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП БМ91. 02.003 А	Креслення основної споруди (апарата)	1	

				ДП БМ91 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Ворона А.В,			Відомість дипломного проекту	Лист	Листів
Керівн.	Маринченко Л.В.				1	1
Консульт.					«КПІ ім. Ігоря Сікорського» ФБТ, КББЕ гр. БМ-91	
Н/контр.						
Зав. каф.	Голуб Н.Б.					

**Пояснювальна записка**  
**до дипломного проєкту**  
**на тему: «Технологія виробництва кормового концентрату лізину.**  
**Дільниця культивування»**

Київ – 2023 року

## РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт містить с., рис., табл., схему, посилання.

Ця робота присвячена розробці технології виробництва кормового концентрату лізину та його біосинтезу з використанням штаму *C. glutamicum* АТСС 13032. Обрано цей штам, оскільки він має високу генетичну дослідженість, що дозволяє генетично модифікувати його для підвищення виходу синтезованої амінокислоти.

У роботі розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва, вибрано ефективне обладнання для біосинтезу та проведено розрахунки ферментера.

Результатом є екологічно та гігієнічно безпечна технологія виробництва кормового концентрату лізину, що відповідає нормам безпеки та охорони праці.

КЛЮЧОВІ СЛОВА : КОРМОВИЙ КОНЦЕНТРАТ ЛІЗИНУ, ПРОДУЦЕНТ, *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*, СУПЕРПРОДУКУВАННЯ, ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ, ФЕРМЕНТЕР.

ДП БМ91. 02.000 ПЗ

Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Ворона А.В.				РЕФЕРАТ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.							6	82
Реценз.						НТУУ "КПІ ім. Ігоря Сікорського" ФБТ		
Н. Контр.	Маринченко Л.В.							
Затверд.								

## ABSTRACT

The diploma project consists of pages, figures, tables, diagrams, and references.

This work is dedicated to the development of a technology for the production of lysine feed concentrate and its biosynthesis using the strain *C. glutamicum* ATCC 13032. This particular strain was chosen due to its high genetic researchability, which allows for genetic modification to enhance the yield of the synthesized amino acid.

In this project, a technological and equipment scheme for production has been developed, and efficient equipment for biosynthesis has been selected. Calculations for the fermenter have been conducted.

The result is an environmentally and hygienically safe technology for the production of lysine feed concentrate that complies with safety and occupational health standards.

**KEYWORDS:** LYSINE FEED CONCENTRATE, PRODUCER, CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM, OVERPRODUCTION, INDUSTRIAL BIOSYNTHESIS, FERMENTER.

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Ворона А.В.</i>			<i>ABSTRACT</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>							7	82
<i>Реценз.</i>						<i>НТУУ "КПІ ім. Ігоря Сікорського" ФБТ</i>		
<i>Н. Контр.</i>		<i>Маринченко Л.В.</i>						
<i>Затверд.</i>								

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	39
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	41
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ .....	41
1.1 Характеристика сировини.....	41
1.2. Обґрунтування вибору технології.....	44
1.3 Методи створення високопродуктивного промислового продуценту .....	48
1.4. Характеристика біологічного агента .....	54
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ .....	59
2.1. Схема перебігу процесів .....	59
2.2. Характеристика кінцевого продукту .....	64
РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА .....	71
3.1. Матеріали основні і допоміжні .....	71
3.2. Контроль виробництва .....	72
3.3. Матеріальний баланс .....	76
3.4. Опис технологічного процесу .....	79
РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЛАДНАННЯ .....	88
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ .....	100
ВИСНОВКИ .....	107
ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

*ДП БМ91. 02.000 ПЗ*

Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ворона А.В.			<i>ЗМІСТ</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.							8	82
Реценз.						<i>НТУУ "КПІ ім. Ігоря Сікорського" ФБТ</i>		
Н. Контр.		Маринченко Л.В.						
Затверд.								

## СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

DO — розчинений кисень (Dissolved Oxygen)

OTR — швидкість передачі кисню (Oxygen Transfer Rate)

АК — амінокислота

ASADH — L-аспартат-β-семіальдегід-дегідрогеназа (L-Aspartate β-semialdehyde dehydrogenase)

DHDPS — дігідропіримидиновий дегідрогеназний комплекс, субодиниця А (Dihydrodipicolinate synthase, subunit A)

DHDPR — дігідропіримидиновий дегідрогеназний комплекс, субодиниця В (Dihydrodipicolinate synthase, subunit B)

DAPDH — діамінопімелатдегідрогеназа (Diaminopimelate dehydrogenase).

DAPDC — діамінопімелат дегідраза (Diaminopimelate decarboxylase).

lysP — ген, кодує протон-лізиновий антипорт (Lysine-proton antiporter)

lysG — ген, кодує фосфотрансацетилазу лізину (Lysine phosphotransacetylase)

CRISPRi — CRISPR-інтерференція (CRISPR interference)

## ВСТУП

**Актуальність.** Амінокислоти широко застосовують у різних галузях, таких як харчова промисловість, сільське господарство, фармацевтична та інші сфери. Особливо важливими є незамінні амінокислоти, зокрема лізин, які можуть використовуватись для збагачення рослинних харчових продуктів, з метою підвищення їх харчової цінності та забезпечення балансу.

Найширше застосування амінокислоти отримали у сфері тваринництва, оскільки важливим фактором є збалансованість кормів з точки зору амінокислотного складу. Це має значний вплив на ефективність кормів, зокрема на показник витрат корму на одиницю продукції. Наприклад, додавання незамінних амінокислот до кормів може допомогти знизити витрати на корми від 1,65 до 2,55 разів. В даний час додавання лізину до кормів для тварин сільськогосподарського сектору досить поширене. Це застосовується для збагачення кормів, призначених для молодняка тварин, таких як свині, кури, птиця та великої рогатої худоби. Це покращує швидкість росту тварин і птиці, покращує якість м'яса, а у випадку овець покращується якість і кількість вовни. Тому виробництво кормових концентратів на основі лізину є актуальним [1].

Враховуючи відсутність виробництва кормового концентрату лізину в Україні, власне виробництво є надзвичайно актуальним. Це необхідно для забезпечення внутрішнього ринку, зниження залежності від імпорту та економічних переваг. Розвиток власного виробництва сприятиме створенню нових робочих місць та підтримці аграрного сектора. Крім того, власне виробництво гарантуватиме контроль якості продукції.

ДП БМ91. 02.000 ПЗ

Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ворона А.В.			ВСТУП	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.							10	82
Реценз.						НТУУ "КПІ ім. Ігоря Сікорського" ФБТ		
Н. Контр.		Маринченко Л.В.						
Затверд.								

**Метою** даної роботи є розроблення проекту технології кормового концентрату лізину на основі сучасних досягнень.

У зв'язку з визначеною метою-було поставлено такі **завдання**:

- провести аналіз наукових літературних даних щодо досягнень у біотехнології отримання лізину;
- розглянути методи отримання промислових штамів та обґрунтувати вибір ефективного продуцента, провести аналіз його морфолого-фізіологічних та культуральних особливостей;
- розробити та описати ефективну технологію виробництва кормового концентрату лізину згідно з необхідними розділами дипломного проекту, визначити процедури контролю якості виробництва;
- виконати креслення технологічної та апаратурної схеми для виробництва препарату кормового концентрату лізину;
- здійснити технологічний, тепловий та конструктивний розрахунки ферментера та виконати креслення вибраного ферментеру для проведення біосинтезу та отримання якісного продукту;
- описати заходи з охорони праці для розробленого виробництва.

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм..</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		11

## ОСНОВНА ЧАСТИНА

### РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ

#### 1.1 Характеристика сировини

Головною сировиною для виробництва кормового лізину є меляса. Меляса бурякова (патока) - залишки цукробурякового виробництва, являє собою густу непрозору рідину від коричневого до темно-бурого кольору, з запахом, властивим буряковій мелясі, з солодким смаком із гіркуватим присмаком, має повну розчинність в гарячій і холодній воді [2].



Рис.1.1 Меляса [3]

Меляса бурякова широко застосовується як сировина у біотехнологіях:

- для відгодівлі сільськогосподарських тварин;
- для виробництва дріжджів;
- для виробництва спирту, для виготовлення біоетанолу;
- для виробництва кондитерської продукції [2].

*ДП БМ91. 02.000 ПЗ*

Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Ворона А.В.				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.							12	82
Реценз.						НТУУ "КПІ ім. Ігоря Сікорського" ФБТ		
Н. Контр.	Маринченко Л.В.							
Затверд								

Згідно з Державними стандартами України (ДСТУ), меляса являє собою продукт, що отримується в результаті переробки різних сировин, таких як цукровий буряк, цукровий тростник, сиропи та інші. ДСТУ встановлює стандарти якості для меляси, вказуючи на необхідні показники, які повинні відповідати нормам. Ці показники (табл. 1.1 – табл. 1.3) включають хімічний склад, фізичні характеристики, кольорові показники та інші параметри, які визначають якість та придатність меляси для використання у різних промислових галузях [4].

Таблиця — 1.1 Органолептичні показники

Назва показника	Характеристика
Зовнішній вигляд	Густа в'язка непрозора рідина
Колір	Від коричневого до темно-бурого
Запах	Властивий буряковоцукровій мелясі без стороннього запаху
Смак	Солодкий з гіркуватим присмаком
Розчинність у воді	Повна, розчиняється у будь-яких співвідношеннях у гарячій і холодній воді

Таблиця — 1.2 Фізико-хімічні показники

Назва показника	Норма
Масова частка сухих речовин, %, не менше	75,0
Масова частка сахарози, %, не менше	43,0
Масова частка суми цукрів, що зброджуються, %, не менше	44,0
Величина рН	6,5 - 8,5

Таблиця — 1.3 Мікробіологічні показники

Назва показника	Норма

Загальна кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів, КУО в 1 г, не більше	1,0x10 <sup>5</sup>
Плісняві гриби, КУО в 1 г, не більше	1,5x10 <sup>4</sup>

Мелясу зберігають та транспортують партіями. Партією вважають кількість однорідної за показниками якості бурякової меляси в одній або декількох відвантажених в одну адресу цистернах, масою не більше 300 т. Кожна партія бурякової меляси (під час відвантаження залізничним транспортом - кожна цистерна, що входить у партію) повинна бути оформлена одним документом про якість, для сертифікованої продукції - сертифікатом відповідності [4].

#### Можливі наслідки впливу на навколишнє середовище

**Забруднення водних ресурсів.** Виробництво меляси може супроводжуватися використанням великих обсягів води, а також відходів із високим вмістом органічних речовин і хімічних речовин. Якщо ці відходи не належним чином очищені перед скиданням, вони можуть забруднити водні джерела, спричинити зменшення якості води та вплинути на екосистеми водойм.

**Викиди парникових газів.** Під час ферментаційного процесу для виробництва меляси можуть утворюватися парникові гази, такі як вуглекислий газ (CO<sub>2</sub>) та метан (CH<sub>4</sub>). Ці гази мають потенціал впливу на зміну клімату та сприяють глобальному потеплінню.

**Загроза біорізноманіттю.** Зміни у використанні земель для вирощування сировини, такої як цукровий тростник, можуть мати наслідки для біорізноманіття. Наприклад, використання великих площ земель для монокультур може призводити до втрати природних середовищ і зменшення різноманіття рослин і тварин.

Використання хімічних речовин. В процесі виробництва меляси можуть використовуватися хімічні речовини, такі як пестициди або добрива, які можуть мати негативний вплив на ґрунт і навколишнє середовище, якщо не використовуються належним чином або якщо їх розсіюють неконтрольовано [5, 6, 7].

## 1.2. Обґрунтування вибору технології

Один з методів переробки сировини для виробництва L-лізину – це біотехнологічний процес з використанням мікроорганізмів, зокрема *Corynebacterium glutamicum*. Цей метод полягає у ферментації сировини за умов наявності відповідних мікроорганізмів і поживних середовищ.

Процес виробництва L-лізину розпочинається з вибору підходящого штаму мікроорганізмів, такого як *Corynebacterium glutamicum*, який має здатність ефективно синтезувати L-лізин. Сировина, така як глюкоза або крохмаль, може слугувати джерелом вуглеводів для мікроорганізмів.

Процес ферментації відбувається у ферментерах де сировина і мікроорганізми підтримуються у сприятливих умовах для росту та розмноження. У цьому процесі мікроорганізми використовують вуглеводи з сировини як джерело енергії.

Після завершення ферментації отримана культуральна рідина піддається подальшим процесам очищення та концентрування, щоб отримати чистий продукт – L-лізин. Це може включати в себе фільтрацію, випарювання, кристалізацію та інші методи очищення. Остаточний продукт зазвичай переходить через процеси сушіння і мелювання, після чого готовий L-лізин може бути упакований і готовий для використання в харчовій або кормовій промисловості [8].

Взагалі існує кілька способів отримання L-лізину, які розглянуті в дослідженні [9].

Один з методів – хімічний метод – включає хімічний синтез L-лізину з циклогексанону. Цей процес включає розчинення рацемату (рацемічної

									Арк.
									15
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				

суміші) та L-винної кислоти, де солі D-лізину та винної кислоти є менш розчинними. Після розчинення відбувається руйнування солей, L-винна кислота видаляється з L-лізину за допомогою іонного обміну на колонці, а D-лізин рацемізується.

Інший метод – комбінований або хіміко-ензиматичний метод – був запропонований компанією "ТоуоRayон" («Тогаї») в 70-х роках минулого століття. Цей метод поєднує органічний синтез D,L-α-аміно-ε-капролактаму з циклогексанону з подальшим ферментативним гідролізом. У цьому процесі використовуються два ферменти – L-гідролаза та D-рацемаза. L-гідролаза гідролізує D,L-α-аміно-ε-капролактаму, утворюючи L-лізин і D-α-аміно-ε-капролактаму. Далі D-α-аміно-ε-капролактаму піддається рацемізації за допомогою D-α-аміно-ε-капролактаму-рацемази.

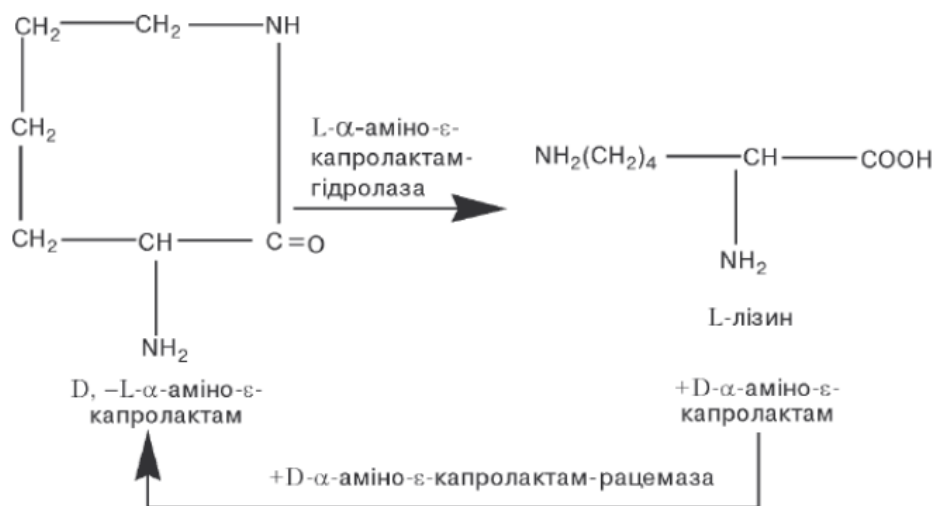


Рис. 1.2 Комбінований або хіміко-ензиматичний метод [9]

Штами дріжджів роду *Cryptococcus*, *Candidia* та *Trichosporon* є продуцентами гідролази L-α-аміно-ε-капролактаму, тоді як двовалентні іони марганцю та цинку є активаторами цього ферменту. Фермент рацемазу D-α-аміно-ε-капролактаму можна отримати шляхом культивування бактерій родів, таких як *Achromobacter*, *Flavobacterium* та ін. Обидва ферменти, що використовуються у цій технології, іммобілізовані методом

адсорбції на іонообмінному цукрі.

Мікробіологічний метод є переважним у всьому світі для отримання кормового лізину. Перші компанії, що виробляли лізин за допомогою мікроорганізмів, з'явилися в Японії в середині 50-х років минулого століття. Франція заснувала велику промислову компанію під назвою "Eurolysine" для виробництва цієї амінокислоти.

Мікроорганізми синтезують L-лізин двома основними способами. Мікрододорості, гриби та дріжджі синтезують лізин через  $\alpha$ -кетоглутарову кислоту за допомогою  $\alpha$ -аміноадипінової кислоти – шляху аміноадіпінату (АА). Регуляція активності ферментів на цьому шляху ще недостатньо вивчена, тому мутантні форми, здатні до надсинтезу лізину, ще не були отримані серед цих мікроорганізмів.

Бактерії, вищі рослини та деякі водорості синтезують лізин через  $\alpha$ -діамінопімелінову кислоту – шлях діамінопімелінового (ДАП), який починається з аспарагінової кислоти. Крім лізину, з аспарагінової кислоти утворюються інші незамінні амінокислоти, такі як метіонін, треонін та ізолейцин. Глутамат-продукуючі коринебактерії *Corynebacterium glutamicum* та *Brevibacterium flavum* є продуцентами лізину і мають мутантні форми, які здатні до надсинтезу L-лізину.

									Арк.
									17
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				



Рис. 1.3 Схема біосинтезу лізину [9]

У 50-х роках минулого століття, японські вчені використали мутагенез (ультрафіолетове світло) для отримання суперпродуцента лізину шляхом дії на суспензію бактеріальних клітин *Micrococcus glutamicus*. У 1964 році Радянський Союз придбав цього супервиробника лізину [9].

Технологічна послідовність процесу виробництва лізину за мікробіологічним шляхом включає такі етапи:

1. Приготування посівного матеріалу.
2. Приготування та стерилізація живильного середовища, апаратури та комунікацій.
3. Культивування продуцента у промислових ферментерах (ферментація).
4. Виділення цільового продукту (L-лізину).

Культивування продуцентів та біосинтез лізину відбувається у ферментерах об'ємом 50, 63 та 100 м<sup>3</sup>. Після ферментації готова культуральна рідина містить, окрім лізину, інші метаболічні продукти, біомасу продуцента та залишки живильного середовища. Вміст сухої

речовини в культуральній рідині становить 10-13%, включаючи 2-3% лізину та 0,8-1,8% бактеріальної біомаси.

Залежно від призначення, з культуральної рідини можна отримати різні препаративні форми лізину: рідкий концентрат лізину (РКЛ), сухий кормовий концентрат лізину (ККЛ), а також висококонцентровані кормові та високоочищені кристалічні препарати для харчової та медичної промисловості.

Рідкий концентрат лізину отримують шляхом стабілізації культуральної рідини без відокремлення біомаси продуцента та подальшого вакуум-випарювання до 35-40% сухих речовин. Вміст лізину в ньому становить 7-12%.

Сухий кормовий концентрат лізину отримують шляхом зневоднення рідкого концентрату. Він містить лізину від 10 до 20%, залежно від використання наповнювачів [9].

### **1.3 Методи створення високопродуктивного промислового продуценту**

Добір промислових продуцентів може бути розподілений на природний та штучний способи. Природний добір базується на властивостях видів зберігати корисні спадкові ознаки та вибирати відшкодування шкідливих. Цей процес приводить до поступової пристосованості наступних поколінь до навколишнього середовища.

Природний добір промислових продуцентів полягає у відборі певних видів мікроорганізмів, які зазвичай виділяються з біоценозу за допомогою спеціальних середовищ, що сприяють накопичуванню культур. На наступному етапі отримують чисті культури, використовуючи поживні середовища, на які засівають зразки з накопичувальних культур. Шляхом пересіву окремих клітин утворюються ізольовані колонії на щільних середовищах, з яких далі отримують чисті культури, складені з популяцій клітин одного виду.

Штучний добір є першим історичним методом селекції. Для його

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		19

здійснення відбирають види зі специфічними властивостями, які є цікавими для людини, та розмножують для подальшого покращення. З кожним поколінням корисні властивості покращуються та стають більш виразними. При цьому для кожного мікроорганізму встановлюються оптимальні умови для розмноження культур [10].

Мутагени можна поділити на фізичні, хімічні та біологічні залежно від їх природи. Вибір мутагена залежить від двох факторів: типу мутації, яку потрібно отримати та ефективності мутагена щодо конкретного мікроорганізму.

Фізичні агенти включають УФ-випромінювання та радіацію. УФ-випромінювання спричиняє димеризацію піримідинів і є мутагеном з широким спектром дії. Його використання призводить до виникнення мутацій з транзиціями, трансверсіями та делеціями. Ефективність УФ-випромінювання висока, але виживають дуже малі кількості клітин, що призводить до високої частоти мутацій. Крім того, такі мутації добре відновлюються репараційними механізмами клітин. Рентгенівське випромінювання та швидкі нейтрони призводять до розривів хромосом, делецій та інверсій. Мутагенний ефект цих методів також високий, але їх застосування вимагає спеціального обладнання [11].

Хімічні мутагени були більш широко використовувані. Серед них є аналоги основ, азотиста кислота, нітрозогуанідин (НГ), етилметансульфонат (ЕМС), акридинові барвники та інші. Аналоги основ спричиняють транзиції та трансверсії під час реплікації, але їх ефективність дуже низька. Гідроксиламін та азотиста кислота, що викликають дезамінування нуклеотидів, можуть призводити до делецій та транзицій. Акридинові барвники спричиняють інтеркаляцію між основами під час реплікації та сприяють виникненню мутацій з зсувом рамки зчитування. Найбільш ефективними серед хімічних агентів є нітрозогуанідин (НГ), який створює алкілування основ в реплікативній вилці та формує мутанти з

транзиціями, трансверсіями та делеціями. Етилметансульфонат, порівняно з НГ, викликає менше множинних мутацій і сприяє алкілуванню гуаніну, що призводить до утворення транзицій та трансверсій з високою частотою [12].

Огляд методів створення високопродуктивного штаму *C. glutamicum* [13]

1. Традиційний мутагенез для створення штамів L-лізину в *C. glutamicum* включає обробку клітин мутагенними речовинами, що пошкоджують ДНК, та відбір клітин з певними фенотипами на спеціальному середовищі для підвищення продуктивності L-лізину. Мутанти, що нечутливі до інгібіторного впливу L-треоніну та L-лізину на фермент АК, можуть бути відібрані, наприклад, за допомогою мутагенезу та відбору мутантів, стійких до структурного аналога L-лізину (АЕС). Крім того, комбінація ауксотрофних штамів до гомосерину зі стійкістю до АЕС може призводити до промислових штамів L-лізину за наявності дефіциту гомосериндегідрогенази та АК. Також відсутність певних ферментів, таких як піруваткиназа, фосфоенолпіруваткарбоксихиназа, ізоцитратдегідрогеназа або цитратсинтаза, може поліпшити продуктивність L-лізину шляхом забезпечення більшого постачання оксалоацетату або пірувату як прекурсорів. Незважаючи на досягнення в отриманні промислових штамів L-лізину, небажані мутації в геномі залишаються неминучими.

2. Геномна селекція забезпечує створення більш ефективних і стійких продуцентів L-лізину шляхом порівняння геномів промислових та диких штамів, виявлення корисних мутацій у синтезі L-лізину та їх введення у дикий штам. Проаналізувавши мутації у *C. glutamicum* В-6, були ідентифіковані ключові мутації, що покращують виробництво L-лізину. Ці мутації раціонально введено в дикий штам АТСС13032, щоб отримати мінімальний мутантний штам, наприклад АГМ-5 і АНР-3, з вищою швидкістю росту і толерантністю, що поліпшують продуктивність. Геномна

селекція усуває небажані мутації традиційного мутагенезу, зберігаючи стійкість диких штамів і сприяє поліпшенню продуктивності та зниженню витрат у виробництві.

3. Метаболічна інженерія використовує раціональне проектування метаболічної мережі *C. glutamicum* для створення L-лізину. Перевищення кількості генів, що кодують ключові ферменти, є ефективним методом для підвищення синтезу. Наприклад, перевищення гена *lysC* збільшує експресію АК, що призводить до накопичення L-лізину. Також виявлено, що перевищення генів *dapA*, *dapF* і *dapC* поліпшує виробництво. Підвищення активності ферментів, таких як карбоксилаза пірувату і карбоксилаза фосфоенолпірувату, збільшує постачання попередників, необхідних для синтезу L-лізину. Мутації в генах *prc* і *rus* можуть покращити активність цих ферментів. Комбінація різних мутацій у генах *hom*, *lysC*, *rus* і *bigA* приводить до значного збільшення виробництва L-лізину.

4. Системний метаболічний інжиніринг (СМІ) є підходом, що використовує сучасні біотехнології для оптимізації метаболічних процесів у мікроорганізмах з метою поліпшення виробництва певних продуктів, таких як L-лізин. Цей підхід базується на комплексному аналізі всіх вузлів, що впливають на метаболічний потік, постачання кофакторів, енергетичний баланс та транспорт продукту.

Для досягнення бажаного поліпшення виробництва L-лізину використовують різні стратегії, спрямовані на системний підхід. Одна з таких стратегій – блокування конкуруючих шляхів. Наприклад, блокування синтезу інших амінокислот та органічних кислот, які впливають на концентрацію внутрішньоклітинного оксалоацетату (ОАА), може забезпечити збільшення метаболічного потоку синтезу L-лізину. Також використовують стратегії зміни вибору кофактора у ферментів для підвищення ефективності метаболічних шляхів.

Окрім того, важливим аспектом СМІ є посилення транспорту кінцевих продуктів і зниження внутрішньоклітинної концентрації L-лізину, яка може бути недостатньою для інгібування експресії ключових ферментів у шляху. Надлишкова експресія гена *lysE* у *C. glutamicum*, наприклад, може збільшити швидкість екскреції L-лізину, що сприяє збільшенню виробництва.

Останні роки характеризуються розвитком алгоритмів моделювання клітинного метаболізму та комп'ютерних інструментів для аналізу метаболоміки та транскриптоміки. Ці технології дають змогу розуміти та прогнозувати функціонування клітинних систем, виявляти ключові фактори, що обмежують виробництво L-лізину, та проектувати раціональні стратегії для їх подолання.

Узагальнюючи, системний метаболічний інжиніринг використовує різні стратегії, включаючи блокування конкуруючих шляхів, зміну вибору кофакторів та посилення транспорту, для оптимізації метаболічного потоку та підвищення виробництва L-лізину у *C. glutamicum*. Використання комп'ютерного моделювання та сучасних біотехнологій допомагає розуміти та прогнозувати ці процеси, що сприяє раціональному дизайну для поліпшення виробництва цінного продукту [13].

5. Регулювання виробництва амінокислот за допомогою системи CRISPRi у *C. glutamicum*. Побачивши, що гетерологічний ген (*rfp*) може бути пригнічений за допомогою CRISPRi в *C. glutamicum*, було використано цей інструмент для пригнічення трьох ендогенних генів комерційної важливості: *pgi*, *rck* і *рук*. Видалення гену *pgi* приводить до перевиробництва NADPH через шлях пентозофосфатного шляху, що приводить до збільшення виробництва L-лізину. Видалення *rck* або *рук* непрямо збільшує виробництво L-глутамату. Коли система CRISPRi спрямовувала на нитку гена *pgi*, кількість L-лізину ( $p = 4.65 \times 10^{-13}$ ) збільшилась в 2,1 рази порівняно з контрольним штамом без *sgRNA*

(рисунок 1.4), що свідчить про сильне пригнічення виробництва Pgi.

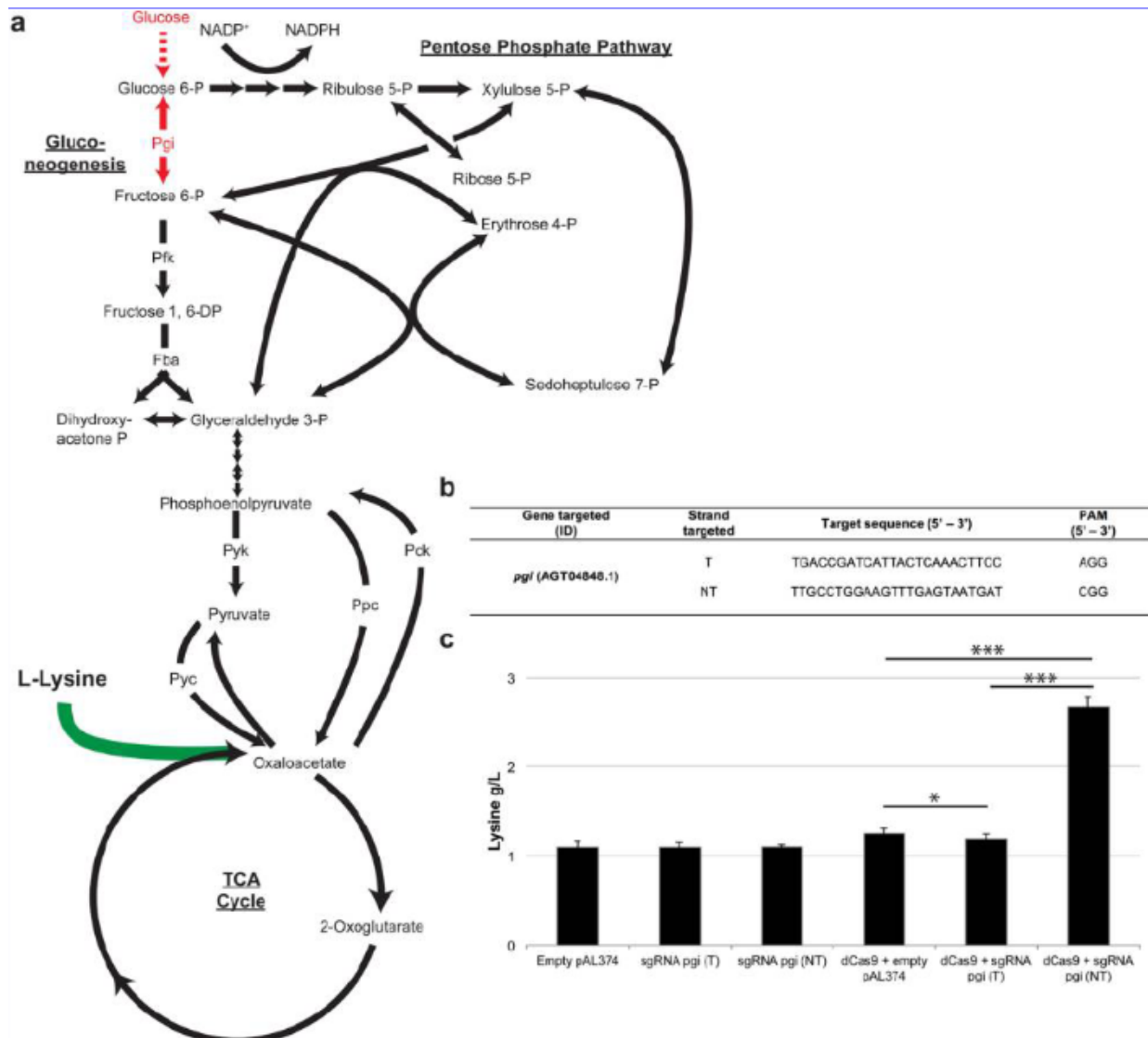


Рис. 1.4 CRISPRi ефективно пригнічує транскрипцію гена *pgi*, збільшуючи виробництво L-лізину: (а) центральний метаболічний шлях. Позначення червоним кольором представляє знижену транскрипцію гена *pgi* через пригнічення, здійснене CRISPRi; (б) ген та послідовності, на які спрямовується дія dCas9; (с) концентрація амінокислот (г/л) у контрольних та тестових штаммах (N = 9 для кожного штаму) була визначена після вичерпання глюкози. Помилкові стовпчики представляють стандартне відхилення вибірок. \* $p \leq 0,05$  і \*\*\* $p \leq 0,001$  [14].

Збільшення виробництва L-лізину було набагато сильнішим, коли

націльна нитка спрямовувалася на NT-нитку, порівняно з ниткою T. У відсутності dCas9 вираз sgRNA сам по собі не впливає на виробництво L-лізину. Збільшення виробництва L-лізину, яке ми спостерігались за пригнічення rgi за допомогою CRISPRi, подібне до того, що спостерігається за його видаленні. Однак абсолютні кількості амінокислот, вироблених за допомогою системи CRISPRi, не були такими високими, як за видалення генів, що може бути пов'язано з використанням різних штамів або умов, або з виразом залишкових ферментів через неповне пригнічення CRISPRi [14].

Отже, у якості продуцента було обрано *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, який було створено за допомогою CRISPRi, адже обраний штам може бути генетично стабільнішим порівняно з іншими продуцентами. Використання CRISPRi технології дозволяє точно контролювати експресію генів, що може сприяти стабільності штаму та зменшенню його виродження в процесі виробництва. Це важливо, оскільки умови виробництва можуть бути складними, а підтримка ауксотрофного штаму постійним постачанням додаткових компонентів може бути проблематичною.

#### 1.4. Характеристика біологічного агента

Мікробіологічні методи синтезу амінокислот засновані на тому, що багато мікроорганізмів мають здатність накопичувати значні кількості таких продуктів. Мікроорганізми, що накопичують амінокислоти, широко використовуються, але не багато з них є економічно вигідними продуцентами. Зазвичай їх отримують шляхом застосування різних мутагенних чинників. У більшості випадків, необхідно, щоб продуцент накопичував переважно один вид амінокислоти. За одночасної наявності декількох амінокислот, особливо якщо вони мають схожі фізико-хімічні властивості, їх виділення та очищення ускладнюється.

Найбільш поширені продуценти амінокислот – це грам-позитивні безспоріві бактерії, що відносяться до таких родів: *Corynebacterium*,

									Арк.
									25
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				

*Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* і деякі інші. Біотехнологію цього дипломного проєкту розроблено на основі штаму *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, отриманого за методу CRISPRi (рис.1.5) [1].

#### Систематичне положення

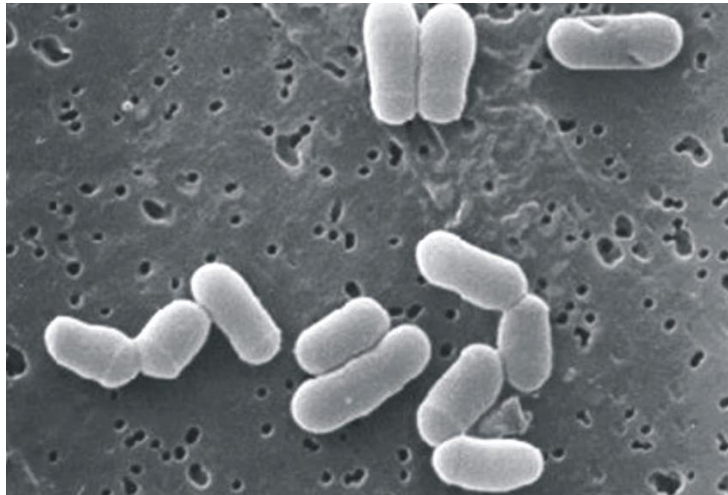


Рис.1.5 *Corynebacterium glutamicum* поділ клітин [15]

Царство: *Bacteria*

Підцарство: *Actinobacteria*

Клас: *Actinobacteria*

Ряд: *Corynebacteriales*

Родина: *Corynebacteriaceae*

Рід: *Corynebacterium*

Вид: *Corynebacterium glutamicum* [16].

*Corynebacterium glutamicum* – грампозитивна, факультативно анаеробна, неспороутворююча бактерія, що живе в ґрунті [15].

*Corynebacterium glutamicum* може рости як у присутності кисню, так і без нього [17].

*C. glutamicum* є глюкозопозитивною бактерією, що означає, що вона здатна використовувати глюкозу як джерело вуглецю і енергії. Вона може метаболізувати глюкозу через гліколіз та цикл Кребса [18].

Одним з основних біотехнологічних застосувань *C.glutamicum* є виробництво амінокислот, зокрема лізину, глютаміну та глютамату. Вона

має високу здатність до біосинтезу цих амінокислот [19].

#### Морфолого-цитологічні та культуральні ознаки

*Corynebacterium glutamicum* – грам-позитивна бактерія, яка має вигляд грампалочки або грам-нитки. Її клітини можуть бути одиночними, парними або утворювати короткі ланцюги. Вони мають розміри приблизно 2-4 мікрметри в довжину і 0,5-0,8 мікрметра в ширину. Клітинна стінка містить пептидоглікан та міколову кислоту, що є характерними для роду *Corynebacterium*. *Corynebacterium glutamicum* здатна рости на різних агаризованих середовищах. На багатьох поживних середовищах формують окремі колонії. Колонії мають неправильну форму, можуть бути кремового або білого кольору [20].

#### Поживні потреби організмів мікроорганізму

Джерела карбону: *C. glutamicum* є гетеротрофним організмом і використовує різні органічні сполуки як джерела карбону. Основними джерелами карбону є глюкоза, сахароза, мальтоза, гліцерин та інші вуглеводи.

Джерела фосфору: *C. glutamicum* має високі потреби в фосфорі для свого росту і метаболічних процесів. Фосфор може постачатися у формі різних органічних сполук, таких як фосфати органічних кислот, амінофосфати тощо.

Джерела нітрогену: *C. glutamicum* може використовувати амінокислоти, амідни, аміні та інші органічні сполуки як джерела нітрогену для синтезу білків та інших азотовмісних сполук.

Макроелементи та мікроелементи: *C. glutamicum* потребує різних макроелементів, таких як калій, натрій, магній, кальцій, залізо та інші, для підтримки своїх життєвих функцій. Деякі мікроелементи, наприклад, мідь, цинк, молібден, марганець, також є важливими для оптимального росту і метаболізму *C. glutamicum* [20].

#### Тип живлення

					ДП БМ91. 02.000 ПЗ	Арк.
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		27

*Corynebacterium glutamicum* є гетеротрофним організмом. Це означає, що він не здатний до автотрофного живлення, а отримує енергію та необхідні поживні речовини з органічних сполук, таких як вуглеводи та амінокислоти [20].

Залежність росту від температури, рН та інших факторів є такою:

*Corynebacterium glutamicum* є мезофільною бактерією, що означає, що вона оптимально росте за помірних температур. Оптимальна температура для росту *C. glutamicum* зазвичай коливається від 30°C до 37°C. За нижчих температур ріст може сповільнюватися, а за вищих – знижуватися.

Оптимальний рН для зросту розташовується в діапазоні від 6,5 до 7,5. Це слабкокислое або нейтральне середовище, яке є сприятливим для більшості штамів *C. glutamicum* [21].

#### Тип енергетичного метаболізму

*C. glutamicum* використовує глутамат, амінокислоти та різні вуглеводи як джерела карбону та енергії. Глюкоза є одним з основних поживних речовин для цього мікроорганізму, але він також може використовувати інші цукри, такі як сахароза та лактоза [22].

#### Спосіб розмноження

*Corynebacterium glutamicum* розмножується шляхом бактеріального ділення, що є типовим для бактерій. Бактеріальне ділення відбувається шляхом поділу одноклітинної бактерії на дві дочірні клітини.

Процес бактеріального ділення включає кілька етапів. Спочатку клітина збільшує свій розмір і реплікує свій генетичний матеріал, включаючи хромосоми і плазміді. Після цього клітинна мембрана та стінка звужуються по центральній площині, розділяючи генетичний матеріал і цитоплазму на дві половинки. Нарешті, формується перетин на середині клітини, який стає ділянкою розділу і дві нові дочірні клітини формуються. [18].

### Поширення в природі

*Corynebacterium glutamicum* може бути знайдена у різних середовищах, зокрема в ґрунті, воді, рослинах та тваринах.

Цей вид бактерій виявляє високу адаптивність до різних умов і може процвітати в різних екосистемах. Він може виживати в широкому діапазоні температур, від холодних до теплих умов. Крім того, *C. glutamicum* може адаптуватися до різних рівнів рН, включаючи кислотні середовища. Більшість досліджень щодо *Corynebacterium glutamicum* були проведені в контексті промислового використання цієї бактерії для виробництва різних продуктів, таких як амінокислоти. Проте, вона також може відігравати роль у природних екосистемах, взаємодіючи з іншими мікроорганізмами та займаючи важливу позицію у біологічних циклах [18].

					ДП БМ91. 02.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		29

## РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

### 2.1. Схема перебігу процесів

#### Умови

В процесі біосинтезу лізину реакції відбуваються за сприяння каталізаторів, що представлені ферментами. Умови, за яких здійснюється процес, можуть варіюватися залежно від конкретних умов виробництва, але зазвичай забезпечують оптимальні умови для функціонування ферментів. Це включає підтримку оптимального тиску, температури та рН середовища, які сприяють ефективності ферментативних реакцій.

Під час ферментації L-лізину відбувається виділення тепла внаслідок метаболічної активності та механічного перемішування. Тому необхідно контролювати стабільну і придатну температуру для забезпечення активності різних ферментів у *C. glutamicum*. Більшість ферментацій та виробництво L-лізину *C. glutamicum* проводяться за 30–33 °С. Занадто висока температура культивування може знизити швидкість росту або продуктивність штаму. Для зменшення витрат на охолодження можна відбирати мутантні штами, що витримують високу температуру і виробляють L-лізин, що є економічно вигідними для процесу ферментації. Був розроблений мутант *C. glutamicum* АНР-3, який вперше виробляв L-лізин приблизно за 40 °С, а кінцевий показник досяг 85 г/л після 28 годин. В подальших дослідженнях вони підтвердили, що мутація *lysC* (Т311І) призвела до знезчуття алостеричного інгібування АК та що *C. glutamicum* АК-1, АК-31833 і АК-14752 ефективні в культурі з постійним подачею за 40 °С. Кінцеві показники L-лізину становили відповідно 58 г/л, 37 г/л і 59 г/л, що перевищує показники за 30 °С (53 г/л, 33 г/л і 57 г/л). Крім того, час

ДП БМ91. 02.000 ПЗ

Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ворона А.В.			РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Лім.	Арк.	Архивів
Перевір.							30	82
Реценз.						НТУУ "КПІ ім. Ігоря Сікорського" ФБТ		
Н. Контр.		Маринченко Л.В.						
Затверд.								

інкубації АК-1 та АК-31833 за 40°C значно скорочено порівняно з 30°C, що означає вищу швидкість споживання цукру. Слід зауважити, що оптимальна температура для росту бактерій і синтезу L-лізину може відрізнятися. Тому протягом всього процесу ферментації необхідно контролювати його в межах декількох діапазонів температур. Крім того, діапазон контролю температури також повинен враховувати інші фактори, наприклад, у разі поганої вентиляції, температуру слід належним чином знизити, щоб зняти метаболічні порушення, спричинені недостатньою вентиляцією.

У промисловому виробництві, особливо великомасштабному, розчинений кисень (DO) як один з найважливіших параметрів контролю ферментації лізину та є важливим фактором, що впливає на енергетичні витрати. DO, як правило, залежить від швидкості перенесення кисню з газової фази в рідину (OTR) та швидкості транспорту кисню в клітини. OTR в культурному середовищі можна збільшити, збільшуючи швидкість перемішування, покращуючи аерацію чистим киснем або підвищуючи тиск у біореакторі. Деякі дослідження показали, що при подачі повітря для виробництва L-лізину *C. glutamicum* 1,0 ввм концентрація продукту, біомаса і споживання глюкози досягають найкращих показників. Виробництво L-лізину *C. glutamicum* МН 20–22В досягало 31,58 г/л після ферментації за рН 7,5, 30 °С протягом 96 годин з подачею повітря 1,0 ввм та швидкістю аерації 200 об/хв. Однак для *C. glutamicum* DO залежить не тільки від інтенсивності постачання кисню та швидкості перемішування, але й від споживання кисню, необхідного для його росту та виробництва L-лізину. Потреба мікроорганізмів в кисні залежить від віку бактерій та умов культури, а споживання кисню для росту бактерій і синтезу продукту часто різниться. Тому процес ферментації та виробництва L-лізину *C. glutamicum* вимагає регулювання подачі кисню в режимі реального часу, щоб забезпечити нормальну метаболічну активність. В даний час розроблено

інструменти, що дають змогу відстежувати та контролювати подачу кисню у біореакторі.

pH ферментації безпосередньо впливає на дисоціацію деяких важливих поживних речовин і проміжних метаболітів у середовищі, що впливає на ріст і розмноження штамів, що виробляють L-лізин, і формування метаболітів. Тому під час ферментації L-лізину pH є важливим показником метаболічної активності. Зазвичай pH L-лізину, що виробляється ферментацією *C. glutamicum*, становить близько 7,0–7,5. Зміна pH впливає на активність ферментів і метаболічний профіль бактерій, тому контроль за рівнем pH є важливим аспектом ферментаційного процесу L-лізину. Існує кілька способів регулювання pH під час ферментації, таких як автоматичне додавання кислоти або лугу, використання буферів або підтримання оптимального pH за допомогою контролера pH [13].

#### Опис процесу

Біосинтетичний шлях L-лізину у *C. glutamicum* показано на рисунку 2.1

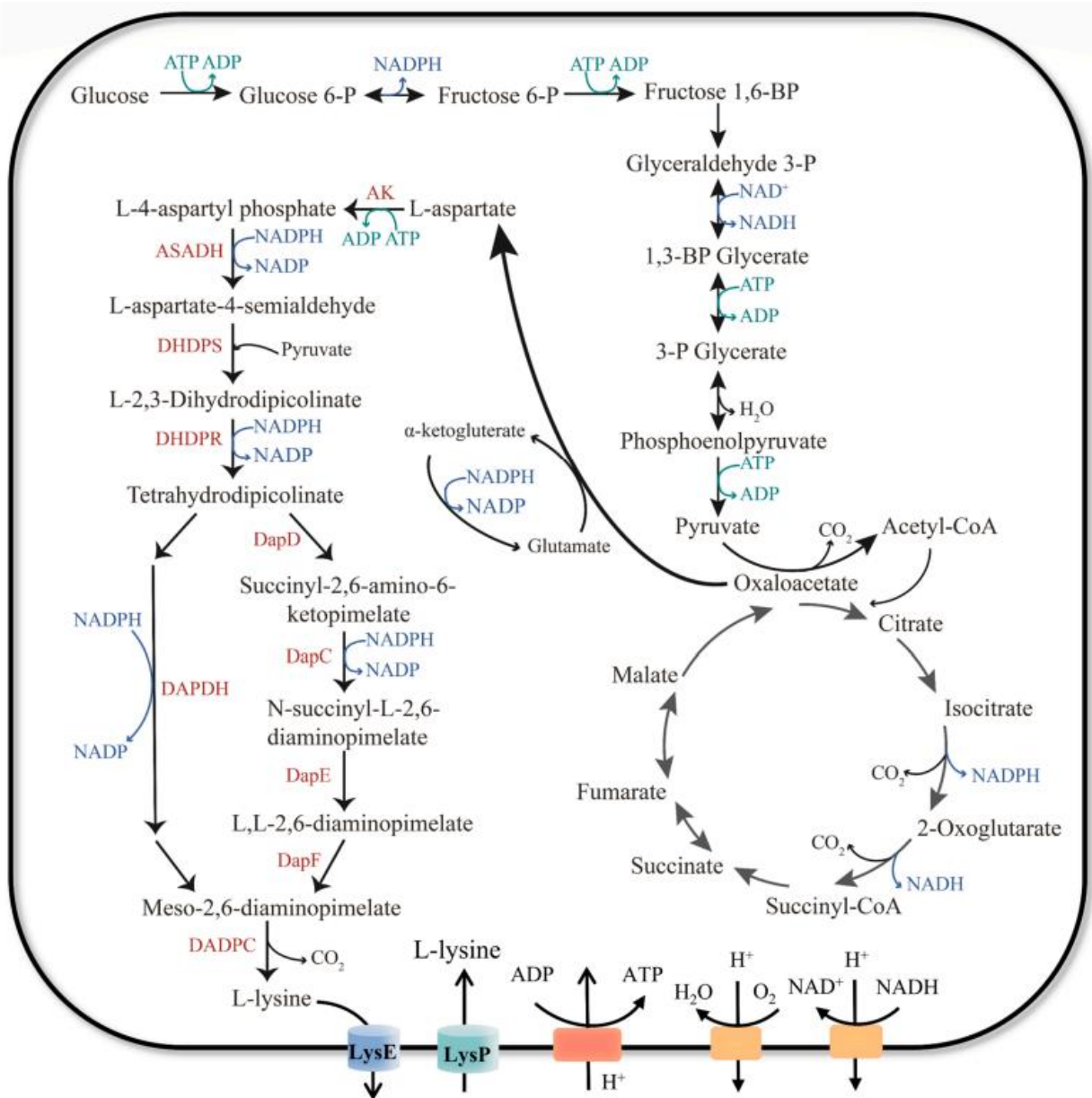


Рис. 2. 1 Біосинтетичний шлях L-лізину у *C. glutamicum*. У процесі біосинтезу L-лізину у *C. glutamicum* беруть участь десять ферментів: АК (аспартокіназа, закодована геном *lysC*), ASADH (аспартат-семіальдегіддегідрогеназа, закодована геном *asd*), DHDPS (дигідродіпіколінат-синтаза, закодована геном *dapA*), DHDPR (дигідродіпіколінат-редуктаза, закодована геном *dapB*), DapD (N-сукцинілаттрансфераза 2,3,4,5-тетрагідропіридин-2,6-дикарбоксилату, закодована геном *dapD*), DapC (трансаміназа сукцинілат-діамінопімелату, закодована геном *dapC*), DapE (десукцинілатаза сукцинілат-

діамінопімелату, закодована геном *darE*), *DarF* (епімераза діамінопімелату, закодована геном *darF*), *DAPDH* (дегідрогеназа мезодіамінопімелату, закодована геном *ddh*) та *DAPDC* (декарбоксилаза діамінопімелату, закодована геном *lysA*) [13].

Спочатку АК перетворює аспартат на L-4-аспартилфосфат. L-4-аспартилфосфат далі перетворюється на L-аспартат 4-семіальдегід під каталітичним впливом *ASADH*. Потім *DHDPS* каталізує утворення дегідродипіколінату у реакції з піруватом. Після цього дегідродипіколінат перетворюється на L-піперидин 2,6-дикарбоксилат під каталітичним впливом *DHDPR*. L-піперидин 2,6-дикарбоксилат пройшовши чотири послідовні реакції, безпосередньо перетворюється на мезо-2,6-діамінопімелат за допомогою *DAPDH*. Нарешті, мезо-2,6-діамінопімелат декарбоксильується до L-лізину за допомогою *DAPDC*.

У *C. glutamicum* система захоплення L-лізину здійснюється за допомогою *LysP* (закодована геном *lysP*). *LysP* є переносним білком, який альтернативно транспортує L-лізин і L-аланін і належить до надродини транспорту APC.

*LysP* має низьку активність, але високу специфічність, що підтримує рівновагу між внутрішньоклітинною та позаклітинною концентрацією L-лізину. *LysE* є експортером L-лізину та L-аргініну в *C. glutamicum*. Електрохімічний протонний потенціал та градієнт концентрації L-лізину є силами, що спонукають транспорт *LysE*. Експресія *lysE* тісно контролюється розпізнавальним транскрипційним активатором L-лізину *LysG* (закодованим геном *lysG*). *lysG* знаходиться поруч з *lysE* на хромосомі, а його експресія активується концентрацією L-лізину, L-гістидину або L-аргініну [13].

В процесі виробництва кормового концентрату лізину за допомогою *C. glutamicum* можуть виникати певні побічні реакції або шляхи метаболізму, особливо у разі зміни параметрів процесу. Деякі з цих

									Арк.
									34
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				

побічних реакцій та можливих механізмів їх впливу на перебіг процесу біодеструкції або біосинтезу можуть бути такими:

Акумуляція окремих проміжних сполук. У разі дисбалансу в біосинтетичних шляхах може статися акумуляція проміжних сполук, таких як L-4-аспартилфосфат або деякі проміжні сполуки у шляху синтезу дигідродипіколіату. Це може відбутися за високих концентраціях сировини або недостатній активності ферментів.

Зміна метаболічних шляхів. Зміни параметрів процесу, таких як температура, рН або поживні середовища, можуть спричинити зміну метаболічних шляхів у *C. glutamicum*. Це може призвести до активації альтернативних шляхів метаболізму, які можуть конкурувати з біосинтезом лізину або призвести до утворення небажаних продуктів.

Вплив небажаних продуктів на ферментативну активність. Деякі небажані продукти метаболізму, що можуть утворюватися в процесі виробництва лізину, можуть мати вплив на активність ферментів. Наприклад, накопичення певних проміжних сполук може спричинити негативний зворотний зв'язок та пригнічення діяльності ферментів [13].

## 2.2. Характеристика кінцевого продукту

Залежно від подальшого використання препарату, на основі культуральної рідини можна отримати технічні препарати у різних формах: рідкий концентрат лізину (РКЛ), сухий кормовий концентрат лізину (ККЛ) і кристалічний лізин. Кожен з цих продуктів має свою власну технологію виробництва.

З точки зору кормового використання найкраще використовувати РКЛ і ККЛ, оскільки вони, крім лізину, містять значну кількість інших сполук, які є важливими для організму тварин, особливо вітамінів, таких як рибофлавін, пантотенова кислота, фолева кислота та нікотинамід.

РКЛ і ККЛ мають приблизно однаковий склад, якщо вони виготовлені без додавання наповнювача. Однак, якщо використовується наповнювач, до

сухих речовин культуральної рідини додаються також сухі речовини наповнювача. Хімічний склад кормового препарату лізину складний і містить велику кількість найрізноманітніших сполук (табл.2.1 - 2.6) [23].

Таблиця 2.1 – Вміст амінокислот у кормовому препараті лізину [23]

<b>Амінокислоти</b>	<b>Вміст у препараті, %</b>
Лізін	15,0 – 20,0
Глутамінова кислота	2,5 – 3,7
Валін	1,2 – 4,8
Аланін	1,3 – 3,1
Аспарагінова кислота	0,8 – 1,4
Лейцин	0,6 – 1,1
Пролін	0,3 – 2,8
Гліцин	0,6 – 0,9
Аргінін	0,3 – 0,8
Тирозин	0,4 – 0,7
Метіонін	0,4 – 0,6
Ізолейцин	0,4 – 0,6
Фенілаланін	0,2 – 0,6
Триптофан	0,5 – 0,6
Серин	0,4 – 0,6
Треонін	0,3 – 0,6
Гістидин	0,2 – 0,3
Цистин	0,2 – 0,3
Всього	До 43,5

Таблиця 2.2 - Вміст азотистих сполук у кормовому препараті лізину [23]

<b>Азотисті сполуки</b>	<b>Вміст у препараті, %</b>
Загальний азот	5,2– 7,9

Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БМ91. 02.000 ПЗ

Арк.

36

Протеїн (N×6,25)	37,5 – 49,4
Білковий азот	1,9 – 3,6
α-амінний азот	0,9 – 2,0
Аміачний азот	0,3 – 1,4
Азот бетаїну	0,82 – 1,66

Таблиця 2.3 - Вміст вітамінів у кормовому препараті лізину [23]

<b>Вітаміни</b>	<b>Вміст у препараті, мкг/г</b>
Тіамін (вітамін В1)	1,7– 9,7
Рибофлавін (вітамін В2)	84,2 – 160,0
Пантотенова кислота (вітамін В3)	30 – 60
Фолієва кислота (вітамін В4)	10 – 20
Піридоксин (вітамін В6)	200 – 340
Нікотинова кислота (вітамін РР)	8,0 – 10,0

Таблиця 2.4 - Вміст органічних сполук у кормовому препараті лізину [23]

<b>Різні органічні речовини</b>	<b>Вміст у препараті, мкг/г</b>
Бетаїн	6,0 – 13,0
Редукуючі речовини	4,6 – 12,7
Жири	1,3
Клітковина	0,3

Таблиця 2.5 - Вміст мінеральних речовин у кормовому препараті лізину [23]

<b>Мінеральні речовини</b>	<b>Вміст у препараті, мкг/г</b>
Зола (% від маси СВ)	19,0 – 28,0
Кальцій (у золі)	5,2 – 12,5
Калій	28,6 – 33,6





препарату в кількість, що дорівнює кількості поліетиленових мішків.

#### Пакування

Кормовий концентрат лізину фасують по 20 кг у мішки з поліетиленової плівки по або поліетиленові мішки. Поліетиленові мішки термошаровують і упаковують у паперові чотиришарові мішки.

Паперові мішки зашивають машинним способом нитками або шпагатом залишаючи гребінь по всій ширині мішка не менше ніж 4 см. Допускається замість зашивання паперових мішків їх склеювання.

Маса нетто пакувальної одиниці повинна становити  $(20 \pm 0,2)$  кг.

#### Приймання

Кормовий концентрат лізину приймають партіями. Партією вважають будь-яку кількість препарату виготовлену за один технологічний цикл, однорідну за показниками якості та оформлену одним документом про якість.

У документі про якість вказують:

- найменування підприємства-виробника та (або) його товарний знак
- найменування та марку препарату;
- номер партії;
- масу нетто партії;
- кількість місць у партії;
- дату виготовлення препарату (рік, місяць, число);
- результати випробувань, дату видачі документа про якість;
- гарантійний термін та умови зберігання;
- позначення цього стандарту.

#### Контроль якості

Справжність кормового концентрату лізину визначають у кожній десятій партії. За зміни технології виготовлення кормового концентрату лізину справжність визначають у п'яти партіях поспіль.

При незадовільних результатах випробувань хоча б за одним

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		40

показником щодо нього проводять повторні випробування на подвоєній кількості вибірки, взятої від тієї партії продукції. Результати випробувань розповсюджують на всю партію [24].

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		41

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### 3.1. Матеріали основні і допоміжні

Таблиця 3.1. – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якого перевіряється сировина	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
<b>1. Основна сировина</b>			
1.1. Меляса	ДСТУ 3696-98	Масова частка сахарози не менше 43%	Компонент поживного середовища
1.2. Сечовина	ДСТУ 7312:2013	Вміст азоту 1%	
1.3. Кукурудзяний екстракт	ДСТУ 2903:2005	Усі показники відповідно ДСТУ	Компонент поживного середовища
1.4. Калію фосфат двозаміщений	ГОСТ 2493-75	Масова частка основної речовини не менше 99%	Компонент поживного середовища
1.5. Магній сульфат	ГОСТ 450-77	Відсоток у ПС – 0,03%	Компонент поживного середовища
1.6. Сульфат заліза	ГОСТ 4148-78	Масова частка чистої речовини не менше 99%	Компонент поживного середовища
<b>2. Допоміжна сировина</b>			
2.1. Питна вода	ДСТУ 7525:2014	Число бактерій в 1 см <sup>3</sup> води за 37 °С: 100 КУО/см <sup>3</sup> .	Холодо- і теплоагент; для мийки і ополіскування обладнання, приготування поживних середовищ

*ДП БМ91. 02.000 ПЗ*

Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ворона А.В.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.							42	82
Реценз.						НТУУ "КПІ ім. Ігоря Сікорського" ФБТ		
Н. Контр.		Маринченко Л.В.						
Затверд.								

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якого перевіряється сировина	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
2.2. Натрій їдкий технічний	ГОСТ 2263-79	Вміст основної речовини не менше 42% кислот у безводному продукті – більше 97,4%	Для регулювання рівня кислотності ПС
1	2	3	4
2.3. Вапняне молоко	ТУ 2133-45-50265324-2010	Вміст активного оксиду кальцію не менше 183 г/дм <sup>3</sup>	Для очищення культуральної рідини
2.4. Синтетичний миючий засіб	ДСТУ 2207.1-93	Діюча речовина не менше 0,5%	Для санітарної обробки обладнання
2.5. Розчин Хлораміну Б	ДСТУ 7393-2:2004	Діюча речовина не менше 5%	Для санітарної обробки приміщень
<b>3. Матеріали</b>			
3.1. Пластикові бочки	ДСТУ 2890-94	Забезпечення цілісності	Пакування готової продукції
3.2. Пластикові пробки	ГОСТ 32626-2014	Забезпечення цілісності	Пакування готової продукції
3.3. Поліетилен пакувальний	ГОСТ 25951-83	Забезпечення цілісності	Пакування готової продукції
3.4. Поліетиленова стрічка	ГОСТ 20477	Маркування	Пакування готової продукції
<b>4. Напівпродукти</b>			
4.1. Посівний матеріал	Згідно з виробничим регламентом	Мікробіологічна чистота	Для виробничого культивування

### 3.2. Контроль виробництва

Таблиця 3.2. – Контроль виробництва

№ п/п	Найменування стадії процесу, місце заміру параметра або відбору проби	Параметр, що контролюється	Частота контролю	Норми технологічного режиму та допустимі відхилення	Метод контролю параметра, тип приладу
1	ДР 1.1 Підготовка персоналу Кмб 1.1	Руки персоналу, мікробна контамінація	Перед початком роботи	Не більше 5 КУО на змиві з рук	Мікробіологічний
2	ДР 1.2 Підготовка миючих і дезінфікуючих розчинів Кт 1.2.1 Кх 1.2.2	Розчин синтетичного миючого засобу, хлораміну Б	Кожну операцію	Концентрація 0,5% синтетичного миючого засобу, 5% хлораміну Б	Контроль технічний, ваги, мірний посуд
3	ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень Кмб 1.3	Мікробіологічна числота поверхонь	Кожну операцію	Клас В: КУО < 10; Клас С: КУО < 100; Клас Д: КУО < 200	Мікробіологічний. Змиви з поверхонь
4.	ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій Кт 1.4.1 Кмб 1.4.2	Мікробіологічна числота поверхонь, стерилізація	Кожну операцію	КУО відсутні, t = 140 °С, p = 0,2 МПа, T = 1 год	Мікробіологічний. Термометр, манометр, таймер
5.	ДР 2 Підготовка повітря Кт 2	Ступінь очищення	Кожну операцію	Ступінь очищення 99,5%	Головний фільтр
6.	ДР 3.1 Приготування	Режим стерилізації,	Кожну операцію	t = 120 °С, T = 30 хв, p = 0,2 МПа,	Мікробіологічний,

	та стерилізація термолабільних компонентів Кт 3.1.1 Кмб 3.1.2	мікробна чистота		відсутність мікрофлори зі змиву	технічний контроль, термометр, таймер, манометр
7.	ДР 3.2 Приготування та стерилізація термостабільних компонентів Кт 3.2.1 Кмб 3.2.2	Режим стерилізації, мікробна чистота	Кожну операцію	t = 140 °С, T = 15 хв, p = 0,2 МПа	Мікробіологічний, технічний контроль, термометр, таймер, манометр
8.	ТП 4.1 Відновлення музейної культури Кт Кмб	Бактеріальний штам <i>Corynebacterium glutamicum</i> А ТСС 13032 морфологія, культуральні ознаки, мікробіологічна чистота культури	Кожну операцію	t = 29-30 °С, T = 24 год, колір, форма, прозорість, відсутність контамінації	Мікробіологічний контроль, технічний шляхом мікроскопіювання
9.	ТП 4.2 Вирощування першої генерації в колбах Кт Кмб	Температура, час, мікробіологічна чистота культури, морфологія	Під час процесу	t = 29-30°С, T = 24 год, відсутність патогенних організмів, правильна морфологія	Мікробіологічний контроль, термометр, таймер, проби, мікроскоп
10	ТП 4.3 Вирощування посівного матеріалу в посівному	Температура, час, перемішування, мікробіологі	Під час процесу	t = 30°С, 24 год, відсутність патогенних організмів, рН 6,5-6,8	Мікробіологічний контроль, термометр, таймер, проби,

	ферментері Кт Кмб	чна чистота, рН			рН-метр
11	ТП 5 Виробниче культивуван ня Кт Кмб Кх	Температура, час, перемішуван ня, рН, фаза росту, мікробіологіч на контамінація, герметичність , концентрація КУО	Під час процес у	t = 30°C, T = 96 год, рН=7-7,5, 200 об/хв, 50% спор у кінці, відсутність забруднення  p = 0,2 МПа МПа, $\geq 10^{10}$ КУО/см <sup>3</sup>	Термометр, таймер, фотокалориме тр, витратомір, манометр, рН- метр, мікроскоп, проби
12	ТП 6 Стабілізація культурально ї рідини Кт Кмб	рН	Під час процес у	T = 30 хв, рН=7,5, n= 50 об/хв	рН метр
13	ТП 7 Сушіння	Режим процесу; Температура, тривалість сушіння, вакуум, мікробіологі чна чистота	Кожну операці ю	t = 120°C, L= 4,73 кг/с Vc=4,82 м <sup>2</sup> /с	Термометр, манометр, таймер
14	ПМВ 8 Пакування, маркування, відвантаженн я Кт 8	Маркування	Кожну операці ю	Маркування , пакування у коробки,	Візуально відбір упаковок: 1 на 1000
15	ЗВ 9 Знешкожден ня відходів і викидів Кт 9 Кх 9	Відході, їх концентрація	Кожну операці ю	Згідно правил	Кількісний хімічний та мікробіологічн и й аналіз

Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БМ91. 02.000 ПЗ

Арк.

46

	Кмб 9				
16	ПВ 10 Переробка відходів і викидів Кт 10 Кх 10 Кмб 10	Фільтри	Кожну операцію	t = 120°C. p = 0,12-0,2 МПа, T = 3 год	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз

### 3.3. Матеріальний баланс

Таблиця 3.3 – Матеріальний баланс стадії виробництва

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва кінцевого продукту або напів-продукту, відходів та витрат	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
ДРЗ	Меляса	87,4			ДРЗ	Поживне середовище	4513		
	Кукурудзяний екстракт	43,7							
	Сечовина	21,85							
	Калій фосфат двозаміщений	8,74							
	Магній сульфат	4,37							
	Сульфат заліза	0,437							
	Вода питна	4352							
Всього		4513			Всього		4513		
ТП4.2.	Поживне середовище			43,5	ТП4.2.	Інокулят першої генерації			44,1
	Колби Ерленмейера (750мл)		36			Брудні колби		36	
	Культура			4,5		Витрати			3,9
Всього			36	48	Всього			36	48

Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
-----	------	----------	--------	------

ДП БМ91. 02.000 ПЗ

Арк.

47

ТП4.3.	Інокулят першої генерації			44,1	ТП4.3.	Інокулят другої генерації			441
	Поживне середовище			401		Витрати			4,1
Всього				445,1	Всього				445,1
ТП5.	Поживне середовище			3969	ТП5	Культуральна рідина			4410
	Посівний матеріал			441					
Всього				4410	Всього				4410
ТП6	Культуральна рідина			4410	ТП6	Стабільна культуральна рідина			7006
	Метабісульфат натрію			2205		Витрати			50
	НСІ			441					
Всього				7056	Всього				7056
ТП7	Стабільна культуральна рідина			7006	ТП7	Порошок			3503
						Випарена волога			3503
Всього				7006	Всього				7006
ПМВ8	Порошок			3503	ПМВ8	Заповнені мішки		175	3500
	Мішки 20 кг		178			Витрати		3	3
Всього				178	3503	Всього		178	3503

Отже, за один виробничий цикл ми будемо отримувати 178 мішків наповнених продукцією з урахуванням витрат при виробництві. Повний один цикл виробництва триває 5 днів, тоді за місяць буде вироблено 1068 мішків по 20 кг кожен. В результаті тримуємо у сумі 21 360 кг продукції на місяць, що дорівнює 21,36 т.

За розрахунками Міністерства аграрної політики та продовольства України поголів'я сільськогосподарських тварин у с/г підприємствах та господарствах населення станом на 1.01.2023 року [25] :

									Арк.
									48
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				

- Корів – 2 432 700 голів
- Птиці – 228 010 000 голів
- Свиной – 5 028 400 голів

Порахуємо обсяги використовуваних кормів щорічно за наданими даними.

Для цього визначимо сумарну кількість тварин,  $A_{заг}$ , голів:

$$A_{заг} = A_{кор} + A_{пт} + A_{св} = (2\,432\,700 + 228\,010\,000 + 5\,028\,400) = 235\,471\,100 \text{ голів.}$$

Потреби у кормах на добу на одну голову становлять:

Для свиной - 2 кг/добу на одну голову

Для корів - 22,1 кг/добу на одну голову

Для птиці - 0,12 кг/добу на одну голову

Розрахуємо кількість використовуваних кормів,  $G_{заг}$ , тонн/рік, для свиной, корів та птиці щорічно:

$$G_{заг} = G_{св} + G_{кор} + G_{пт} = (5\,028\,400 \text{ голів} * 2 \text{ кг/добу} * 365 \text{ днів}) + (2\,432\,700 \text{ голів} * 22,1 \text{ кг/добу} * 365 \text{ днів}) + (228\,010\,000 \text{ голів} * 0,12 \text{ кг/добу} * 365 \text{ днів}) = 2\,592\,648\,010 \text{ кг} = 2\,592\,648 \text{ тонн.}$$

Тепер розрахуємо частки кожного виду тварин відносно загальної кількості тварин:

$$X_{св} = (5\,028\,400 \text{ голів} / 235\,471\,100 \text{ голів}) * 100 \approx 2,14\%$$

$$X_{кор} = (2\,432\,700 \text{ голів} / 235\,471\,100 \text{ голів}) * 100 \approx 1,03\%$$

$$X_{пт} = (228\,010\,000 \text{ голів} / 235\,471\,100 \text{ голів}) * 100 \approx 96,83\%$$

Для задоволення потреб свиной в лізині, потрібно додавати 1,0% сухої маси корму; для корів - близько 1,6% сухої маси корму; для птиці - 0,7% сухої маси корму.

Розрахуємо середній вміст лізину у сухій масі корму,  $W_{сух.м.}$ , %:

$$W_{сух.м.} = ((0,001 - 0,0004) * 0,0214 + (0,0016 - 0,0007) * 0,0103 + (0,007$$

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		49

$$- 0,003) * 0,9683) * 100 \approx 0,39\%.$$

Оскільки суха маса корму становить приблизно 90%, розрахуємо середній вміст лізину у повній масі корму,  $W_{\text{повн.}}$ , %:

$$W_{\text{повн.}} = 0,39 * 0,9 \approx 0,35\%.$$

Тоді необхідна кількість лізину для використання у кормах щорічно становитиме:

$$G_{\text{ліз}} = 2\,592\,648 \text{ тонн} * 0,0035 = 9\,071 \text{ тонн}.$$

За вмістом лізину в комбікормах із ККЛ у 30%, потреби в лізин-протеїновій добавці на рік становитимуть:

$$G_{\text{ККЛ}} = 9\,071 \text{ тонн} / 0,3 = 30\,237 \text{ тонн}.$$

Отже, мінімальний обсяг виробництва ККЛ за добу для задоволення тільки потреб тваринництва,  $G_{\text{доб}}$ , т/добу, за умови роботи 245 діб/рік становитиме:

$$G_{\text{доб}} = 30\,237 / 245 = 123,7.$$

Зазначимо, що потреби в лізину не повністю задовольняються власним виробництвом в Україні, і частково задовольняються за рахунок імпорту зі ставкою тарифу 6,5%.

Враховуючи те, що на даний момент в Україні не існує виробництв даного ККЛ, це дає можливість за достатніх виробничих потужностей, підприємства, монополізувати ринок, але враховуючи усі складності, на початку дане підприємство зможе забезпечити близько 10 % від загальної потреби.

### 3.4. Опис технологічного процесу

Промислове отримання лізину та інших амінокислот здійснюється в суворо асептичних умовах, стерильних поживних середовищах з використанням чистої культури продуцента [1].

Технологічна послідовність процесу отримання лізину наступна:

*ДР1 Санітарна підготовка виробництва*

*ДР1.1 Підготовка персоналу*

									Арк.
									50
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					

ДП БМ91. 02.000 ПЗ

Головним завданням в підготовці персоналу є ознайомлення з інструктажем та правилами техніки безпеки. Усі працівники, незалежно від характеру роботи, стажу, кваліфікації та досвіду, зобов'язані пройти інструктаж з техніки безпеки.

Крім того, всі працівники повинні носити спеціальний захисний одяг. Технологічний одяг, який не контактує з потенційно інфекційними матеріалами, передають на прання двічі на місяць без попередньої стерилізації.

### *ДР 1.2. Підготовка мийних і дезінфікуючих розчинів*

#### *ДР 1.2.1. Приготування розчину миючого засобу*

Згідно з вимогами GMP, персонал та обладнання проходять процедуру обробки дезінфікуючими розчинами перед початком виробничого процесу, щоб уникнути контамінації виготовлюваної продукції. Дезінфікуючі розчини повинні бути затверджені МОЗ України та дозволені для використання на підприємствах хіміко-фармацевтичної промисловості. Підготовку цих розчинів проводять згідно з «Методичними рекомендаціями щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків», які були затверджені Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 року № 502.

До вагового дозатору подається синтетичний миючий засіб та вода питна. З дозатору відповідна порція реагентів подається до апарату з механічним перемішуючим пристроєм де вони гомогенізуються протягом 2-ох хвилин при 40 об/хв. Отриманий розчин подається до ДР1.3 та ДР1.4.1.

#### *ДР 1.2.2. Приготування розчину Хлораміну Б*

До вагового дозатору подається Хлорамін Б та вода питна у пропорції для отриманні кінцевої концентрації – 1%. З дозатору відповідна порція реагентів подається до апарату з механічним перемішуючим пристроєм де вони гомогенізуються протягом 2-ох хвилин при 40 об/хв. Після чого даний дезінфікуючий розчин подається до магістралі Т-31.

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		50



розчином Хлораміну Б.

Використані розчини подаються до стадії ПВ9.

#### *ДР 1.4.3. Стерилізація обладнання та комунікацій*

До апаратів подається гостра пара з температурою 140°C, тиском 0,3 МПа, протягом 1 години. Після завершення процедури конденсат уловлюється конденсатовловлювачем та подається до ПВ9. Використана пара подається на рекуперацію.

#### *ДР2. Підготовка повітря.*

##### *ДР2.1. Забір повітря.*

Через трубу, що встановлена на висоті 8 м над поверхнею виробництва відбувається забір повітря з атмосфери, що подається на стадію ДР2.2.

##### *ДР2.2. Механічна очистка повітря*

Повітря проходить первинне очищення на набивному фільтрі з завантаженням активованого вугілля. Ефективність очищення повітря від завислих чаток досягає 80%.

##### *ДР2.3. Компресування*

Попередньо очищене повітря нагнітається в компресорі до тиску 0.2 МПа, та подається до теплообмінника рекуператора.

##### *ДР2.4. Стабілізація термодинамічних показників*

Під час нагнітання повітря воно нагрівається до температури 100-140°C. Тому воно подається до рекуперативного теплообмінника кожухотрубного типу. В теплообмінник подається вода технічна для охолодження повітря. Конденсат що утворився збирається конденсатовловлювачем та подається до магістралі Т-1.3. Повітря подається до очищення на головний фільтр.

##### *ДР2.5. Очищення на головному фільтрі*

Повітря подається на головний фільтр очищення конструкції Гіпромедпрому, набивного типу, що має завантаження з активованого

									Арк.
									52
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				



гріючої пари до сорочки апарату. Температура процесу складає 140°C, та витримується протягом 30 хв. Компоненти подаються до стадії ТП5.

#### *ТП4. Підготовка посівного матеріалу *C. glutamicum**

##### *ТП4.1. Відновлення музейної культури*

Зміст флакона з культурою висівають у стерильних умовах у пробірки з твердим поживним середовищем та поміщають у термостат, де його інкубують протягом 120 годин за температури 29-30°C. Після росту колоній їх ретельно перевіряють з точки зору морфологічних та культуральних характеристик і також проводять оцінку мікробіологічної чистоти.

##### *ТП4.2. Отримання першої генерації в колбах*

В пробірки з посівним матеріалом на твердому поживному середовищі додають по 2 мл стерильного поживного середовища та перемішують, щоб утворити суспензію клітин. Вирощену культуру стерильно змивають водою з поверхні агарового середовища і переносять у колби Ерленмейера об'ємом 750 мл, які містять 50-100 мл рідинного живильного середовища. Колби з культурою розміщують на качалках з частотою обертання 180-200 об/хв у приміщенні з постійною температурою 30°C. Тривалість вирощування культури в колбах становить 24 години.

##### *ТП4.3. Отримання другої генерації в інокуляторі*

Отриману культуру подають до інокулятора що обладнаний турбінною мішалкою, який заповнений поживним середовищем. Культивування в інокуляторі триває до 2 діб. Параметри процесу температура 30°C, швидкість обертання лопастей мішалки 200 об/хв. До аератора подається повітря від стадії ДР2.6. Витрата повітря складає 1 л/год.

Посівний матеріал подається до ТП5.

##### *ТП5. Виробниче культивування*

До ферментеру подаються компоненти поживного середовища від ДР 3.1.2. та ДР 3.2.2. Відбувається їх гомогенізація турбінною мішалкою. Коефіцієнт заповнення поживним середовищем складає 0,6. Після чого до

									Арк.
									54
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				

ферментеру подається посівний матеріал від ТП4.3. коефіцієнт заповнення яким складає 0,7 від об'єму ферментеру. В сорочку ферментеру подається вода технічна, з метою підтримки температури культивування на рівні 30 °С. Тоді як до барботеру подається повітря від ДР2.6. Культивування тримає до 96 годин, за рН 7,0-7,5. Р = 0,2 МПа, та за обертання мішалки зі швидкістю 200 об/хв.

Конденсат, що утворюється в процесі ферментації, подається до ПВ9, так як і рідкі відходи.

Культуральна рідина після культивування подається до апарату з механічним перемішуючим пристроєм для стабілізації.

#### *ТП6. Стабілізація культуральної рідини*

Стабілізація відбувається за рахунок додавання до культуральної рідини метабісульфату натрію з концентрацією 25%, та розчину НСІ. Гомогенізація триває 30 хв за швидкості обертання мішалки 50 об/хв. Стабілізована культуральна рідина з параметрами температура 30 °С, та вмістом вологи 50%. Подається до стадії ТП7.

#### *ТП7. Розпилююче сушіння*

До розпилювальної сушарки подається сушильний агент – очищене повітря від калориферу. У потоці повітря суміш розпилюється та висушується. Температура повітря 140 °С. Витрата повітря складає 4,82 м<sup>3</sup>/с. Температура процесу 120 °С.

Порошок готового продукту транспортується повітрям до батареї циклонів, після чого він подається до розвантажувального циклону, звідки подається до етапу ПМВ8. Повітря перекачується вентиляторами до скрубера, де відділяються залишки культуральної рідини, та подаються до сушарки.

#### *ПМВ8. Пакування, маркування, відвантаження*

Продукт відповідно до регламенту пакується в мішки по 20 кг та після відповідного маркування відвантажується на склад.

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		55

### *ЗВ9. Знешкодження відходів та викидів*

Виробництво амінокислот характеризується утворенням великої кількості відходів у вигляді розчинних органічних речовин.

#### *ЗВ9.1 Знешкодження газоподібних відходів*

Очищення повітря, що містить живі клітини мікроорганізмів, краплі культуральної рідини з продуктами метаболізму, вимагає наявності спеціальних сепараторів для відокремлення крапель та піни, яку далі очищають від мікроорганізмів за допомогою скрубєрів для повторного використання як вентиляційне або технологічне повітря або викидують в атмосферу.

#### *ЗВ9.2 Знешкодження рідких відходів*

Залишки розчинів дезрозчинів після санітарної обробки виробництва, промивні води після мийки обладнання збирають в збірник нейтралізації стічних вод, розбавляють водою в 3-4 рази, доводять рН середовища до 7,0 розчином натра їдкого або соляної кислоти та потім зливають в загальнозаводську каналізаційну систему.

#### *ЗВ9.3 Знешкодження твердих відходів*

Тверді відходи виробництва у вигляді рукавичок, респіраторів, упаковочних матеріалів, бракованих флаконів, пробок та ковпачків утилізуються на міському сміттєзвалищі або полігонах. Некондиційний посівний матеріал піддається термічній обробці у апаратах гострою парою з тиском  $P = 0,3$  МПа при температурі  $130$  °С протягом 50 хвилин, охолоджують подачею холодної технічної води в сорочку до  $25-30$  °С, розбавляють водою та доводять рН середовища до 7,0 соляною кислотою або розчином натра їдкого та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему.

#### *ПВ.10 Переробка відходів та викидів*

В даному виробництві використовуються матеріали, які можуть використовуватися повторно. Головні фільтри стерилізують насиченою

									Арк.
									56
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				

водяною парою за тиску 0,12-0,2 МПа та температури  $t = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а потім просушують сухим повітрям протягом 3 годин.

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм..</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		57

## РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЛАДНАННЯ

Ферментери мають відповідати основним потребам культивування клітин, забезпечуючи оптимальні умови для кожної клітини продуцента та уникати впливу метаболічних продуктів на подальший синтез. Крім того, автоматизація виробництва має бути максимальною, щоб зменшити ризики, пов'язані з людським фактором, але повна автоматизація неможлива, тому безпека та охорона праці повинні відповідати високим стандартам. Вибір ферментера залежить від характеристики сировини, яку переробляють, параметрів технологічного режиму і визначається технікоекономічними міркуваннями.

Для успішного біосинтезу необхідно забезпечити перемішування та гомогенізацію середовища. Існують два методи досягнення потрібного режиму перемішування: ферментери з механічним перемішувачем та ферментери з пневматичним перемішувачем. Однак, ферментери з пневматичним перемішувачем мають обмеження, зокрема, менший робочий об'єм, особливо при роботі з пінистими середовищами. Натомість, апарати з механічним перемішуванням є найбільш поширеними і мають механічну мішалку, яка забезпечує ефективне перемішування рідкого середовища. Вони мають перспективи подальшого застосування, оскільки забезпечують швидкий масообмін кисню та економію енергії [25].

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>						
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>	
<i>Розроб.</i>		<i>Ворона А.В.</i>			<i>РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЛАДНАННЯ</i>						
<i>Перевір.</i>										58	82
<i>Реценз.</i>								<i>НТУУ "КПІ ім. Ігоря Сікорського" ФБТ</i>			
<i>Н. Контр.</i>		<i>Маринченко Л.В.</i>									
<i>Затверд.</i>											





- Витрати повітря, м<sup>3</sup>/год: 1,0.
- Коефіцієнт заповнення:  $\phi = 0,7$ .

**Визначення теплофізичних властивостей середовища, що переміщується**

Розрахунок теплофізичних властивостей меляси.

Густина поживного середовища, в основі якого лежить меляса, визначають за формулою:

$$\rho = 1007,3 + 4,11(CP - 0,11t) = 1007,3 + 4,11(10 - 0,11 * 30) = 1034,8 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$$

Де, CP – вміст сухих речовин приймаємо з літератури 10%, %; t – температура середовища, С.

Тоді, коефіцієнт динамічної в'язкості поживного середовища дорівнює:

$$\mu_c = (2,7 + 0,192 * CP) * t^{-m} * 10^{-3}, (\text{Па} * \text{с})$$

Де, приймаємо значення  $m = 0.426$ .

$$\mu_c = (2,7 + 0,192 * 10) * 30^{-0,426} * 10^{-3} = 1.08 * 10^{-3} \text{ Па} * \text{с}$$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості поживного середовища:

$$\nu_p = \frac{\mu_c}{\rho_c} = \frac{1.08 * 10^{-3}}{1034.8} = 1.04 * 10^{-6} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}$$

Теплоємність поживного середовища:

$$c_c = 4,073 - 0,00134 * (14,4 * CP - t), \frac{\text{кДж}}{\text{кг} * \text{К}}$$

$$c_c = 4,073 - 0,00134 * (14,4 * 10 - 30) = 3.920 \frac{\text{кДж}}{\text{кг} * \text{К}}$$

Коефіцієнт теплопровідності поживного середовища:

$$\lambda_c = 0,5646 * t^{0.0879} * CP^{-0,195}, \frac{\text{Вт}}{\text{м} * \text{К}}$$

$$\lambda_c = 0,5646 * 30^{0.0879} * 10^{-0,195} = 0,486 \frac{\text{Вт}}{\text{м} * \text{К}}$$

**Конструктивний розрахунок**

Робочий об'єм апарату обчислюється за формулою:

$$V_H = \frac{V_p}{K_3} = 6,3 \text{ м}^3$$

$$V_p = V_H * K_3 = 6.3 * 0.7 = 4.41 \text{ м}^3$$

Обираємо типовий реактор з еліптичною кришкою, з наступними технічними даними:

$$V_H = 6.3 \text{ м}^3$$

$D_{\text{вн}}=1800$  мм – внутрішній діаметр апарату.

$F_p=14,8$  м<sup>2</sup> – площа поверхні теплообміну рубашки.

$d_B=65$  мм – діаметр валу мішалки.

$H_p(\varphi=0,75) = 2,01$  м,  $H_p(\varphi=0,5) = 1,39$  м. – висота рівня рідини.

Обираємо відкриту турбінну мішалку.

Основні співвідношення для такого типу мішалки:

$$D/d_M=3 \div 4$$

$$h_M/d_M=0,2$$

$$h/d_M=0,4 \div 1$$

$$l/d_M=0,25$$

$$b/d_M=0,1$$

$$\varepsilon_M=8,4$$

Діаметр мішалки:

$$d_M = 0,25D = 0,25 \cdot 1,8 = 0,45 \text{ м}$$

Де,  $D$  – внутрішній діаметр апарату, м.

Із стандартного ряду приймаємо  $d_M=450$  мм.

Висота лопасті:

$$h_M = 0,2 \cdot d_M = 0,2 \cdot 0,45 = 0,09 \text{ м}$$

Довжина лопасті:

$$l = 0,25 \cdot d_M = 0,25 \cdot 0,45 = 0.1125 \text{ м}$$

Висота від днища до мішалки:

$$h = 1 \cdot d_M = 1 \cdot 0,45 = 0,45 \text{ м}$$

Стандартне число обертів мішалки згідно з обраною технологією  $n = 200$  об/хв  $= 3,33$  об/с.

Обираємо днище:

$$V_d = 888,7 \text{ дм}^3 - \text{об'єм днища.}$$

$h_1 = 0,04$  м - висота основи еліптичного днища.

$S = 14$  мм – товщина стінки еліптичного днища.

$$F = 3,74 \text{ м}^3$$

$h_b = 0,45$  м – висота еліптичної частини днища.

Повний об'єм ферментера:

$$V = V_{\text{ц}} + 2V_{\text{дн}}$$

Відповідно, об'єм циліндричної частини:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{н}} - 2V_{\text{дн}} = 6,3 - 2 \cdot 0,8887 = 4,5 \text{ м}^3$$

Висота циліндричної частини:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D^2} = \frac{4,5 \cdot 4}{\pi \cdot 1,8^2} = 1,76 \text{ м}$$

Висота рівня рідини в циліндричній частині:

$$H_{\text{цр}} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D^2} \cdot K_3 = \frac{4,5 \cdot 4}{\pi \cdot 1,8^2} \cdot 0,7 = 1,24 \text{ м}$$

Повна висота днища:

$$H_{\text{дн}} = h_1 + h_b = 0,04 + 0,45 = 0,49 \text{ м}$$

Висота стовпа рідини:

$$H_{\text{р}} = H_{\text{цр}} + H_{\text{дн}} = 1,24 + 0,49 = 1,73 \text{ м}$$

Загальна висота ферментера:

$$H_{\text{ферм}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot H_{\text{дн}} = 1,76 + 2 \cdot 0,49 = 2,74 \text{ м}$$

### Розрахунок воронки

Параметр висоти завантаження апарату:

$$(\Gamma)\gamma = 8 \frac{H_{\text{р}}}{D} + 1 = 8 \frac{1,73}{1,8} + 1 = 8,68$$

Параметр гідравлічного опору мішалки:

									Арк.
									63
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				



діаметр барботеру:

$$d_{б.вн.} = \sqrt{\frac{4 \cdot V_{\Gamma}}{W_0 \cdot \pi}} = \sqrt{\frac{4 * 1,225 * 10^{-3}}{24 * 3,14}} = 0,008 \text{ м}$$

Середній діаметр барботера:

$$D_{ср} = 6 \cdot d_{б.вн.} = 6 \cdot 0,008 = 0,048 \text{ м}$$

Кількість отворів у барботері:

$$z = \frac{4 \cdot V_{\Gamma}}{W_0 \cdot \pi \cdot d_0^2} = \frac{4 * 1,225 * 10^{-3}}{24 \cdot 3,14 \cdot 0,002^2} = 16 \text{ шт}$$

$d_0 = 0,002 \text{ м}$  – діаметр газорозподільчих пристроїв.

Приймаємо кількість отворів у барботері = 20 шт.

Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера:

$$S_{отв} = \frac{\pi}{4} \cdot d_0^2 \cdot z = \frac{3,14}{4} \cdot 0,002^2 \cdot 20 = 6,28 * 10^{-5} \text{ м}^2$$

Абсолютний тиск в апараті:

$$P = 0,1 + p_n + H_p \cdot \rho \cdot g \cdot 10^{-6} = 0,1 + 0,04 + 1,73 \cdot 1034,8 \cdot 9,81 \cdot 10^{-6} \\ = 0,04 \text{ МПа}$$

### Тепловий розрахунок реактору

Приймаємо, що у ферментер буде вноситись 10% посівного матеріалу, тоді об'єм посівного матеріалу:

$$V_{пм} = 0,1 \cdot V_p = 0,1 \cdot 4,41 = 0,441 \text{ м}^3$$

Об'єм поживного середовища:

$$V_{пс} = 0,9 \cdot V_p = 0,9 \cdot 4,41 = 3,969 \text{ м}^3$$

Маса поживного середовища:

$$M_{пс} = \rho_{пс} \cdot V_{пс} = 1034,8 \cdot 3,969 = 4107 \text{ кг}$$

Маса посівного матеріалу:

$$M_{пм} = \rho_{пм} \cdot V_{пм} = 1200 \cdot 0,441 = 529,2 \text{ кг}$$

$\rho_{пм}$  – густина посівного матеріалу,  $\text{г/дм}^3$ , приймаємо рівною 1200  $\text{г/дм}^3$

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		65

Маса культуральної рідини:

$$M_{кр} = \rho_{кр} \cdot V_{кр} = 1200 \cdot 4,41 = 5292 \text{ т}$$

$\rho_{кр}$  – густина культуральної рідини, г/дм<sup>3</sup>, приймемо рівною 1200 г/дм<sup>3</sup>

### Баланс надходжень

Початкова температура поживного середовища складає 20С.

За поживним середовищем:

$$E_{пс} = M_{пс} \cdot c_{пс} \cdot t_{пс} = 4107 \cdot 3,920 \cdot 10^3 \cdot 30 = 483 \text{ МДж}$$

За посівним матеріалом:

$$E_{пм} = M_{пм} \cdot c_{пм} \cdot t_{пм} = 529,2 \cdot 3,92 \cdot 10^3 \cdot 30 = 62,2 \text{ МДж}$$

Від механічного перемішування:

$$E_{дис} = N \cdot T_{пер} = 705 \cdot 24 \cdot 60 = 1,01 \text{ МДж}$$

Теплота реакції від згорання цукрів:

$$E_p = \frac{4013 \cdot 16,7 \cdot 10^3}{24} = 2,79 \frac{\text{МДж}}{\text{год}}$$

Де,  $r_c = 16,7 \cdot 10^6 \frac{\text{Дж}}{\text{кг}}$  – теплота згорання цукрів.

Надходження теплоти:

$$\sum E_{надх} = E_{пс} + E_{пм} + E_{дис} + E_p = 483 + 62,2 + 1,01 + 2,79 = 549 \text{ МДж}$$

### Баланс витрат

За культуральною рідиною:

$$E_{кр} = M_{кр} \cdot c_{кр} \cdot t_{кр} = 5292 \cdot 3,92 \cdot 10^3 \cdot 30 = 622 \text{ МДж}$$

Втрати тепла:

$$E_{втр} = 0,02 \cdot E_{кр} = 0,02 \cdot 622 = 12,44 \text{ МДж}$$

Втрати теплової енергії:

$$\sum E_{витр} = E_{кр} + E_{втр} = 622 + 12,44 = 634,44 \text{ МДж}$$

Теплове навантаження

$$E_T = E_{витр} - E_{надх} = 634,44 - 549 = 85,44 \text{ МДж,}$$

									Арк.
									66
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				

Відповідно, відбувається процес нагрівання середовища, теплоносії буде охолоджуватись.

Отже, для підтримання температури культивування потрібно його нагрівати.

### Розрахунок параметрів тепловіддачі і теплопередачі

Теплофізичні параметри середовища при  $t=28^{\circ}\text{C}$  було розраховано в підрозділі 5.2.1.

$$\rho_c = 1034,8 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$$

$$\mu_c = 1.08 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$$

$$\nu_c = 1.04 \cdot 10^{-6} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}$$

$$c_c = 3.920 \frac{\text{кДж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$$

$$\lambda_c = 0,486 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$$

Приймаємо початкову та кінцеву температури теплоносія 40 та 38С.

Теплофізичні параметри теплоносія (води) при  $t = \frac{40+38}{2} = 39^{\circ}\text{C}$ :

$$\rho_T = 992,4 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3}$$

$$C_T = 4180 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$$

$$\mu_T = 0,671 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$$

$$\lambda_T = 0,6324 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$$

$$\nu_T = 0,676 \cdot 10^{-6} \frac{\text{м}^2}{\text{с}}$$

Масові витрати теплоносія:

$$G_T = \frac{E_T}{\tau_{\text{проц}} \cdot C_T \cdot \Delta t} = \frac{85,44 \cdot 10^6}{96 \cdot 3600 \cdot 4180 \cdot (40 - 38)} = 0,03 \frac{\text{кг}}{\text{с}}$$

Об'ємні витрати теплоносія:

									Арк.
									67
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				



$$Re_T = \frac{W_T * d_{\text{екв}}}{\nu_T} = \frac{0,01 * 0,07}{0,676 * 10^{-6}} = 1035,5$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_T = \frac{\mu_T * c_T}{\lambda_T} = \frac{0,671 * 10^{-3} * 4180}{0,6324} = 4,43$$

Оскільки,  $Re_T < 10000$ , критерій Нуссельта визначаємо за наступною формулою:

$$Nu_T = 0,037 * Re_T^{0,8} * Pr_T^{0,43} = 0,037 * 1035,5^{0,8} * 4,43^{0,43} = 18,1$$

Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія в сорочці:

$$\alpha_T = \frac{Nu_T * \lambda_T}{d_{\text{екв}}} = \frac{18,1 * 0,6324}{0,07} = 163,5 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Коефіцієнт теплопередачі:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_T}} = \frac{1}{\frac{1}{2227,1} + \frac{0,014}{16} + \frac{1}{163,5}} = 134,4 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Розрахована поверхня теплообміну:

$$F_p = \frac{E}{K * \Delta t_{\text{ср}} * \tau_{\text{проц}}} = \frac{85,44 * 10^6}{134,4 * 15 * 96 * 3600} = 0,12 \text{ м}^2$$

$$\Delta t_M = 38 - 28 = 10^\circ\text{C}$$

$$\Delta t_G = 40 - 20 = 20^\circ\text{C}$$

$$\frac{\Delta t_G}{\Delta t_M} = \frac{20}{10} = 2$$

$$\Delta t_{\text{ср}} = \frac{10 + 20}{2} = 15$$

Дійсна поверхня теплообміну:

$$F_d = \pi D H_c = 3,14 * 1,8 * 1,24 = 7 \text{ м}^2$$

$$H_c = H_p - h_{\text{дн}} = 1,73 - 0,49 = 1,24 \text{ м}$$

Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата

## РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

У процесі виробництва кормового концентрату лізину виникають речовини, які є шкідливими. Тому необхідно дотримуватися строгих правил техніки безпеки, санітарних норм, технологічних режимів та вимог технологічних інструкцій.

Головним завданням у створенні безпечних умов праці є профілактика та попередження небезпечних ситуацій. Працівники, які займаються роботами підвищеної небезпеки, повинні проходити спеціальне навчання та перевірку знань з охорони праці щороку згідно з вимогами галузевих нормативних актів.

Першочерговим завданням є забезпечення безпеки працівників від небезпечних і шкідливих виробничих чинників, таких як токсичність сировини, запиленість та загазованість повітря, пожежі, вибухи, шум та вібрація на робочому місці, недоліки освітлення, некомфортні умови температури, вологості та руху повітря, електробезпека машин і обладнання.

Для забезпечення безпеки на підприємстві потрібно також вирішити такі завдання: уникнення негативного впливу на довкілля, захист від небезпек і попередження впливу негативних факторів на людину, ліквідація наслідків впливу небезпечних і шкідливих факторів, створення комфортних умов існування [29].

Дотримання безпечних умов праці вимагає контролю над вмістом шкідливих речовин в повітрі робочої зони та параметрами мікроклімату. Норми, встановлені в стандартах і регуляторних документах, визначають допустимі значення цих параметрів.

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Ворона А.В.</i>			<i>РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>							70	82
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>		<i>Маринченко Л.В.</i>						
<i>Затверд.</i>								
						<i>НТУУ "КПІ ім. Ігоря Сікорського" ФБТ</i>		

Наприклад, щодо якості повітря в робочій зоні, нормативи визначені у документі "Чисті приміщення та пов'язані з ними контрольовані середовища. Частина 1. Класифікація чистоти повітря." Цей документ регулює вміст шкідливих речовин.

Для рівнів шуму та вібрації, що створюються механізмами на робочих місцях, використовуються вимоги, встановлені у ДСН 3.3.6.037-99 "Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку."

Освітлення на робочих місцях повинно відповідати нормам освітленості згідно з ДБН В.2.5-28-2006 "Природне і штучне освітлення". Мінімальне значення освітленості повинно бути не менше 30 лк (люкс).

Заходи для попередження небезпечних ситуацій, пов'язаних з роботою, регулюються нормами, встановленими в ДСТУ Б А.3.2-13:2011 "Система стандартів безпеки праці. Будівництво" та ДСТУ Б В.2.2-29: 2011 "Будівлі підприємств. Параметри." Ці норми застосовуються при підготовці, виконанні заміни вузлів апаратури, реорганізації будівництва, новому будівництві та технічному переобладнанні.

Культивування мікроорганізмів також потребує контролю над умовами. Нормальні умови працівників у біотехнологічній та мікробіологічній промисловості забезпечуються за допомогою притоково-втяжної вентиляції та інших заходів. Наприклад, повітря, що подається в приміщення, має відповідну вологість та температуру, а приміщення повинні бути захищені від пилу та мікроорганізмів. Додатково рекомендується використовувати вологе прибирання підлоги та вживати інші санітарні заходи, наприклад, використовувати спеціальні керамічні плитки для поліпшення санітарних умов.

Остаточо, на виробництві слід проводити регулярний та суворий контроль наявності токсичних речовин та мікроорганізмів в повітрі. Дотримання цих заходів сприяє безпеці працівників та запобігає можливим негативним наслідкам [30].

									Арк.
									71
Зм..	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ДП БМ91. 02.000 ПЗ				



(не більше 1%) зі швидкістю не більше 1 м/с. Відкачування вакууму здійснюється за допомогою стиснутого азоту.

- Відбір проб з апаратів повинен здійснюватися лише після повного зупинення руху рідин [31].

Основою для забезпечення пожежної безпеки у приміщеннях підприємств є два документи: ДСТУ 3273-95 "Безпечність промислових підприємств" та НАПБ Б.03.002-2007 "Норми визначення категорій приміщень, будинків та зовнішніх установок за вибухопожежною та пожежною небезпекою". Згідно цих документів можна класифікувати основні виробничі приміщення з пожежо- та вибухобезпечністю. Наприклад, відділення підготовки сировини, культивування та сушіння я відносяться до різних категорій залежно від рівня пожежної та вибухонебезпеки.

З метою забезпечення безпеки роботи з обслуговування механізмів з рухомими частинами, необхідно мати належні огорожувачі та проводити замір рівнів у відповідних апаратах при повністю зупиненому руху рідини в замкнутих окулярах.

Для запобігання термічним опікам, паропроводи та обладнання, що працюють при підвищених температурах, повинні мати достатню ізоляцію, яка не допускає перегрівання зовнішнього шару ізоляції до температури, що перевищує 40°C.

Робота працівників у виробничих приміщеннях, де виробляють лізин, відноситься до середньої категорії тяжкості виконуваних робіт. З метою забезпечення нормальних умов мікроклімату, необхідно передбачити приміщення для відпочинку та обігріву, регламентувати час роботи з перервами, скороченням робочого дня та збільшенням тривалості відпустки.

На підприємствах велику увагу приділяють пожежній безпеці. Під час

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		73



шкідливі речовини, які потрапляють у навколишнє середовище під час процесу виробництва. Ці речовини мають негативний вплив на людину та навколишнє середовище.

У відповідь на законодавчі та регуляторні вимоги уряду або з ініціативи самої галузі, було розроблено різні методики для зменшення негативного впливу промисловості на кожному етапі виробництва. Ці методики включають використання спеціального обладнання для контролю забруднення, розробку процесів з метою мінімізації викидів та заборону або обмеження використання певних шкідливих речовин.

Охорона довкілля виробництва кормового концентрату лізину включає кілька аспектів. Перш за все, важливо зменшити використання сировинних матеріалів, енергії та води шляхом впровадження ефективних технологій та процесів.

Основними джерелами забруднення навколишнього середовища під час виробництва кормового концентрату лізину є:

Стічні води. У процесі виробництва утворюються стічні води, які можуть містити різні хімічні речовини, органічні сполуки та інші забруднюючі речовини. Ці стічні води потребують належної обробки та очищення перед викидом у природне середовище, щоб запобігти забрудненню водних ресурсів.

Викиди в атмосферу. В процесі виробництва можуть виникати викиди пилу, газів, парів шкідливих речовин, які можуть негативно впливати на якість повітря. Ці забруднюючі речовини можуть мати шкідливий вплив на здоров'я людей і навколишнє середовище. Для зменшення викидів і контролю якості повітря застосовуються відповідні очисні системи та технології.

Тверді відходи. Виробництво кормового концентрату лізину може призводити до утворення твердих відходів, таких як відпрацьоване поживне середовище, залишки біомаси та інші матеріали. Відходи потребують

належного управління та обробки, щоб запобігти їх негативному впливу на навколишнє середовище.

Для зменшення негативного впливу на навколишнє середовище виробники кормового концентрату лізину використовують різні екологічно орієнтовані підходи, включаючи впровадження ефективних систем очищення стічних вод, контроль викидів, використання енергоефективних технологій та управління відходами.

Аналізуючи вплив відходів при виробництві кормового концентрату лізину на навколишнє середовище, рекомендовано дотримуватись наступної системи запобіжних заходів для забезпечення безпеки для довкілля:

Використання технологій очищення стічних води. Встановити ефективну систему очищення стічних вод, що дозволяє усунути або мінімізувати концентрацію шкідливих речовин та органічних забруднень перед їх викидом у природне середовище. Для цього можна використовувати методи біологічного очищення, активоване вугілля, фільтрацію тощо.

Контроль викидів в атмосферу: Забезпечити встановлення та ефективну роботу системи очистки газів від шкідливих речовин, що утворюються під час виробництва. Використання фільтрів, сорбентів або інших технологій для уловлювання та зменшення викидів пилу, газів та парів шкідливих речовин у атмосферу.

Управління твердими відходами. Розробити систему управління твердими відходами, що включає їх збір, сортування та відповідну обробку. Застосування методів переробки, які дозволяють зменшити обсяг відходів, наприклад, компостування, біогазифікацію або використання відходів у якості добрив або енергетичного джерела [33,34].

## ВИСНОВКИ

1. У результаті аналізу наукових літературних даних щодо досягнень у біотехнології отримання лізину було виявлено значний прогрес у цій галузі. Різноманітні методи, включаючи генномодифікацію штамів та оптимізацію процесу культивування, сприяють підвищенню виходу лізину. В результаті літературного пошуку визначено оптимальні умови ферментації, такі як температура 30 °С, рН 7,5, t= 96 годин з витратою повітря 1,0 vvm та швидкістю аерації 200 об/хв

2. У ході розгляду методів отримання промислових штамів та аналізу їх морфолого-фізіологічних та культуральних особливостей, було встановлено, що вибір ефективного продуцента виробництва має велике значення для успішної біотехнологічної процесу. У результаті обрано штам *C. glutamicum* ATCC 13032, створений за допомогою методу CRISPRi. Цей штам є більш вигідним для виробництва, оскільки його стабільність генетично та відсутність ауксотрофії зроблять його більш зручним та менш залежним від зовнішніх умов.

3. В результаті розробки та опису ефективної технології виробництва кормового концентрату лізину відповідно до вимог дипломного проекту були визначені ключові етапи та параметри процесу, що сприяють досягненню високої якості продукту. При розробці технології було також визначено процедури контролю якості, включаючи фізико-хімічні та мікробіологічні аналізи, що дозволяють забезпечити стандартизацію та стабільність якості виробництва кормового концентрату лізину.

ДП БМ91. 02.000 ПЗ

Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ворона А.В.			ВИСНОВКИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.							77	82
Реценз.						НТУУ "КПІ ім. Ігоря Сікорського" ФБТ		
Н. Контр.		Маринченко Л.В.						
Затверд.								

4. Під час виконання креслень технологічної та апаратурної схеми для виробництва препарату кормового концентрату лізину було розроблено технічні рішення щодо устаткування.

5. Виконано технологічний, тепловий та конструктивний розрахунки ферментера для біосинтезу лізину. Також у результаті аналізу обрано відповідний ферментер, що буде задовольняти всі потреби культивування, а саме ферментер об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> з механічним перемішуючим пристроєм, обладнаний барботером та турбінною мішалкою

6. Під час розробки виробництва були враховані важливі аспекти охорони праці для забезпечення безпеки та здоров'я працівників. Були встановлені необхідні заходи щодо запобігання можливим ризикам та аварійним ситуаціям.

					<i>ДП БМ91. 02.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		78

## СПИСОК ДЖЕРЕЛ

1. Дехтяр Ю. Ф. Мікробіологічне виробництво кормів та кормових добавок : курс лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162 “Біотехнологія та біоінженерія” денної форми навчання / Ю. Ф. Дехтяр. – Миколаїв : МНАУ, 2017. – 99 с.  
[https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/2502/1/Mikrobiolohichne\\_vyr\\_obnytstvo\\_kormiv\\_ta\\_kormovykh\\_dobavok.pdf](https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/2502/1/Mikrobiolohichne_vyr_obnytstvo_kormiv_ta_kormovykh_dobavok.pdf)
2. МЕЛЯСА [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:  
<https://diamantsugar.com.ua/ua/page-melyasa>.
3. Меляса [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу:  
<https://flagma.ua/patoka-trostnikovaya-melassa-melyasa-1kg-1-ya-o12332476.html>.
4. ДСТУ 3696-98. Меляса бурякова. Технічні умови.
5. Food and Agriculture Organization (FAO) - "Environmental aspects of sugarcane cultivation and sugar processing".
6. United Nations Environment Programme (UNEP) - "Environmental Impact of Products (EIPRO) - Final Report".
7. Environmental Protection Agency (EPA) - "Environmental Impacts of the Sugar Industry".
8. Zhang Y, Huang J, Lin M, et al. "High-level production of L-lysine by engineering a deregulated GOGAT pathway in *Corynebacterium glutamicum*."
9. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. — К.: Фірма «ІНКОС», 2006. — 647 с.
10. Eggeling L. "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*." 2005.
11. Hockberger PE. "A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms." *Photochemistry and Photobiology*. Vol. 76(6), P. 561–79.
12. Auerbach C, Robson JM, Carr JG. "The Chemical Production of Mutations." *Science*. Vol. 105, 1947, P. 243–7.
13. Industrial production of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum*: Progress and prospects [Електронний ресурс] / Jie Liu, Jian-Zhong Xu, Zhi-Ming Rao // *Microbiological Research*. – 2022. – Режим доступу до ресурсу:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944501322001410>.

14. *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi) [Электронный ресурс] / Jaide Vold Korgaard Jensen, Volker F. Wendisch, Timothy K. Lu. – 2016. – Режим доступа до ресурсу: [https://www.researchgate.net/publication/292671474\\_Corynebacterium\\_glutamicum\\_metabolic\\_engineering\\_with\\_CRISPR\\_interference\\_CRISPRi](https://www.researchgate.net/publication/292671474_Corynebacterium_glutamicum_metabolic_engineering_with_CRISPR_interference_CRISPRi).

15. K. Madhavan Nampoothiri. Production of amino acids [Электронный ресурс] / K. Madhavan Nampoothiri, Vipin Gopinath, Kiran S Dhar – Режим доступа до ресурсу: [https://www.researchgate.net/publication/258225582\\_Production\\_of\\_amino\\_acids](https://www.researchgate.net/publication/258225582_Production_of_amino_acids).

16. *Corynebacterium glutamicum* [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=960923#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=960923#null)

17. Ikeda M., Nakagawa S. (2003). The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(2-3), 99-109.

18. Eggeling L., Bott M. (2005). *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press.

19. Becker J., Wittmann C. (2012). *Bio-based production*

20. Eggeling, L., Bott, M. (2005). *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press.

21. Ikeda, M. (2006). Metabolic engineering for the production of amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(5), 1335-1344.

22. Wendisch, V. F. (2014). Microbial production of amino acids and derived chemicals: synthetic biology approaches to strain development. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 51-58.

23. Грачева И. М., Гаврилова Н. Н., Иванова Л. А. *Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров*. — М.: Пищевая пром-сть, 1980, — 448 с.

24. ГОСТ Р 57198— 2016

25. Мінагрополітики закликає товаровиробників актуалізувати дані щодо кількості наявного поголів'я с/г тварин [Електронний ресурс] // Мінагрополітики. – 2023. – Режим доступу до ресурсу: <https://minagro.gov.ua/news/minagropolitiki-zaklikaye-tovarovirobnikiv-aktualizuvati-dani-shchodo-kilkosti-nayavnogo-pogolivya-sg-tvarin>.

26. Брагинский Л.Н. Перемешивание в жидких средах: Физические основы и инженерные методы расчета / Л.Н. Брагинский. – СПб.: Химия, 1984. – 336 с.

27. Гельперин Н.И. Основные процессы и аппараты химической технологии. В двух книгах. – М.: Химия, 1981 г. – 812 с., ил.

28. Соколов В. Н. Аппаратура микробиологической промышленности / В.Н.Соколов, М. А. Яблокова. – СПб.: Машиностроение, 1988. – 278 с.

29. Про затвердження Типового положення про порядок проведення навчання і перевірки знань з питань охорони праці та Переліку робіт з підвищеною небезпекою [Електронний ресурс]. – 2007. – Режим доступу до ресурсу: [https://ips.ligazakon.net/document/view/re10511?an=481&ed=2007\\_11\\_16](https://ips.ligazakon.net/document/view/re10511?an=481&ed=2007_11_16)

30. Макаров Г. В. Охрана труда в химической промышленности / Г.В. Макаров. - М.: Химия, 1989. – 233с.

31. Жидецький В.Ц. Практикум з охорони праці / В.Ц. Жидецький, В.С. Джигирей, В.М. Сторожук, Л.В. Туряб. – Львів, 2000 – 350 с. 40. Юдин Е. Я. Охрана труда в машиностроении / Е.Я. Юдин. – М.: Машиностроение, 1983. – 432 с.

32. Маринченко В.А. Технология спирта из мелассы / В.А. Маринченко, Б.Д. Метюшев, В.Н. Швец / Издательское объединение «Вища школа», 1975. – 284 с.

33. "Environmental Impact Assessment: A Practical Guide" - Betty Bowers Marriott, William B. Risen, Kathy L. Jones.

34. "Environmental Management in Practice: Vol. 2 - Compartments, Stressors and Sectors" - edited by Peter Matthies, Henner Hollert, Andreas Schäffer, Thomas

Braunbeck.