

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему:
«Технологія біосинтезу лізину»

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія

Виконав: студент групи ББТ-21

Петров П. В.

Науковий керівник:

к.т.н., доц. Охмат О. А.

Рецензент: к.т.н., доц. Волошина І. М.

Київ 2025

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>перший (бакалаврський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА

«___» _____ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ**

Петрову Павлу Вадимовичу

1. Тема кваліфікаційної роботи: Технологія біосинтезу лізину
науковий керівник роботи Охмат Олена Анатоліївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «05» березня 2025 року № 50-уч.
2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова та технічна література щодо технології біосинтезу лізину; технологічні схеми промислового отримання лізину.
3. Зміст кваліфікаційної роботи: техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва, характеристика біологічного агента, опис технологічної схеми, контроль якості, висновки, список використаних джерел, додаток.
4. Дата видачі завдання 05.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Техніко-економічне обґрунтування		
3	Розділ 2 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва		
4	Розділ 3 Характеристика біологічного агента		
5	Розділ 4 Опис технологічної схеми		
6	Розділ 5 Контроль якості		
7	Висновки		
8	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)		
9	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку (за 14 днів до захисту)		
10	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 12 днів до захисту)		
11	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		Коефіцієнт подібності ____% Коефіцієнт цитування ____%
12	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Павло ПЕТРОВ

Науковий керівник _____ Олена ОХМАТ

АНОТАЦІЯ

Петров П.В. Технологія біосинтезу лізину – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 «Біотехнологія та біоінженерія». – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2025 рік.

Кваліфікаційну роботу присвячено технології виробництва лізину за допомогою продуценту *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 у відповідності до техніко-економічного обґрунтування.

У роботі розрахована потужність виробництва, обґрунтований вибір біологічного агенту, визначений оптимальний склад поживного середовища та наведені умови культивування, обрано технологічне обладнання для реалізації стадії біосинтезу. Основні етапи технологічної схеми біосинтезу лізину налічують стадію допоміжних робіт, стадію здійснення технологічного процесу, стадію контролю.

Ключові слова: лізин, амінокислота, Corynebacterium glutamicum ZL-92, біосинтез, продуцент, культивування.

ABSTRACTS

Petrov P.V. Technology of Lysine Biosynthesis – Manuscript.

Qualification work in the specialty 162 «Biotechnology and bioengineering». – Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, 2025.

The qualification work is devoted to the technology of lysine production using the producer *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 in accordance with the feasibility study.

The work calculates the production capacity, justifies the choice of a biological agent, determines the optimal composition of the culture medium and provides the cultivation conditions, and selects the technological equipment for the biosynthesis stage. The main stages of the technological scheme of lysine biosynthesis include the stage of auxiliary work, the stage of technological process implementation, and the stage of control.

Keywords: lysine, amino acid, Corynebacterium glutamicum ZL-92, biosynthesis, producer, cultivation.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	4
ABSTRACTS.....	5
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1	11
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	11
1.1 Характеристика лізину	11
1.2 Потреба у цільовому продукті.....	12
1.3 Розрахунок потужності виробництва	13
1.3.1 Розрахунок кількості лізину для забезпечення потреб сільськогосподарської промисловості	13
1.3.2 Розрахунок потужності виробництва лізину <i>Corynebacterium glutamicum</i> ZL-92	14
РОЗДІЛ 2	16
ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ.....	16
СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА.....	16
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища.....	16
2.1.1. Обґрунтування вибору біологічного агента.....	16
2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу.....	22
2.2.1 Обґрунтування вибору ферментера	22
2.2.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	23
2.2.3 Вибір миючих та дезінфікуючих засобів	24
РОЗДІЛ 3	27
ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	27
3.1 Таксономічний статус.....	27
3.2 Морфолого-культуральні властивості	27
3.3 Фізіолого-біологічні ознаки	28
3.4 Отримання штаму <i>Corynebacterium glutamicum</i> ZL-92.....	28
РОЗДІЛ 4	29
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	29
РОЗДІЛ 5	42

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	42
5.1 Методи контролю лізину.....	42
5.2 Методи контролю посівного матеріалу	42
5.3 Методи контролю на стадії біосинтезу.....	43
5.4.1 Хіміко-технологічний контроль	44
5.5 Мікробіологічний контроль.....	46
ВИСНОВКИ.....	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	49
ДОДАТОК.....	52

ВСТУП

Актуальність теми. Виробництво лізину є одним з провідних напрямків сучасної біотехнологічної промисловості, що зумовлено високим попитом на цю незамінну амінокислоту в різних галузях народного господарства.

Лізін застосовується як ефективна кормова добавка у тваринництві, оскільки більшість рослинних кормів містить недостатню кількість цієї амінокислоти, що обмежує ріст та продуктивність тварин. Додавання лізину до раціону тварин дозволяє збалансувати амінокислотний склад корму, підвищити конверсію поживних речовин та збільшити приріст живої маси [1].

Фармацевтична галузь використовує лізін для виробництва лікарських препаратів та дієтичних добавок, дія яких спрямована на відновлення білкового балансу, покращення імунітету та стимуляцію регенеративних процесів в організмі. Застосування лізину в медичній практиці постійно розширюється завдяки виявленню нових терапевтичних властивостей цієї амінокислоти [1].

В Україні лізін у якості субстанції біологічно активної речовини переважно імпортується, що створює залежність від зарубіжних виробників та збільшує вартість виробництва і, відповідно, продукції. Розробка та впровадження вітчизняних біотехнологій виробництва лізину дозволить знизити собівартість продукції, забезпечити стабільність постачання на внутрішній ринок та створити нові робочі місця [1].

Серед різних мікроорганізмів, які використовуються для промислового отримання лізину, особливу увагу привертає штам *Corynebacterium glutamicum* ZL-92, який характеризується високою продуктивністю, генетичною стабільністю та здатністю синтезувати до 201,6 г/л лізину за 40 годин культивування. Це робить його перспективним продуцентом для організації ефективного виробництва [1].

Впровадження сучасних технологій біосинтезу лізину з використанням високопродуктивних штамів сприяє розвитку біоекономіки, що базується на відновлюваних ресурсах та екологічно чистих виробничих процесах. Це відповідає сучасним тенденціям сталого розвитку та захисту навколишнього середовища.

Мета. Обґрунтування та розробка раціональної технології промислового виробництва лізину з використанням штаму *Corynebacterium glutamicum* ZL-92.

Завдання дослідження:

1. Провести аналіз біохімічних основ синтезу лізину мікроорганізмами та визначити переваги культивування *C. glutamicum* ZL-92 як промислового продуцента.
2. Обрати оптимальний склад поживного середовища та режими культивування *C. glutamicum* ZL-92 для максимального накопичення лізину.
3. Визначити раціональні параметри біосинтезу лізину, розробити та обґрунтувати технологічну схему виробництва.
4. Обґрунтувати методи контролю параметрів біосинтезу та якості на виробництві.

Об'єкт дослідження – закономірності біосинтезу лізину при культивуванні штаму *C. glutamicum* ZL-92.

Предмет дослідження: технологія біосинтезу лізину за умови використання штаму *C. glutamicum* ZL-92.

Методи дослідження. Використано методи опису, порівняння та узагальнення науково-технічних даних.

Практичне значення роботи обумовлюється широкою практикою застосування лізину в агропромисловому комплексі.

Новизна роботи полягає у виборі високопродуктивного штаму *C. glutamicum* ZL-92 для промислового виробництва L-лізину.

Апробація наукових результатів. Участь у роботі Міжнародної наукової конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» (ДБУ, Харків, 14–15 травня 2025 р.).

Публікації. Петров П. В., Бруслік Д. Д., Волошина І. М. Важлива роль лізину та метіоніну у тваринництві. *Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування* : матеріали Міжнар. наук. конф. (Харків, 14–15 травня 2025 року). Харків : ДБУ, 2025. Друк.

Структура і обсяг роботи. Обсяг основної частини кваліфікаційної роботи складає 48 аркушів, що містять вступ, 5 розділів, висновки, список використаних джерел, додаток. Графічна частина (технологічна схема) роботи розміщена на аркуші формату А1.

РОЗДІЛ 1

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

1.1 Характеристика лізину

Лізин є незамінною амінокислотою, яка є складовою майже всіх білків тваринного і рослинного походження. Хімічна структура лізину (S)-2,6-діаміногексанова кислота, яка належить до полярних основних амінокислот. Його молекулярна формула – $C_6H_{14}N_2O_2$. Структура формула лізину зображена на рис.1.1 [2].

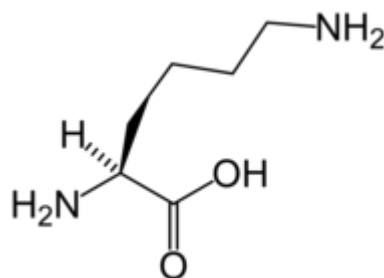


Рисунок 1.1 – Структурна формула лізину

Дана амінокислота має ізоелектричну точку 9,74 та температуру плавлення 224°C , що визначає її фізико-хімічні властивості при промисловому виробництві [2].

З точки зору фізичних характеристик, лізин є кристалічним порошком або гранулами білого або світло-коричневого кольору. Він добре розчиняється у воді, але має обмежену розчинність в етанолі та практично нерозчинний в органічних розчинниках, таких як ефір або бензол. Ця амінокислота має дві основні групи – аміногрупу ($-\text{NH}_2$) на альфа-вуглеці та додаткову аміногрупу на е-вуглеці, що надає лізину основних властивостей і здатності утворювати іони залежно від pH середовища [2].

Амінокислота є оптично активною сполукою і може існувати у вигляді L- та D-форм, проте біологічно активною є саме L-форма. Ця особливість має вирішальне значення для виробничих процесів, де потрібно забезпечити синтез саме L-форми для подальшого практичного застосування. У метаболізмі організму лізин бере участь у синтезі білків, метаболізмі

вуглеводів, допомагаючи виробляти енергію шляхом перетворення на ацетил-КоА, а також сприяє утворенню L-карнітину [2].

1.2 Потреба у цільовому продукті

У промисловості лізин знаходить широке застосування у різних галузях. У харчовій промисловості він використовується як підсилювач смаку, ароматизатор, антиоксидант і харчова добавка для поліпшення білкової якості продуктів. Рекомендована добова норма споживання лізину для дорослих становить від 800 до 3000 мг, що визначає потреби ринку в даній амінокислоті [2].

У сільському господарстві лізин застосовується як кормова добавка, оскільки багато кормів мають недостатню кількість цієї незамінної амінокислоти, що обмежує ріст тварин. Додавання лізину в харчовий раціон тварин відбувається у кількості близько 1-2 % від денного споживання корму, при цьому дозування залежить від віку та маси тварини. Дефіцит лізину в раціоні може призвести до уповільнення росту молодняку, зниження його продуктивності, зменшення кількості еритроцитів та рівня гемоглобіну в крові [2, 3].

У фармацевтичній промисловості лізин використовується для виробництва лікарських препаратів і дієтичних добавок. В Україні лізин у якості субстанції біологічно активної речовини не виробляється, а закуповується у зарубіжних виробників, таких як Ajinomoto Co, Kyowa Hokko (Японія), ADM (США), Degussa-Huels, BASF (Німеччина). Це визначає актуальність розробки вітчизняних біотехнологій виробництва лізину [1, 2]

Хімічна промисловість використовує лізин як вихідну речовину для синтезу полімерів і виробництва косметичних засобів. Медична галузь застосовує лізин для відновлення синтезу білків і регенерації тканин після операцій. Лізин також має здатність стимулювати синтез колагену та еластину, що обумовлює його застосування в дерматології та косметології [2].

Лізін у промислових масштабах отримують різними методами, зокрема через екстракцію з білкових гідролізатів, хімічний синтез або мікробіологічний синтез. Мікробіологічний метод вважають найперспективнішим та економічно вигідним, оскільки він дозволяє використовувати поновлювану сировину. Цей метод базується на здатності мікроорганізмів синтезувати амінокислоти з простих вуглеводів та неорганічних джерел азоту [3].

Технологія мікробіологічного синтезу лізину базується на використанні ауксотрофних мутантних штамів, отриманих за допомогою селекції або генетичної інженерії. Найбільш поширеними продуцентами є бактерії родів *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* та *Brevibacterium flavum*. Ці мікроорганізми характеризуються високою продуктивністю, генетичною стабільністю, швидким ростом і здатністю використовувати недорогі компоненти середовища. Розвиток біотехнології виробництва лізину дозволяє збільшити обсяги його виробництва, зменшити його собівартість і підвищити якість цільового продукту. Це робить лізін доступнішим для різних галузей промисловості та сприяє розширенню сфер його застосування [1].

1.3 Розрахунок потужності виробництва

1.3.1 Розрахунок кількості лізину для забезпечення потреб сільськогосподарської промисловості

Оскільки лізін входить до складу різних комбікормів, які користуються широким попитом, а різні господарства застосовують різні технології відгодівлі та типи комбікормів, для оцінки потреби у виробництві лізину проаналізуємо свиноферми Київської області. Вивчивши господарства регіону, що займаються свинарством, можна виділити три найбільші: СП ТОВ «Нива Переяславщини», ДП «Ферми Данам» та ТОВ «Агропромисловий комплекс Насташка». Усі вони використовують однакові комбікорми з вмістом лізину 9 г на 1 кг продукту [4].

Наразі в Україні відсутні підприємства, що виробляють чистий порошок лізину, і більшість продуктів виготовляють з імпортованої сировини. Конкурентами в цій галузі є такі закордонні компанії як Ajinomoto Co, Kyowa Hokko, ADM, Degussa-Huels, BASF та інші.

Розрахунки роботи будемо ґрунтувати на виробництві такої кількості лізину, яку будемо виготовляти для потреб Київської області. Враховуючи всіх конкурентів, які забезпечують всі області України, ми орієнтовно займемо 2,5% вітчизняного ринку лізину.

Згідно дослідних даних на три підприємства Київської області припадає 4600 голів свиней.

Згідно інструкції по використанню комбікорму, витрати корму становлять 3 кг на тварину в день, тривалість годування даним комбікормом складає 30 днів.

Відповідно, на одну свиню на курс відгодівлі потрібно:

$$3 \text{ кг} * 30 \text{ днів} = 90 \text{ кг комбікорму.}$$

Враховуючи, що на 3-х господарствах Київської області на рік 4600 голів свиней, тому на весь курс відгодівлі потрібно:

$$90 \text{ кг комбікорму} * 4600 \text{ голів} = 414\,000 \text{ кг комбікорму на весь курс відгодівлі.}$$

Отже, враховуючи, що в 1 кг комбікорму міститься 9 г лізину, розрахуємо річну потребу у цільовому продукті:

$$1 \text{ кг} - 0,009 \text{ кг лізину}$$

$$414\,000 - X.$$

$$X = 3728 \text{ кг лізину на рік.}$$

1.3.2 Розрахунок потужності виробництва лізину *Corynebacterium glutamicum* ZL-92

Продуцент *C. glutamicum* ZL-92 за 40 годин синтезує 201,6 г/л лізину. Визначаємо об'єм культуральної рідини, необхідний для отримання 3728 кг лізину:

$$V_{кр0}=3728000: 201,6=18492 \text{ л}$$

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

$$V_{кр}=18492:(1-0,2)=23115 \text{ л}$$

1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання необхідного об'єму культуральної рідини для забезпечення річної потреби в цільовому продукті та розрахунок об'єму ферментера

Враховуючи кількість культуральної рідин проводимо розрахунки, де Трд (робочі дні) 365, Vд (кількість продукту на добу):

$$V_{д} = V_{кр}/T_{рд} = 23115:365=63,4\text{л (за добу)}$$

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_{д} \times T_{цф})/24) = 23115 / ((63,4 \times 49):24) = 178,9 = 179 \text{ циклів}$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл (Vкрц)

$$V_{крц} = (K_1 \times V_{д} \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 63,4 \times 49) / 24 = 142,4 \text{ л}$$

Загальний об'єм ферментера для отримання 142.4 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,2 має становити

$$V_{Г} = V_{крц} / K_{зап} = 142,4 / 0,2 = 712 \text{ л}$$

Реальний об'єм ферментера, необхідний для культивування – 1 м³.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища

2.1.1. Обґрунтування вибору біологічного агента

На світовому ринку біотехнологічного виробництва лізину використовується кілька видів мікроорганізмів, серед яких найбільш поширеними є представники родів *Corynebacterium*, *Brevibacterium* та *Escherichia*. Кожен з цих мікроорганізмів має свої переваги та недоліки з точки зору промислового застосування, продуктивності, технологічності та економічної ефективності [5].

Corynebacterium glutamicum є одним з основних промислових продуцентів лізину. Це грампозитивна, нерухома, аеробна паличкоподібна бактерія, яка має розміри 2-3 мікрметри під час активного росту. Клітинна стінка *C. glutamicum* забезпечує стійкість до осмотичного тиску та механічну стабільність клітини. Ця бактерія відзначається швидким ростом на простих середовищах, відсутністю спороутворення та високою стійкістю до стресових умов культивування [5, 6].

Ще одним промисловим продуцентом лізину є *Brevibacterium flavum*. Цей мікроорганізм таксономічно близький до *C. glutamicum* і також активно використовується у промисловому виробництві лізину. *B. flavum* характеризується здатністю рости на різноманітних субстратах, включаючи м'ясо, гідролізати крохмалю та інші аграрні відходи, що робить його привабливим з економічної точки зору [5].

Escherichia coli також використовується для промислового виробництва лізину, хоча й менш широко, ніж представники родів *Corynebacterium* та *Brevibacterium*. Перевагами *E. coli* як продуцента є швидкий ріст, добре вивчена генетика та фізіологія, а також розвинені методи генетичної

інженерії для цього організму. Проте, недоліками є наявність ендотоксинів у клітинній стінці, що ускладнює очищення продукту, та менша природна здатність до накопичення амінокислот порівняно з *C. Glutamicum* [1, 5].

Вибір продуцента залежить від багатьох факторів, включаючи доступність сировини, технологічні можливості виробництва та цільове призначення кінцевого продукту. Для оцінки ефективності використання у біосинтезі лізину обрано три високопродуктивні штами: *C. glutamicum* ZL-92, *C. glutamicum* K-8, *B. flavum* 90 Н [5]. Порівняльна характеристика різних продуцентів представлена в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів лізину

Продуцент	Склад поживного середовища	Вихід продукту, г/л	Умови культивування	Джерело
<i>C. glutamicum</i> ZL- 92	Глюкоза – 80 Бурякова патока – 40 Кукурудзяний екстракт – 30 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 45 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 1,5 KH ₂ PO ₄ – 1 FeSO ₄ – 0,02 MnSO ₄ – 0,02 нікотинамід – 8 мг біотин – 850 мкг тіамін-HCl – 850 мкг	201,6	pH – 6,9; t = 30 °C, 56 год 0.7 vvm	Xu, J.-Z., Yu, H.-B. Metabolic engineering of glucose up take systems in <i>Corynebacterium glutamicum</i> for improving the efficiency of l-lysine production. <i>Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology</i> . 2019. doi:10.1007/s10295-019-02170-w
<i>C. glutamicum</i> K-8	Глюкоза – 80; бурякова патока – 40; кукурудзяний екстракт – 30; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 50; KH ₂ SO ₄ – 1,5; MgSO ₄ ×7 H ₂ O – 1; FeSO ₄ – 0,02; MnSO ₄ – 0,02; метіонін – 0,5; гліцин бетаїн – 0,05; біотин – 2,4 мг; тіамін-HCl – 400 мкг.	221,3	pH 6,9; t = 30 °C 40 год 0.7 vvm	Xu, J.-Z., Ruan, H.-Z. Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in <i>Corynebacterium glutamicum</i> for improving the efficiency of l- Lysine production from mixed sugar. <i>Microbial Cell Factories</i> . 2020, 19(1). doi:10.1186/s12934-020-1294-7

<i>B. flavum</i> 90 Н	М'яса - 140 Гідролізат кормових дріжджів - 55 Кукурудзяний екстракт - 20 NH_4Cl - 10 $(NH_4)_2HPO_4$ - 1 L-лейцин - 2 Біотин - 0,00025 Тіамін - 0,00025	102	перемішу вання 500 об/хв $t=32$ $pH=7$ 72 год	Патент УКР № 39807. Спосіб одержання l- лізину // Мариночкіна Лариса Іванівна, Краєва Наталія Кирилівна, Руських Анна Миколаївна, Василенко Наталія Іллівна, Лужков Олександр Михайлович, та інші., 15-06-2001.
--------------------------	--	-----	--	---

Штам *C. glutamicum* ZL-92, який є об'єктом дослідження, був отриманий шляхом серії мутацій та селекції на основі дикого штаму. Цей штам характеризується здатністю накопичувати до 201,6 г/л лізину при культивуванні протягом 40 годин, що робить його високопродуктивним порівняно з іншими штамми. Генетичні модифікації, введені в цей штам, включають мутації в регуляторних механізмах біосинтезу лізину, що призводять до посиленого синтезу цієї амінокислоти. *C. glutamicum* ZL-92 оптимально росте за температури 30°C в аеробних умовах, використовуючи глюкозу як основне джерело вуглецю та амонійні солі як джерело азоту. Штам ефективно адаптується до середовища із різноманітними поживними компонентами, включаючи як комплексні, так і мінімальні середовища. В певних умовах може утворювати біоплівки, які сприяють зміні його метаболічної активності [5].

Штам *B. flavum* 90Н здатний накопичувати до 102 г/л лізину при культивуванні протягом 72 годин. Порівняно з *C. glutamicum* ZL-92, цей штам має нижчу продуктивність (концентрація за годину становить 1,4 г/л/год проти 5 г/л/год для *C. glutamicum* ZL-92), але може бути більш економічно вигідним у деяких регіонах через здатність утилізувати локально доступні субстрати. Оптимальні умови культивування *B. flavum* включають температуру 32°C, pH середовища 7,0 та інтенсивне перемішування (500

об/хв). Поживне середовище для цього штаму зазвичай містить мелясу як джерело вуглецю, гідролізат кормових дріжджів та кукурудзяний екстракт як джерела амінокислот та вітамінів, а також неорганічні солі амонію як джерела азоту [6].

Генетично модифіковані штами *E. coli*, що використовуються для виробництва лізину, містять мутації в генах *lysA* (інактивація ліазинсинтази для блокування перетворення діамінопімелінової кислоти на інші продукти, окрім лізину) та *metA* (ауксотрофність за метіоніном для обмеження конкуруючих метаболічних шляхів). Такі штами здатні накопичувати до 85-95 г/л лізину при культивуванні протягом 36-48 годин [6].

Порівняємо вартість поживного середовища, необхідного для культивування обраних біологічних агентів (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Порівняльна характеристика вартості поживного середовища для культивування досліджуваних біологічних агентів

Продуцент	Компонент середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента, грн./1 л пс	Джерело
<i>C. glutamicum</i> ZL- 92	Глюкоза – 80	100	8	https://prom.ua/p2067306384-glyukoza-dekstroza-pischevaya.html
	Бурякова патока – 40	110	4,4	https://prom.ua/ua/p1815728627-rybolovnaya-melassa-art.html
	Кукурудзяний екстракт – 30	224	6,72	https://prom.ua/ua/p1375399988-likvid-csl-kukuruznyj.html
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 45	87	3,9	https://prom.ua/ua/p1969064804-sulfat-amoniyu-ukrayina.html
	FeSO ₄ – 0,02	1000	0,02	https://prom.ua/ua/p1383144656-sol-mora-100.html
	MnSO ₄ – 0,02	60	0,1	https://prom.ua/ua/p1276893643-marganets-ternokislyj-fasovka.html
	нікотинамід – 8 мг	1400	1,1	https://profiprot.com.ua/p2015391571-vitamin-niatsin-nikotinovaya.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA3ZC6BhBaEiwAeqfvym4dOWe3y54UluwHfrn6msY0iXrrN_9OeJNfwpagDqQlo0_wbQsQxoCgvEQAvD_BwE

Продовження табл. 2.2

	біотин – 850 мкг	4642	4	https://prom.ua/ua/p1479898056-biotin-poroshok.html
	тіамін-НCl – 850 мкг	3800	3	https://prom.ua/ua/search?search_term=%D1%82%D1%96%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD
Ціна за кг, грн			31,4	
<i>C. glutamicum</i> К-8	Глюкоза – 80	100	8	https://prom.ua/p2067306384-glyukoza-dekstroza-pischevaya.html
	бурякова патока – 40	110	4,4	https://prom.ua/ua/p1815728627-rybolovnaya-melassa-art.html
	кукурудзяний екстракт – 30	224	6,72	https://prom.ua/ua/p1375399988-likvid-csl-kukuruznyj.html
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 50	87	4,3	https://prom.ua/ua/p1969064804-sulfat-amoniya-ukrayina.html
	KH ₂ SO ₄ – 1,5	64	0,1	https://prom.ua/p269175378-sulfat-kaliya-sernokislyj.html?srs ltid=AfmBOor3nvTkIG3TckpX6fBF-hPkZZzEHlO5qh-oVInBFB5PPyf0g-6R
	MgSO ₄ ×7 H ₂ O – 1	142	0,15	https://klebrig.com.ua/ua/p1323818049-sulfat-magniya-1kg.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-TurboWeb&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA3ZC6BhBaEiwAeqfvyvmzppNaZOPOp9dxdllWFs6beycotnvEmf17aJozBNCfljcSOJSU4lBoCZtQQAvD_BwE
	FeSO ₄ – 0,02	1000	0,02	https://prom.ua/ua/p1383144656-sol-mora-100.html
	MnSO ₄ – 0,02;	60	0,1	https://prom.ua/ua/p1276893643-marganets-sernokislyj-fasovka.html
	метіонін – 0,5	1600	0,8	https://prom.ua/ua/p1801875695-aminokislota-metionin-profiprot.html
	гліцин бетаїн – 0,05	100	0,05	https://profiprot.com.ua/p1765415010-aminokislota-glitsin-farm.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA3ZC6BhBaEiwAeqfvyvZE9JEmUHZu4j8W4ZCVl3qCQAcJQQgIA4M-6AzKQj34Mm3MyaUGCxoCxGYQAvD_BwE
	біотин – 2,4 мг	4642	12	https://prom.ua/ua/p1479898056-biotin-poroshok.html
	тіамін-НCl – 400	3800	1,5	https://prom.ua/ua/search?search_term=%D1%82%D1%96%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD

	МКГ			%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD
Ціна за кг, грн			38,4	
<i>B. flavum</i> 90 Н	Меляса - 140	110	15,4	https://prom.ua/ua/p1815728627-rybolovnaya-melassa-art.html
	Гідролізат кормових дріжджів –55	1270	69	https://shop.hlr.ua/ua/ekstrakt-kormovyh-drojje-pan-gis-12876.html?gclid=CjwKCAiA3ZC6BhBaEiwAeqfvyqzZyWqn CVDDAEVYmGA3uq38Q73U4l_IicbOzc2N5NybMB4VNYjLBoCZ7UQAvD_BwE
	Кукурудзяний екстракт – 20	224	4.5	https://prom.ua/ua/p1375399988-likvid-csl-kukuruznyj.html
	NH_4Cl - 10	870	8,7	https://shop.hlr.ua/ua/ammoniy-hloristy-ychda-241883.html?gclid=CjwKCAiA3ZC6BhBaEiwAeqfvyogJylzM2w9HzQTesdlkpUI1uG3sxPye_R-AsTNLXhW9lvyOnGciDhoC CcsQAvD_BwE
	$(NH_4)_2HPO_4$ - 1	100	0,1	https://klebrig.com.ua/ua/p2363997313-ammonij-hloristyj-kitaj.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA3ZC6BhBaEiwAeqfvyq9hy5idTIUcajKRpRXzRfXw7q2vP7XPUb1CoJZmCduBkwrX_2wFhoCT7AQAvD_BwE
	Л-лейцин - 2	1400	2,8	https://profiprot.com.ua/p1865622742-aminokislota-lejtsin-profiprot.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA3ZC6BhBaEiwAeqfvyg7CwOKiT1ZMJ3CFtJXgUJr-JM0KQ61bC-lnWzZrx5QhB28f39oUFhoC cUEQAvD_BwE
	Біотин - 0,00025	4642	1,1	https://prom.ua/ua/p1479898056-biotin-poroshok.html
Ціна за кг, грн			101,6	

Порівняємо доцільність культивування обраних біологічних агентів у виробництві лізину (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Порівняння ефективності культивування біологічних агентів для біосинтезу лізину

№	Біологічний агент	Вартість 1 л поживного середовища, грн.	Вихід продукту, г/л	Вартість продукту, грн./г	Тривалість культивування, год.	Вихід продукту, г/1 год.
1	<i>C. glutamicum</i> ZL- 92	31,4	201,6	0,15	40	5,0
2	<i>C. glutamicum</i> K-8	38,4	221,3	0,17	40	5,5
3	<i>B. flavum</i> 90 Н	101,6	102,0	0,99	72	1,4

Порівняльний аналіз економічних аспектів використання різних продуцентів лізину показує, що *C. glutamicum* ZL-92 має найнижчу вартість виробництва 1 г лізину - 0,15 грн/г, порівняно з 0,17 грн/г для *C. glutamicum* K-8 та 0,99 грн/г для *B. flavum* 90Н. Це пов'язано з високою продуктивністю штаму та відносно невисокою вартістю поживного середовища (31,4 грн за 1 л середовища) [2, 7].

Поживне середовище для *C. glutamicum* ZL-92 включає глюкозу (80 г/л) за ціною 100 грн/кг, бурякову патоку (40 г/л) за ціною 110 грн/кг, кукурудзяний екстракт (30 г/л) за ціною 224 грн/кг, сульфат амонію (45 г/л) за ціною 87 грн/кг, а також мікроелементи та вітаміни. Загальна вартість поживного середовища для цього штаму становить 31,4 грн за 1 л, що є економічно вигідним порівняно з 38,4 грн за 1 л для *C. glutamicum* K-8 та 101,6 грн за 1 л для *B. flavum* 90Н [1, 8].

2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

2.2.1 Обґрунтування вибору ферментера

Ферментація є ключовим етапом промислового виробництва лізину. Вибір оптимального типу ферментера для цього процесу є критично

важливим, оскільки це забезпечує ефективність біосинтезу, продуктивність штаму та економічність виробництва. *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 є високопродуктивним штамом, який потребує специфічних умов культивування, таких як аеробність 0,2 vvm, ефективне перемішування, контроль температури $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, часу 40 год та рівень pH 6,9 [7].

Для забезпечення вказаних параметрів необхідно обрати ферментер, здатний забезпечити оптимальний масообмін, рівномірний розподіл кисню та стабільність поживного середовища. Основними критеріями вибору є об'єм ферментера, коефіцієнт заповнення (0,2), конструкція мішалки та системи аерації, а також наявність засобів автоматичного контролю біосинтезу [7].

Для біосинтезу лізину ми будемо використовувати Біореактор Biostat® STR Sartorius (Німеччина) з нержавіючої сталі оскільки він універсальний та розроблений для мікробної ферментації (рис. 2.1). Sartorius пропонує індивідуальні рішення з точним контролем pH, температури та аерації [9].



Рисунок 2.1 – Біореактор Biostat® STR [9]

2.2.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

C. glutamicum ZL-92 є факультативним анаеробом, тому необхідно передбачити стадію підготовки аераційного повітря. Підготовка аераційного повітря буде здійснюватися по стадійно в окремих будівлях (компресорних відділеннях), оскільки витрати повітря будуть великі [9].

Стадії підготовки аераційного повітря:

1. Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітря забірником у найвищій точці Н ~ 16 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 2, висота поверхів – 12 м, разом з косим дахом будівлі (+2 м) – 14, відбір повітря повинен відбуватися на 2-3 метри вище найвищої точки), де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;

2. Очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;

3. Стиснення повітря в компресорах або турбоповітродувках (при цьому повітря нагрівається до температури 120 – 200°C);

4. Охолодження стисненого повітря до температури «точки роси» для конденсації вологи;

5. Видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері, який також зменшує пульсації руху повітря, які можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;

6. Стабілізація тиску та температури підігріванням до 45–50 °C паром у відповідних теплообмінниках;

7. Очищення в головних ємнісних набивних фільтрах, установлених поблизу ферментаційних відділень, до ступеня очищення E=95%;

8. Очищення в індивідуальних фільтрах (E=99,99%), установлених на ферментері, повітря до яких подається безпосередньо від головних фільтрів через трубопроводи (колектори).

Повітря в біологічних боксах безпеки і лабораторіях, де працюють з культурою, стерилізують за допомогою ламп ультрафіолетового випромінювання.

2.2.3 Вибір миючих та дезінфікуючих засобів

Мийні та дезінфекційні засоби обираються залежно від типу забруднення та матеріалу обладнання. Для знежирення та видалення білкових

забруднень з нержавіючої сталі використовуються розчини каустичної соди (2-3%). Для обладнання з алюмінію застосовуються розчини кальцинованої соди (1-2%). Для дезінфекції використовуються розчини «Гембару» (0,5-1%), «Дезактину» (0,2-0,5%) або перекису водню (3-6%).

Процес виробництва лізину вимагає дотримання суворих санітарних вимог, оскільки контамінація сторонньою мікрофлорою може призвести до зниження виходу цільового продукту. Для забезпечення асептичних умов використовуються мийні та дезінфікуючі засоби, характеристики яких наведені в табл.2.4.

Таблиця 2.4

Характеристика мийних та дезінфікуючих засобів

Засіб	Концентрація, %	Температура, °C	Тривалість обробки, хв.	Призначення
Каустична сода	2-3	45-55	30-60	Миття обладнання, трубопроводів
Кальцинована сода	1-2	40-50	30-45	Миття обладнання з алюмінію
Гембар	0,5-1	20-25	20-30	Дезінфекція обладнання, приміщень
Дезактин	0,2-0,5	20-25	15-20	Дезінфекція обладнання, приміщень
Перекис водню	3-6	20-25	20-30	Стерилізація поверхонь

Кальцинована сода (Na_2CO_3) є зневодненим вуглекислим натрієм, який має вигляд білого кристалічного порошку який добре розчиняється у воді. У водних розчинах розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату які мають мийні властивості. При температурі $55 \pm 5^\circ\text{C}$ розчин кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення та руйнують білки на поверхнях. Слід пам'ятати що засіб не придатний для очищення обладнання, трубопроводів, та інвентарю виготовленого з алюмінію. Засіб належить до помірно небезпечних речовин 3 клас небезпеки. У концентрованих розчинах та звичайному вигляді подразнює шкіру і слизову оболонку очей, тому для безпечного використання рекомендується 0,5% розчин при ручному митті та

1-2% розчин для циркуляційного очищення обладнання Гарантійний термін зберігання 1 рік [10].

Каустична сода – безбарвна кристалічна речовина що активно поглинає вологу з повітря та добре розчиняється у воді. Самі розчини мають лужну реакцію, 1-2% розчини ефективно знежирюють поверхні та сприяють гідролізу білків. Однак каустична сода не підходить для миття об'єктів які виготовлені з алюмінію. Враховуючи що засіб належить до 2 класу небезпеки, при попаданні на шкіру викликає хімічний опік, подразнює слизову оболонку очей і верхніх дихальних шляхів. Гарантійний термін зберігання 1 рік з дати виготовлення [11].

Препарат «Гембар» – рідина без кольору, або з жовтуватим відтінком до якої входить полігексаметиленгуанідин фосфат. Речовина яка немає запаху та добре розчиняється у воді. Гембар має пролонговану бактерицидну, фунгіцидну та віруліцидну дію. Є безпечним у використанні так як не викликає подразнення шкіри. Рекомендовано використовувати 5 % розчини для дезінфекції поверхонь приміщення та санітарно технічного обладнання. Термін зберігання 2 роки з дати виготовлення [12].

Препарат «Дезактін» – порошок жовтувато-білого кольору зі слабким запахом хлору, основним діючим компонентом якого є дихлорантин. Він добре розчиняється у воді при концентрації не менше 20 мг/дм³. Отриманий розчин легко змивається з поверхонь та проявляє бактерицидну й фунгіцидну активність. Засіб належить до помірно небезпечних речовин та підходить для дезінфекції поверхонь приміщення та обладнання [13].

Перекис водню – безбарвна прозора рідина яка виявляє бактерицидні, віруліцидні та спороцидні властивості. Використовують як для дезінфекції обладнання так і для стерилізації поверхонь. Гарантійний термін зберігання 6 місяців з дати виготовлення [14].

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

3.1 Таксономічний статус

Домен: *Bacteria*

Тип: *Actinobacteria*

Клас: *Actinobacteria*

Порядок: *Corynebacteriales*

Родина: *Corynebacteriaceae*

Рід: *Corynebacterium*

Вид: *Corynebacterium glutamicum*

Штам: ZL-92

3.2 Морфолого-культуральні властивості

Клітини *C. glutamicum* мають паличкоподібну форму іноді злегка булавоподібну. Довжина клітини становить від 1,5 до 3,0 мікрометрів ширина 0,5-0,8 мкм, не рухома не утворює спор і не мають капсули. Бактерії фарбуються грампозитивно, що свідчить про наявність товстого шару пептидоглікану в клітинній стінці [1, 5].

Має свої вимоги для росту, у природі та в лабораторних умовах бактерія росте переважно на середовищах, що містять джерела вуглецю , азоту та обов'язково біотин без нього ріст практично не відбувається, оскільки *C. glutamicum* є біотин-залежним мікроорганізмом росте на м'ясо-пептонному агарі (МПА) штам утворює округлі, гладенькі, опуклі колонії з рівними краями [1].

3.3 Фізіолого-біологічні ознаки

C. glutamicum є аеробом. За типом живлення – факультативним автотрофом. Ефективно розщеплює вуглець, включаючи глюкозу, мальтозу, сахарозу, а також органічні кислоти. [

Демонструє оптимальний ріст за температури близьно +30 °С та рН 7,0–7,4 [1].

3.4 Отримання штаму *Corynebacterium glutamicum* ZL-92

Штам *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 отримано методом хімічної та фізичної мутагенезної обробки вихідного штаму з подальшою селекцією мутантів із підвищеною продуктивністю синтезу L-глутамінової кислоти. Процес включав експозицію до етилметансульфонату (ЕМС) та ультрафіолетового опромінення з метою індукції генетичних змін, що покращують метаболічні властивості бактерії [3].

РОЗДІЛ 4

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1. Навчання персоналу

Навчання персоналу передбачає проходження вступного інструктажу з техніки безпеки при прийомі на роботу, а також щорічне підвищення кваліфікації відповідно до займаної посади. Працівники, які працюють у чистих зонах, додатково навчаються правилам роботи в асептичних умовах. Ті, хто обслуговує обладнання, проходять інструктажі з охорони праці, пожежної безпеки, основ безпечної життєдіяльності та правил експлуатації технічних засобів.

ДР 1.1.2. Медичний огляд

Усі співробітники зобов'язані проходити медичний огляд при прийомі на роботу, а також щорічно надалі. Основна мета цих оглядів – забезпечити охорону здоров'я працівників та не допустити на підприємство осіб із захворюваннями.

ДР 1.1.3. Підготовка одягу

Перед початком виконання обов'язків кожен працівник має бути забезпечений спецодягом. Цей одяг повинен відповідати встановленим санітарно-гігієнічним вимогам і нормам безпеки, бути виготовленим з бавовняної тканини та мати достатню довжину для повного покриття тіла. Одяг регулярно перевіряється, після чого проходить прання при температурі 90°C протягом 40 хвилин із використанням прального порошку та питної води. Використана рідина після прання передається на знешкодження рідких відходів. Далі одяг сушать при температурі 80–90°C протягом 40–50 хвилин до повного висихання. Завершальними етапами є прасування і пакування, після чого одяг видається працівникам для використання.

ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів

ДР 1.2.1. Підготовка мийних засобів

Для миття обладнання використовується 2% розчин кальцинованої соди. Його слід готувати у ємностях із полімерних матеріалів або нержавіючої сталі, оскільки алюмінієвий посуд не допускається через ризик корозії. Щоб приготувати 1 літр розчину, необхідно розчинити близько 20 грамів кальцинованої соди у 980 мл води. Суміш ретельно перемішують до повного розчинення і зберігають у щільно закритій скляній тарі в прохолодному місці. Використану тару після застосування розчину направляють на утилізацію як тверді відходи (до ЗВ 7.2).

ДР 1.2.2. Підготовка дезінфікуючих засобів для приміщень

Для дезінфекції приміщень використовують розчини «Гембару» (0,5-1%), «Дезактину» (0,2-0,5%). Концентровані засоби переливають у відповідні ємності та розводять водою до робочих концентрацій: для щоденного прибирання — до 0,25% або 0,2%, для генерального — до 0,5% або 0,4% відповідно. Ці розчини застосовуються по черзі, змінюючи один на інший кожні три місяці для запобігання звиканню мікроорганізмів. Порожню тару після використання передають на знешкодження як тверді відходи (до ЗВ 7.2).

ДР 1.2.3. Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

На виробництві для дезінфекції рук застосовують 70% розчин етилового спирту, який готують шляхом розведення 96% спирту з водою до потрібної концентрації у спеціальному збірнику. Готовий розчин зберігається протягом 5–6 днів. Після використання порожні ємності передаються на утилізацію як тверді відходи (до ЗВ 7.2).

ДР 1.3. Підготовка ферментера

ДР 1.3.1. Огляд, миття та ополіскування ферментера

Перед стерилізацією обладнання проводиться його візуальний огляд для виявлення пошкоджень, вм'ятин або заглиблень, у яких можуть накопичуватися забруднення, що створюють ризик перехресної контамінації. Усі виявлені дефекти усуваються. Далі ферментер промивають гарячою

водою температурою 75–90°C під тиском 0,6–1 МПа протягом 5–10 хвилин. Після цього проводять мийку розчином кальцинованої соди (від ДР 1.2.1) за температури 20–25°C, також під тиском. Завершальним етапом є ополіскування ферментера водою температурою 20–30°C. Усі рідини, що використовуються для миття й ополіскування, направляють на знешкодження як рідкі відходи (до ЗВ 7.1).

ДР 1.3.2. Перевірка на герметичність ферментера

На цьому етапі необхідно перевірити герметичність усіх елементів біореактора. Для цього перекривають запірну арматуру і в системі створюють тиск 0,1–0,2 МПа. Зафіксований тиск контролюють протягом 40–60 хвилин – він не повинен зменшитися більш ніж на 0,01 МПа. Якщо тиск знижується, всі з'єднання обробляють мильним розчином для виявлення місця витоку. У разі виявлення несправності проводяться відповідні дії: заміна прокладки або підтягування з'єднань. Після усунення проблеми тест на герметичність повторюється. Повітря, використане під час перевірки, відводиться на знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 7.3).

ДР 1.3.3. Стерилізація ферментера

Під час стерилізації ферментера спочатку в його сорочку подають глуху пару, нагріваючи обладнання до температури 80–90 °C. Після цього відкривають усю запірну арматуру на трубопроводах і комунікаціях, що підключені до апарата, та подають гостру пару через нижній спуск безпосередньо в камеру ферментера. Одночасно відкривають вентиль для виведення повітря з апарата на установку знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 7.3). Коли температура всередині досягає рівня стерилізації (130–135 °C), усі арматури, окрім парової, зачиняють і підтримують заданий режим протягом однієї години. По завершенню стерилізації припиняють подачу пари, в апарат вводять стерильне повітря, а в сорочку – холодну воду. Охолодження триває доти, поки температура не знизиться до 30–40 °C, а тиск не стабілізується в межах 0,003–0,005 МПа.

1.4. Підготовка приміщень

ДР 1.4.1. Щоденне прибирання

Після завершення кожної зміни в приміщеннях здійснюється щоденне вологе прибирання, що включає миття підлоги та поверхонь. Для цього використовують робочий розчин «Гембару» (0,5-1%), або «Дезактину» (0,2-0,5%) (від ДР 1.2.2). Відпрацьований мийний розчин після прибирання спрямовується на стадію знешкодження рідких відходів (до ЗВ 7.1).

ДР 1.4.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання приміщень здійснюється один раз на чотири тижні або одразу, після вказівки бактеріолога у разі виявлення мікробної контамінації. У ході цього прибирання очищають усі поверхні, включаючи підлогу, вікна, стіни та двері. Для посилення дезінфекційного ефекту концентрацію робочих розчинів подвоюють: розчин «Гембару» у концентрації 0,5%, «Дезактину» (0,2-0,5%) (від ДР 1.2.2). Відпрацьований дезінфекційний розчин після прибирання надходить на стадію знешкодження рідких відходів (до ЗВ 7.1).

ДР 2. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря з атмосфери здійснюється через вертикальну трубу з повітрозбірником, встановлену в найвищій точці будівлі на висоті приблизно 35–40 метрів.

ДР 2.2. Очищення від механічних домішок

Отримане повітря надходить на фільтрацію грубого очищення, де видаляються великі частинки пилу та бруду. Для цього використовуються коміркові фільтри з вініл пластиковою сіткою, комірки яких перевищують 5 мкм. Ефективність очищення становить 70–80 %.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Далі повітря подається в турбокомпресор, де воно стискається до тиску 0,2–0,3 МПа, а температура підвищується до 175 ± 5 °С.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря охолоджується в теплообміннику до температури 30 ± 1 °C. Потім його направляють у ресивер, де зменшують вологість до рівня $W = 60$ %.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

У наступному етапі повітря нагрівається у спеціальному теплообміннику-нагрівачі до температури 50 ± 1 °C. Вологість знижується до 50 %.

ДР 2.7. Очищення в головному фільтрі

Після цього повітря проходить через головні фільтри, які обслуговують одразу кілька апаратів. Ці фільтри мають вертикальну конструкцію з опорною решіткою внизу, на яку укладається фільтрувальний шар із поліамідних волокон. Ступінь очищення досягає 98 %.

ДР 2.8. Очищення в індивідуальному фільтрі

Безпосередньо перед подачею до посівних апаратів та виробничого ферментера повітря проходить через індивідуальні фільтри, які забезпечують ступінь очищення 99,999 %. Конструктивно вони схожі на головні, однак мають менші розміри і використовують тонковолокнисті матеріали. Стерильне аераційне повітря подається на етапи підготовки посівного матеріалу (до ТП 5.4, ТП 5.5, ТП 6).

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

Титрувальні розчини додаються до поживного середовища у кількості 2 мл на 1 л середовища. Відповідно до зазначених умов була визначена необхідна кількість 6% NaOH та 6% HCl для інокулятора об'ємом 50 л й ферментера об'ємом 1 м³.

ДР 3.1. Приготування 6% розчину HCl

ДР 3.1.1. Приготування HCl 6 % для стабілізації pH перед культивуванням в інокуляторі 50 л. В колбу об'ємом 0,05 л додають 0,00585 л 36 % HCl, а потім доливають 0,02925 л дистильованої води (до ТП 5.5).

ДР 3.1.2. Приготування HCl 6 % для стабілізації рН перед культивуванням в ферментері 1 м³. В колбу об'ємом 0,5 л додають 0,0585 л 36 % HCl, а потім доливають 0,2915 л дистильованої води (до ТП 6).

ДР 3.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH

6% розчин NaOH готують розчиненням кристалічного натрію гідроксиду у відповідній кількості води. Стерилізують за температури 131°C, 40 хв.

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація NaOH 6% для стабілізації рН перед культивуванням в інокуляторі 50 л. На електронних вагах зважують 2,106 г натрію гідроксиду. Наважку переносять в колбу об'ємом 0,05 л, додають 0,0330 л дистильованої води (до ТП 5.5).

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація NaOH 6% для стабілізації рН перед культивуванням в ферментері 1 м³. На електронних вагах зважують 21,06 г натрію гідроксиду. Наважку переносять в колбу об'ємом 0,5 л, додають 0,330 л дистильованої води (до ТП 6).

ДР 4. Підготовка та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Склад поживного середовища представлено у табл. 4.1. Оскільки компоненти мають різну температуру стерилізації будемо їх розподіляти на композиції і стерилізувати окремо.

Таблиця 4.1

Розрахунок компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках. Параметри стерилізації компонентів

Компоненти поживного середовища	Концентрація, г\л	Композиція	Параметри стерилізації
Глюкоза	25	А	112 °С, 20-30 хв р 0,5 атм
Бурякова патока	8		
Кукурудзяний патока	10		
Крейда	10		
Амоній сульфат	2	Б	121 °С, 20-30 хв р 1,0 атм
Сульфат магнію	0,8		
Сульфат заліза	0,00025		
Сульфат марганцю	0,00025		

Фосфат калію (однозам.)	2	В	Фільтр 0,22 мкм/121 °С р 0,5 атм
Нікотинамід	0,125	Г	Фільтр 0,22 мкм
Біотин	0,00035		
Тіамін	0,00011		

Для приготування посівного матеріалу у колбах готуємо поживне середовище (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах об'ємом 250 мл на качалках

Композиція	Компоненти поживного середовища	Маса компонента, г	Кількість води, мл	Об'єм посуду для стерилізації, мл
А	Глюкоза	6,25	150	300
	Бурякова патока	2,0		
	Кукурудзяний патока	2,5		
	Крейда	2,5		
Б	Амоній сульфат	0,5	50	100
	Сульфат магнію	0,2		
	Сульфат заліза	0,0625		
	Сульфат марганцю	0,0625		
В	Фосфат калію (однозам.)	0,5		Фільтр 0,22 мкм
Г	Нікотинамід	281,25мг		Фільтр 0,22 мкм
	Біотин	0,0875мг		
	Тіамін	0,0275мг		

Для приготування композиції А зважуємо не електронних вагах глюкозу масою 6,25 г; бурякову патоку 2 г; кукурудзяну патоку 2,5г; крейду 2,5г і додаємо 150 мл води. Після переносимо все в колбу об'єм 300 мл, перемішуємо та стерилізуємо за температури 112 °С упродовж 20-30 хв при 0,5 атм.

Для приготування композиції Б зважуємо амоній сульфат 0,5 г; сульфат магнію 0,2 г; сульфат заліза 0,0625 г. Переносимо все в колбу об'ємом 100 мл і додаємо 50мл води. Після переносимо все в колбу 100 мл перемішуємо та стерилізуємо за температури 121 °С упродовж 20-30 хв при 1 атм.

Для приготування композиції В зважуємо фосфат калію 0,5 г переносимо в шприц об'ємом 50мл та стерилізуємо через шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

Для приготування композиції Г зважуємо: нікотинамід 285,25 мг; біотин 0,0875 мг; тіамін 0,0275 мг перемішуємо та стерилізуємо через шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

Після стерилізації усі композиції охолоджують до температури 30 °С та змішують у стерильних умовах у колбі об'ємом 500 мл і направляють до ТП 5.3.

ДР 4.2 Підготовка поживного середовища для інокулятора об'ємом 5 л

Для приготування посівного матеріалу в інокуляторі готуємо поживне середовище (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для вирощування посівного матеріалу інокуляторі об'ємом 5 л

Композиція	Компоненти поживного середовища	Маса компонента, г	Кількість води, л	Об'єм посуду для стерилізації, л
А	Глюкоза	56,25	1,5	3
	Бурякова патока	18		
	Кукурудзяний патока	22,5		
	Крейда	22,5		
Б	Амоній сульфат	4,5	0,5	1
	Сульфат магнію	1,8		
	Сульфат заліза	0,5625		
	Сульфат марганцю	0,5625		
В	Фосфат калію (однозам.)	4,5	0,22	0,5
Г	Нікотинамід	281,25 мг		Фільтр 0,22 мкм
	Біотин	0,7875 мг		
	Тіамін	0,2475 мг		

Для приготування композиції А зважуємо на електронних вагах: глюкозу 56.25 г; бурякову патоку 18г; кукурудзяну патоку 22.5 г; крейду 22.5 переносимо в колбу об'ємом 3л і додаємо води 1,5л, перемішуємо відправляємо на стерилізацію за температури 112 °С упродовж 20-30 хв при 0,5 атм.

Для приготування композиції Б зважуємо амоній сульфат 4,5г; сульфат магнію 1,8г; сульфат заліза 0,5625 г; сульфат марганцю 0,5625 г, переносимо ці компоненти в колбу розміром 1 л і додаємо 500 мл води перемішуємо і відправляємо на стерилізацію за температури 121°C упродовж 20-30 хв при 1 атм.

Для приготування композиції В нам знадобиться фосфат калію 4,5 г; переносимо в колбу 500 мл, додаємо води 220 мл перемішуємо і стерилізуємо при параметрах 121 °C на 20 хв. при 1 атм.

Для приготування композиції Г на електронних вагах зважуємо нікотинамід 281,25мг, біотин 0,7875мг, тіамін – 0.2475мг після чого додаємо води 2мл перемішуємо і пропускаємо через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм

Композиції охолоджуємо до 30 °C і змішуємо у стерильному інокуляторі об'ємом 5 л і відправляємо на ТП 5.4.

ДР 4.3 Підготовка поживного середовища для інокулятора об'ємом 50л

Для приготування посівного матеріалу в інокуляторі готуємо поживне середовище (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

**Розрахунок вмісту компонентів для вирощування посівного матеріалу
в інокуляторі об'ємом 50 л**

Композиція	Компоненти поживного середовища	Маса компонента, г	Кількість води, л	Об'єм посуду для стерилізації, л
А	Глюкоза	562,5	20	30
	Бурякова патока	180		
	Кукурудзяний патока	225		
	Крейда	225		
Б	Амоній сульфат	45	1,46	3
	Сульфат магнію	18		
	Сульфат заліза	5,625		
	Сульфат марганцю	5,625		
В	Фосфат калію (однозам.)	45	1	2
Г	Нікотинамід	2,813	0,001	Фільтр 0,22 мкм
	Біотин	0,0079		
	Тіамін	0,0025		

Для приготування композиції А зважуємо на електронних вагах глюкозу об'ємом 562,5 г; бурякову патоку 180 г; кукурудзяна патока 225 г; крейда 225 г і додаємо 20 л води. Після переносимо все в посівний апарат, перемішуємо та стерилізуємо за температури 112 °С упродовж 20-30 хв при 0,5 атм.

Для приготування композиції Б зважуємо амоній сульфат 45 г; сульфат магнію 18 г; сульфат заліза 5,625 г. Переносимо все в колбу об'ємом 3л і додаємо води 1,46 л. перемішуємо та стерилізуємо за температури 121 °С упродовж 20-30 хв при 1 атм.

Для приготування композиції В готуємо фосфат калію 45 г, переносимо в колбу об'ємом 2 л та стерилізуємо окремо за температури 121 °С упродовж 20-30 хв при 1 атм.

Для приготування композиції Г зважуємо нікотинамід 2,813 г; біотин 0,0079 г; тіамін 0,0025 г, перемішуємо та стерилізуємо через шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

Композиції охолоджуємо до 30 °С і змішуємо у стерильному інокуляторі об'ємом 50 л і відправляємо на ТП 5.5.

ДР 4.4 Підготовка поживного середовища для ферментера об'ємом 1 м³

Для приготування посівного матеріалу у ферментері готуємо поживне середовище (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Розрахунок вмісту компонентів для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 1 м³

Композиція	Компоненти поживного середовища	Маса компонента, кг	Кількість води, л	Об'єм обладнання, л
А	Глюкоза	18	100	1000
	Бурякова патока	9		
	Кукурудзяний патока	6,75		
	Крейда			
Б	Амоній сульфат	10,125	150	1000
	Сульфат магнію	0,337		
	Сульфат заліза	4,5		

	Сульфат марганцю	4,5		
В	Фосфат калію (однозам.)	225	249	
Г	Нікотинамід	1,8	1	1000
	Біотин	0,191		
	Тіамин	0,191		

Для приготування композиції А на вагах зважують глюкозу у кількості 18 кг; бурякову патоку 9 кг; кукурудзяну патоку 6,75 кг; ; після чого компоненти переносять у ферментер 1 м³; перемішують та стерилізують за температури 112 °С упродовж 20-30 хв при 0,5 атм.

Композицію Б готують шляхом зважування амоній сульфату 10,125 кг; сульфату магнію 0,337 кг; сульфату заліза 4.5 кг; сульфату марганцю 4,5 кг; переносять у відповідну ємність; ретельно перемішують і стерилізують за температури 121 °С упродовж 30 хв при 1,0 атм.

Композицію В готують шляхом зважування фосфату калію (однозаміщеного) у кількості 225 кг; розчиняють у воді; переносять у ферментер та стерилізують окремо за температури 121 °С при 1 атм. упродовж 30 хв.

Композицію Г готують зважуючи нікотинамід у кількості 1,8 кг; біотин 0,191 г; тіамін 0,191 г перемішуємо та стерилізуємо через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

Композиції охолоджуємо до 30°C і змішуємо у стерильному інокуляторі об'ємом 50 л і відправляємо на ТП 6.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Зберігання колекційної культури

Штам *C. glutamicum* ZL-92 зберігається на скошеному агарі за температури +4 °С у холодильнику (до ТП 5.2). Для запобігання висиханню поживного середовища культуру необхідно пересівати щонайменше раз на два місяці.

ТП 5.2. Одержання культури I генерації

З колекційної культури (від ТП 5.1) здійснюють посів на скошене середовище МПА. Інкубацію проводять у термостаті за температури 30 ± 1 °C упродовж 20 годин (до ТП 5.3).

ТП 5.3. Одержання культури II генерації

У пробірку з робочою культурою на МПА (від ТП 5.2) асептично додають 5 мл фізіологічного розчину для відмивання клітин. Отриману суспензію клітин піпеткою переносять у підготовлені колби з поживним середовищем (від ДР 4.1) у розрахунку – одна пробірка на одну колбу.

Вирощування мікроорганізмів здійснюється у колбах на качалках із частотою обертання 250 об/хв при температурі 30 ± 1 °C протягом 20 годин (до ТП 5.4). Після завершення культивування проводять мікробіологічний контроль у кожній колбі.

ТП 5.4. Одержання культури III генерації

В інокулятор об'ємом 5 літрів вносять компоненти середовища (від ДР 4.2): стерильні композиції А, Б, В Г і піногасник 2,25 мл. Включають мішалку (250 об/хв) і подають стерильне повітря через барботер (від ДР 2.8). Потім додають посівний матеріал із засівної колби (від ТП 5.3). Культивування триває 20 годин за температури 30 °C, з відбором проб кожні 8 годин для контролю біомаси та мікробіологічного аналізу. Очікувана концентрація біомаси – 9,5 г/л. Культуру стерильно передають до ТП 5.5.

ТП 5.5. Одержання культури IV генерації

В інокулятор об'ємом 50 літрів вносять компоненти середовища (від ДР 4.3) стерильні композиції А, Б, В Г і піногасник 2,25 мл. Включають мішалку (250 об/хв) і подають стерильне повітря через барботер (від ДР 2.8). Потім додають посівний матеріал із засівної колби (від ТП 5.4). Для стабілізації рН на рівні 6,9 поживного середовища стерильно самоплином за необхідності вводять титрувальні агенти (від ДР 3.1.1, ДР 3.2.1). Культивування триває 20 годин за температури 30 °C, з відбором проб кожні 8 годин для контролю біомаси та мікробіологічного аналізу. Очікувана концентрація біомаси – 9,5 г/л. Культуру стерильно передають до ТП 6.

ТП 6. Виробничий біосинтез

У ферментер об'ємом 1 м³ вводять стерильну композицію А, після чого вводять композиції Б, В, С (від ДР 4.4). Для стабілізації рН на рівні 6,9 поживного середовища стерильно самоплином за необхідності вводять титрувальні агенти (від ДР 3.1.2, ДР 3.2.2). Вмикають мішалку (250 об/хв) та подають стерильне повітря через барботер (від ДР 2.8). Посівний матеріал (від ТП 5.5) подають через трубу перетискування.

Культивування триває 40 годин за температури 30 °С. Відбір проб для аналізу концентрації біомаси, джерел живлення та мікробіологічного контролю здійснюється кожні 8 год. Очікувана кінцева концентрація лізину – 201,6 г/л, а біомаси – 18,9 г/л.

ЗВ 7. Знешкодження відходів

ЗВ 7.1. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи очищуються за допомогою багатоступеневої технології, яка включає фільтрацію, зокрема зворотний осмос, а також хімічне та біологічне очищення.

ЗВ 7.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи, такі як використана пакувальна, відправляються до централізованих пунктів прийому вторинної сировини.

ЗВ 7.3. Знешкодження газоподібних відходів

Газоподібні відходи очищуються на фільтрувальних установках за допомогою уловлювальних систем та біофільтрів.

РОЗДІЛ 5

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

5.1 Методи контролю лізину

Контроль біотехнологічного процесу виробництва лізину з використанням штаму *Corynebacterium glutamicum* ZL-92 здійснюється на всіх етапах виробничого циклу, починаючи від підготовки сировини і закінчуючи випуском готової продукції. Методи контролю включають фізико-хімічні, мікробіологічні та інструментальні методи аналізу. Комплексний підхід до контролю дозволяє забезпечити стабільність процесу і відповідність продукції встановленим вимогам якості [15].

На етапі вхідного контролю сировини перевіряється якість всіх компонентів поживного середовища, включаючи глюкозу, бурякову патоку, кукурудзяний екстракт, мінеральні солі та вітаміни. Для глюкози визначаються такі показники як вміст редуруючих речовин, вологість, наявність механічних домішок. Для бурякової патоки контролюються вміст сухих речовин, загального азоту, редууючих речовин, рН. Для кукурудзяного екстракту визначаються вміст сухих речовин, загального азоту, молочної кислоти, рН [15].

5.2 Методи контролю посівного матеріалу

На етапі підготовки посівного матеріалу контролюється чистота культури *C. glutamicum* ZL-92, її морфологічні та фізіологічні характеристики. Проводиться мікроскопічний контроль, визначається концентрація біомаси, перевіряється стерильність. Для визначення концентрації біомаси використовується метод оптичної густини (OD) при довжині хвилі 590 нм, застосовуючи формулу:

$$C_{\text{біомаси}} = k \times OD_{590}$$

де: $C_{\text{біомаси}}$ - концентрація біомаси, г/л;

k - коефіцієнт перерахунку, який визначається експериментально для *C. glutamicum* ZL-92 і становить 0,38 [15,2].

Під час виробничої ферментації контролюються такі параметри як температура, рН, рівень розчиненого кисню, тиск, частота обертання мішалки, витрата повітря. Ці параметри вимірюються безперервно за допомогою автоматизованої системи контролю. Для визначення рівня розчиненого кисню використовується метод полярографії з платиновим електродом. Контроль рН здійснюється за допомогою скляного електрода. Температура вимірюється термометром опору [15].

5.3 Методи контролю на стадії біосинтезу

Динаміка зміни концентрації біомаси, глюкози та лізину під час ферментації контролюється за допомогою відбору проб і проведення аналізів. Концентрація глюкози визначається ферментативним методом з використанням глюкозооксидази. Концентрація лізину визначається методом високоефективної рідинної хроматографії після попередньої дериватизації нінгідрином. Для розрахунку концентрації лізину використовується формула:

$$C_{\text{лізину}} = \left(\frac{S_{\text{проби}}}{S_{\text{стандарту}}} \right) \times C_{\text{стандарту}} \times \text{Розведення}$$

Де:

$C_{\text{лізину}}$ - концентрація лізину, г/л;

$S_{\text{проби}}$ - площа піку проби;

$S_{\text{стандарту}}$ - площа піку стандарту;

$C_{\text{стандарту}}$ - концентрація стандарту, г/л;

Розведення - коефіцієнт розведення проби.

Для оцінки ефективності процесу біосинтезу лізину розраховуються наступні показники: питома швидкість росту біомаси, питома швидкість утворення продукту, економічний коефіцієнт по субстрату, вихід продукту від теоретично можливого. Питома швидкість росту біомаси (μ) розраховується за формулою:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

де:

X_1 і X_2 - концентрації біомаси в моменти часу t_1 і t_2 , г/л;

t_1 і t_2 - моменти часу, год.

Питома швидкість утворення продукту (q_p) розраховується за формулою:

$$q_p = \frac{P_2 - P_1}{\frac{X_2 + X_1}{2} \times (t_2 - t_1)}$$

де:

P_1 і P_2 - концентрації лізину в моменти часу t_1 і t_2 , г/л;

X_1 і X_2 - концентрації біомаси в моменти часу t_1 і t_2 , г/л;

t_1 і t_2 - моменти часу, год [15].

5.4.1 Хіміко-технологічний контроль

Процес накопичення лізину *C. glutamicum* ZL-92 контролюється також за допомогою аналізу активності ферментів біосинтетичного шляху, таких як аспартаткіназа, діамінопімелатдекарбоксилаза, гомосеринтрансацетилаза. Зниження активності цих ферментів може свідчити про метаболічні порушення, які призводять до зменшення виходу лізину. Ферментативний аналіз проводиться спектрофотометричним методом з використанням специфічних субстратів та кофакторів [16].

Для підвищення точності контролю процесу виробництва лізину розроблено систему математичного моделювання, яка дозволяє прогнозувати розвиток процесу та оптимізувати його параметри. Модель базується на

кінетичних рівняннях, які описують ріст біомаси, споживання субстрату, утворення продукту та враховують вплив різних факторів на ці процеси. За допомогою моделі можна розрахувати оптимальні параметри процесу для досягнення максимального виходу лізину [17].

Система автоматизованого контролю процесу включає датчики, контролери, регулятори, програмовані логічні контролери та SCADA-систему для візуалізації та архівування даних. Основні параметри процесу (температура, pH, рівень розчиненого кисню, тиск) контролюються безперервно, а за відхилення від заданих значень система автоматично вносить корективи. Наприклад, при зниженні рівня розчиненого кисню нижче 20% від насичення система збільшує частоту обертання мішалки або витрату повітря [17].

Для забезпечення надійності системи контролю процесу виробництва лізину проводиться регулярне калібрування та перевірка вимірювальних приладів. Калібрування проводиться з використанням стандартних зразків та еталонних приладів. Періодичність калібрування залежить від типу приладу та його метрологічних характеристик. Наприклад, pH-метри калібруються перед кожним запуском ферментації, а спектрофотометри - один раз на тиждень [17].

Контроль за технологічним процесом здійснюється відповідно до технологічного регламенту, який встановлює параметри процесу, методи контролю, допустимі відхилення та дії персоналу в разі відхилень від нормального режиму роботи. Всі дані контролю реєструються в журналах та зберігаються протягом встановленого терміну [15, 18]

Для своєчасного виявлення відхилень у процесі біосинтезу лізину з використанням *C. glutamicum* ZL-92 розроблено систему раннього попередження, яка базується на аналізі тенденцій зміни контрольованих параметрів. Ця система дозволяє прогнозувати розвиток процесу ферментації та передбачати можливі проблеми до їх виникнення. Аналіз трендів здійснюється за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення, яке в

режимі реального часу обробляє дані з датчиків та розраховує похідні параметри, такі як швидкість споживання глюкози, швидкість утворення лізину, питома швидкість росту біомаси [19].

5.5 Мікробіологічний контроль

Морфологічні зміни клітин *C. glutamicum* ZL-92 під час ферментації також є об'єктом контролю, оскільки вони можуть свідчити про фізіологічний стан культури. На початку ферментації клітини мають форму коротких паличок розміром 2-3 мкм, а з часом їх розмір може збільшуватися до 4-5 мкм. Зміна морфології клітин, поява нетипових форм, агрегація клітин можуть свідчити про стресові умови, контамінацію чи інші порушення процесу. Мікроскопічний контроль проводиться через кожні 8 годин ферментації з використанням фазово-контрастного мікроскопа [20, 17].

Для оцінки метаболічного стану культури *C. glutamicum* ZL-92 використовується аналіз на наявність побічних метаболітів, таких як органічні кислоти (оцтова, піровиноградна, молочна), спирти, ацетоїн. Накопичення цих сполук може свідчити про зміну метаболічних шляхів внаслідок стресових умов, недостатньої аерації чи інших факторів. Аналіз проводиться методом високоефективної рідинної хроматографії з використанням колонки з катіонообмінною смолою та рефрактометричного детектора [20, 17].

Для контролю стерильності процесу використовується система моніторингу мікробіологічної чистоти, яка включає відбір проб культуральної рідини, поживного середовища, повітря, обладнання та їх мікробіологічний аналіз. Проби культуральної рідини відбираються через кожні 12 годин ферментації та висіваються на різні селективні середовища для виявлення можливих контамінантів. У випадку виявлення сторонньої мікрофлори проводиться її ідентифікація та аналіз причин контамінації [21, 17].

Для забезпечення надійності системи контролю процесу виробництва лізину проводиться регулярне калібрування та перевірка вимірювальних

приладів. Калібрування проводиться з використанням стандартних зразків та еталонних приладів. Періодичність калібрування залежить від типу приладу та його метрологічних характеристик. Наприклад, рН-метри калібруються перед кожним запуском ферментації, а спектрофотометри - один раз на тиждень [21].

ВИСНОВКИ

1. Актуальність роботи підтверджена широкою практикою застосування лізину для відгодівлі тварин в агропромисловому комплексі, а доцільність – імпортозалежністю вітчизняного ринку лізину.
2. Проведено аналіз продуктивності штамів *C. glutamicum* ZL- 92, *C. glutamicum* K-8, *B. flavum* 90 Н для реалізації технології біосинтезу лізину. Виявлено, що генетично модифікований штам *C. glutamicum* ZL-92 є найбільш перспективним продуцентом для промислового культивування з продуктивністю 5 г/год.
3. Визначено оптимальний склад поживного середовища для культивування *C. glutamicum* ZL-92, що включає глюкозу (80 г/л), бурякову патоку (40 г/л), кукурудзяний екстракт (30 г/л), сульфат амонію (45 г/л), а також мінеральні солі та вітаміни.
4. Розроблено технологічну схему виробництва лізину, що включає стадію санітарної підготовки, стадію підготовки аераційного повітря, підготовку сировини та матеріалів, підготовку поживного середовища, підготовку посівного матеріалу, виробничу ферментацію. Для кожної стадії процесу визначено основні параметри та режими роботи обладнання.
5. Розроблено систему контролю біотехнологічного процесу виробництва лізину, описано методи контролю, періодичність вимірювань та допустимі межі відхилень показників.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Xu J.-Z., et al. Metabolic engineering of glucose uptake systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2019. Vol. 46(7). P. 937-949. URL: <https://academic.oup.com/jimb/article/46/7/937/5678836>
2. Sagong H.-Y., Kim K.-J. Structural basis for redox sensitivity in *Corynebacterium glutamicum* diaminopimelate epimerase: an enzyme involved in l-lysine biosynthesis. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, no. 1. <https://doi.org/10.1038/srep42318>
3. Rational modification of *Corynebacterium glutamicum* dihydrodipicolinate reductase to switch the nucleotide-cofactor specificity for increasing l -lysine production / J.-Z. Xu et al. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018. Vol. 115, no. 7. P. 1764–1777. URL: <https://doi.org/10.1002/bit.26591>
4. Розведення свиней в Київській області. URL: <https://tripoli.land/ua/farmers/zhivotnovodcheskiye-fermy/kievskaya/svinokompleksy>
5. Xu J.-Z. et al. Rational modification of tricarboxylic acid cycle for improving l-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories*. 2018. Vol. 17, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0958-z>
6. Sgobba E. et al. Synthetic *Escherichia coli*-*Corynebacterium glutamicum* consortia for l-lysine production from starch and sucrose . *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 260. P. 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.113>
7. Wang Y. et al. Evolving the l-lysine high-producing strain of *Escherichia coli* using a newly developed high-throughput screening method. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2016. Vol. 43, no. 9. P. 1227–1235. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1803-1>
8. Xu J. et al. Increased glucose utilization and cell growth of *Corynebacterium glutamicum* by modifying the glucose-specific

phosphotransferase system (PTSGlc) genes. *Canadian Journal of Microbiology*. 2016. Vol. 62, no. 12. P. 983–992. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0027>

9. Xu J.-Z., Yang H.-K., Zhang W.-G. NADPH metabolism: a survey of its theoretical characteristics and manipulation strategies in amino acid biosynthesis. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2018. Vol. 38, no. 7. P. 1061–1076. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1437387>

10. Грегірчак Н.М., Тетеріна С.М., Нечипор Т.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР. – К.: НУХТ, 2018. – 274с

11. Гембар [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://datonal.org/?m0prm=3&m1prm=4&showItem=25>

12. Коваленко Н.К., Полтавська О.А. Культивування біфідобактерій і стимуляція їх росту : Х з`їзд ТМУ (Одеса, 2122 серпня 2009 р.). С. 7075.

13. Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів: наказ Міністерства охорони здоров'я від 14.12.2001 №502. *Офіційний вісник України*. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0502282-01/ed20011214#Text>

14. Ikeda M. et al. A third glucose uptake bypass in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 31833. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014. Vol. 99, no. 6. P. 2741–2750. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6323-1>

15. Liu D. et al. Associations of plasma carnitine, lysine, trimethyllysine and glycine with incident ischemic stroke: Findings from a nested case-control study. *Clinical Nutrition*. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.07.004>

16. Kang C. W. et al. Synthetic auxotrophs for stable and tunable maintenance of plasmid copy number. *Metabolic Engineering*. 2018. Vol. 48. P. 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.020>

17. Brüsseler C. et al. The myo-inositol/proton symporter IolT1 contributes to d-xylose uptake in *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 249. P. 953–961. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.098>

18. Sawada K. et al. Metabolic changes in a pyruvate kinase gene deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Metabolic Engineering*. 2010. Vol. 12, no. 4. P. 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.01.004>
19. Xu J. et al. Increased glucose utilization and cell growth of *Corynebacterium glutamicum* by modifying the glucose-specific phosphotransferase system (PTSGlc) genes. *Canadian Journal of Microbiology*. 2016. Vol. 62, no. 12. P. 983–992. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0027>
20. Christensen J. B. et al. Structure and Function of Cyanobacterial DHDPS and DHDPR. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6, no. 1. <https://doi.org/10.1038/srep37111>
21. Sagong H.-Y., Kim K.-J. Structural Insight into Dihydrodipicolinate Reductase from *Corynebacterium glutamicum* for Lysine Biosynthesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 26, no. 2. P. 226–232. <https://doi.org/10.4014/jmb.1508.08086>

ДОДАТОК