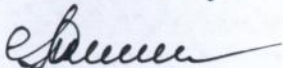


Міністерство освіти України
Український державний університет харчових технологій
На правах рукопису

Олійнічук Сергій Тимофійович



УДК 661.7; 663.18; 661.183

**РОЗРОБКА І ВПРОВАДЖЕННЯ
ТЕХНОЛОГІЙ ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ
ТА ЇЇ ПОХІДНИХ НА ОСНОВІ
МІКРОБІОЛОГІЧНОГО СИНТЕЗУ**

**Спеціальність 05.18.07 —
технологія продуктів бродіння**

*Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора технічних наук*

Київ 1997

Робота виконана в Українському науково-дослідному інституті спирту і біотехнології продовольчих продуктів Держхарчопрому України.

Офіційні опоненти: **В.А.Маринченко** —
доктор технічних наук, професор, член-кореспондент АУН України;

В.С.Підгорський —
доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України;

М.І.Даниляк —
доктор біологічних наук, професор, академік АТН, Заслужений винахідник України.

Провідна організація: Український науково-дослідний інститут цукрової промисловості.

Захист відбудеться "26" травня 1997 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої Ради Д.01.15.05 Українського державного університету харчових технологій, аудиторія А-311.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці університету.

Автореферат розісланий "24" квітня 1997 року.

Запрошуємо Вас взяти участь у засіданні спеціалізованої Ради або надіслати відгук у двох примірниках, затверджений печаткою організації, за адресою: 252 033, Київ-33, вул.Володимирська,68.

Вчений секретар спеціалізованої вченої Ради, к.т.н., доцент

А.М.Куч

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00753555 (U)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Досягнення сучасної біотехнології дають змогу отримати цілий спектр продуктів на основі мікробіологічного синтезу, які широко використовуються у харчовій промисловості, медицині, сільському господарстві. Серед них — ряд біологічно активних речовин, ферментні препарати, харчові, смакові та кормові добавки, барвники, загущувачі і модифікатори, а також субстанції лікарських препаратів на основі похідних амінокислот, вітамінів, полісахаридів. Одним із таких продуктів мікробіологічного синтезу, який має різнобічні властивості, є глутамінова кислота.

Актуальність проблеми. Глутамінова кислота є фізіологічно активною речовиною і тому широко застосовується в медицині, сільському господарстві, харчовій та інших галузях промисловості.

Перш за все, глутамінова кислота, так як і інші амінокислоти, бере участь у побудові молекули білка, в біосинтезі азотистих речовин клітин організму людини, а також різних ферментів та гормонів, необхідних для його життєдіяльності. Одним з найбільш простих прикладів участі глутамінової кислоти в азотистому та білковому обміні є процес знешкодження аміаку, який безперервно утворюється в тканинах організму і є надзвичайно шкідливим. Виділення аміаку проходить шляхом його сполучення з глутаміновою кислотою, що знаходиться в крові, транспортується в нирки, де розщеплюється ферментом глутаміназою на кислоту та аміак, який видаляється у вигляді амонійних солей.

Найбільш поширеним похідним глутамінової кислоти є глутамат натрію, який використовують як модулятор смаку харчових продуктів. У білкових продуктах харчування його кількість становить до 10–35% по відношенню до білка. Глутамат натрію, який додають під час приготування їжі, не надає їй нового запаху або кольору, але поліпшує її натуральний смак та аромат. При травленні їжі глутамат

натрію включає нормальні біохімічні переходи, при яких створюється енергія та продукти життєдіяльності.

Останні роки характеризуються пошуком радіопротекторів та імуномодуляторів з ряду похідних глутамінової кислоти. Дані вітчизняної та іноземної літератури свідчать про те, що саме комплексні сполуки глутамінової кислоти з біометалами заслуговують на більш детальне вивчення.

Нетоксичність солей глутамінової кислоти, можливість їх широкого застосування в різних галузях промисловості обумовлюють багатотоннажне виробництво похідних глутамінової кислоти, що спостерігається в багатьох країнах світу.

В Україні такого виробництва немає, дефіцит похідних глутамінової кислоти не дає змоги створити широкий асортимент харчових, лікувально-профілактичних та інших продуктів. Тому створення ефективного, багатотоннажного виробництва глутамінової кислоти та її солей — актуальне завдання для України. Вирішення його не тільки дасть можливість розширити асортимент харчоконцентратної промисловості, а й мати валютну продукцію для експорту.

Мета роботи — наукове обґрунтування, розробка та вдосконалення технологічних режимів мікробіологічного синтезу L-глутамінової кислоти, післяферментаційної обробки культуральної рідини, виділення та очищення кристалічної глутамінової кислоти, отримання її похідних натрію й калію; визначення шляхів їх використання в харчовій промисловості.

Завдання досліджень. Згідно з поставленою метою необхідно: — створити біотехнологію глутамінової кислоти, включаючи зберігання штаму, вирощування посівного матеріалу, підготовку посівного та ферментаційного середовищ, проведення ферментацій у лабораторних та виробничих умовах, виділення біомаси з

культуральної рідини, виділення і кристалізацію глютамінової кислоти та отримання її похідних;

— визначити шляхи використання глютаматів калію та натрію і розробити рецептури та нормативно-технічну документацію на харчові продукти з їх застосуванням;

— розробити науково-технічну та технологічну документацію на технологію і готову продукцію, створити дослідно-промислове виробництво глютаматів.

Наукова новизна. Запропоновано й науково обгрунтовано перспективність виробництва L-глютамінової кислоти на основі мікробіологічного синтезу шляхом культивування *Corynebacterium glutamicum* на м'ясовому середовищі; вивчено вплив окремих компонентів ферментаційного середовища на ріст культури та її продуктивність, підібрано оптимальний склад середовища, що забезпечує максимальний синтез глютамінової кислоти; теоретично обгрунтовано та експериментально визначено вплив фізико-хімічних факторів на кінетичні показники мікробіосинтезу глютамінової кислоти.

Науково обгрунтовано залежність метаболізму культури *Corynebacterium glutamicum* від концентрації вуглецю в ферментаційному середовищі, розроблено новий спосіб ферментації з підживленням культури стерильним концентратом джерела вуглецю.

Одержані нові експериментальні дані щодо впливу коефіцієнта об'ємної концентрації розчину на тривалість ультрафільтрації та вихід глютамінової кислоти при виділенні бактеріальної біомаси із застосуванням баромембранної техніки.

Досліджено статичні іонообмінні рівноваги глютамінової кислоти та її іонообмінні характеристики при сорбції на катіоніті КУ-2-8, які можна використовувати для вирішення такого технологічного завдання, як попередня розрахункова величина

сорбції амінокислоти за аналітичними даними катіонного складу культуральної рідини.

Отримано нові експериментальні дані щодо впливу фізико-хімічних факторів на виділення глютамінової кислоти шляхом іонного обміну.

Теоретично обгрунтовано та експериментально підтверджено, що при хроматографічному розподілі органічних та мінеральних іонів культуральної рідини зона сорбції глютамінової кислоти зростає в міру збільшення кількості обмінних колон у робочому циклі.

На основі даних про розчинність натрієвої та калієвої солей глютамінової кислоти експериментально вивчено умови їх кристалізації з водних розчинів.

Практична цінність і реалізація розробки. Розроблено технологічну й апаратурну схему мікробіологічного синтезу, післяферментаційної обробки культуральної рідини, виділення та очищення глютамінової кислоти;

— створено дослідно-промислову установку виробництва глютамінової кислоти та її солей потужністю 10,0 тонн на рік;

— розроблено технологічний регламент виробництва глютамінової кислоти та її солей;

— затверджено технічні умови на глутамати натрію та калію;

— вдосконалено апаратурну схему очистки повітря, яке виходить із ферментаторів в атмосферу;

— розроблено апаратурну схему й технологічний режим виробництва нейтрального бетаїну з культуральної рідини після виділення глютамінової кислоти.

Отримані експериментальні дані й розроблена нормативно-технічна документація використані для проектування промислового виробництва потужністю 1000,0 тонн глютамінової кислоти на рік на Лужанському експериментальному заводі та реконструкції цеху

медпрепаратів — на Лохвицькому спиртокомбінаті.

За результатами виконаної дисертаційної роботи розроблено методичний посібник для проведення лабораторних робіт у навчальному процесі УДУХТ при підготовці фахівців з спеціальностей “Біотехнологія мікробного синтезу”, “Технологія продуктів бродіння та виноробства”.

Подана робота є узагальненням досліджень, виконаних автором у колективі співробітників відділу біотехнології харчових добавок УкрНДІспиртбіопрод в 1986–1995 роках у рамках виконання держбюджетних науково-дослідних робіт за завданнями Держхарчопрому СРСР, Кабінету Міністрів та Держхарчопрому України.

Особистий внесок автора в розробку наукових результатів полягає в організації, методичному забезпеченні та проведенні наукових експериментів у лабораторних і виробничих умовах, в обробці експериментальних даних та їх узагальненні, участі в розробці нормативно-технічної документації, а також у написанні наукових статей та підготовці заявок на винаходи.

Апробація роботи. Основні положення дисертації доповідались на засіданнях Координаційної ради колишньої РЕВ, на 6 міжнародних та 3 Українських конференціях, наукових конференціях УДУХТ, на науково-технічній раді концерну “Укрспирт”, на засіданнях вчених рад УкрНДІспиртбіопрод.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 47 робіт, в тому числі видано 8 авторських свідоцтв та 4 Рішення на видачу патентів України.

Структура та об’єм роботи. Дисертаційна робота викладена на 259 сторінках машинописного тексту і складається із вступу, 8 розділів, загальних висновків та додатків, містить 69 таблиць, 27 рисунків. Список використаної літератури містить 322 джерела.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ

Теоретичні основи біосинтезу, біологічна цінність і перспективи використання глютамінової кислоти та її солей у харчовій промисловості

Аналіз стану виробництва та споживання глютамінової кислоти свідчить про те, що глютаматиди мають надзвичайно важливе значення для організму людини й асортименту харчових продуктів. Проте використання цих цінних для харчування людини харчосмакових добавок обмежується їх випуском в промисловості, а тому дослідження, які спрямовані на підвищення ефективності виробництва глютаматидів, постійно розширюються. Із відомих способів отримання глютамінової кислоти найбільш перспективним є спосіб мікробіологічного синтезу, який застосовують у таких країнах, як Японія, США, Франція, Китай та інших. В Україні, як і в усіх країнах СНД, солі глютамінової кислоти не виробляються і потреби харчоконцентратної промисловості до цього часу задовольняються за рахунок імпорту.

На основі даних літератури, визначено завдання досліджень, які охоплюють весь технологічний цикл виробництва і націлені на оптимізацію процесу мікробіологічного синтезу, виділення й очищення глютамінової кислоти.

Кінцевим результатом запланованих досліджень є організація промислового виробництва, розробка шляхів використання глютамінової кислоти та її похідних у харчовій промисловості України. Це дасть змогу повністю забезпечити потребу в цих речовинах, розширити асортимент харчових продуктів.

Унаслідок узагальнення сучасних уявлень про біосинтез вторинних метаболітів та процесів іонообмінної сорбції висунуто робочу гіпотезу про можливість наближення фази синтезу глютамінової кислоти до фази росту продуцента, а також її сорбції у

вигляді протонowanego катіону на катіоніт КУ-2-8 з метою збільшення виходу глутамінової кислоти, що синтезована в культуральній рідині.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень були: меляса, посівне та ферментаційне середовища, культура *Corynebacterium glutamicum* штаму ВНДГенетика-3144, культуральна рідина, напівпроникні мембрани, катіоніт КУ-2-8, глутамінова кислота і її солі натрію та калію.

У роботі використані як традиційні, так і спеціальні методи аналізу технологічних процесів. Якість меляси аналізували за методиками, що застосовуються в технологічному контролі виробництва спирту із цукровмісної сировини. В культуральній рідині визначали біомасу турбідиметрично, кількість залишкового цукру — електроколориметричним методом, концентрацію глутамінової кислоти — методом електрофорезу на папері.

Кінетичні показники синтезу глутамінової кислоти визначали за формулами Моно, Міхаеліса-Ментен, Мозера, Єрусалимського, Андрюса. У програмі для математичної обробки результатів процесу біосинтезу на ЕОМ використано метод Рунге-Кутта-Мерсона, де як модель було вибрано такі формули:

$$dx/dt = \mu \cdot x$$

$$dp/dt = \mu \cdot x$$

$$ds/dt = ES \cdot dx/dt - E_p \cdot dp/dt$$

Дослідження процесу біосинтезу глутамінової кислоти в лабораторних умовах проводили в ферментаторах типу АНКУМ у режимах періодичного культивування та доливним методом.

Сорбційні характеристики глутамінової кислоти вивчали за допомогою статичної іонообмінної рівноваги. Процеси сорбції та елюції контролювали за вмістом глутамінової кислоти в розчинах на вході та виході з колони. У пробах визначали вміст глутамінової

кислоти — методом формольного титрування, величину рН — потенціометрично, вміст іонів калію та натрію — методом полум'яної фотометрії, хлоридів, сульфатів та солей твердості — хімічними методами.

Товарну продукцію контролювали по вмісту основної речовини, хлоридів та важких металів.

Апробацію і відпрацювання технології біосинтезу та виділення глутамінової кислоти проводили в умовах дослідно-промислового виробництва потужністю 10 тонн на рік.

Кількісну й економічну оцінки досліджуваних у дисертаційній роботі процесів здійснювали за показниками: біосинтетичної продуктивності культури *Corynebacterium glutamicum*, питомої швидкості її росту; виходу глутамінової кислоти на стадіях післяферментаційної обробки культуральної рідини по відношенню до синтезованої при ферментації.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПАРАМЕТРІВ БІОСИНТЕЗУ ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ

Вплив компонентів поживних середовищ на біосинтез L — глутамінової кислоти культурою *Corynebacterium glutamicum*

Джерело вуглецю. Скринінг меляс з різних регіонів виробництва за біохімічними показниками та продуктивністю біосинтезу показав, що при досить близьких біохімічних показниках меляс використання редукуючих речовин у процесі біосинтезу мало різну ефективність. При використанні всіх досліджуваних зразків меляс не спостерігалось інгібування росту продуцента, проте вихід глутамінової кислоти при цьому істотно змінювався — від $16,9 \pm 0,8$ до $31,8 \pm 1,6$ г/дм³.

Неоднакове використання редукуючих речовин з меляс різних

заводів свідчить про наявність у них компонентів, що пригнічують синтез глутамінової кислоти. Цей висновок підтверджується експериментально при використанні різних меляс для приготування посівного та ферментаційного середовищ. Якщо посівне й ферментаційне середовища готувати з однієї меляси, то накопичення глутамінової кислоти в культуральній рідині, залежно від якості меляси, становить від $7,9 \pm 0,4$ до $19,6 \pm 0,9$ г/дм³. Водночас використання такого ж посівного матеріалу для засіву ферментаційних середовищ з інших меляс підвищує продуктивність процесу відповідно до $13,1 \pm 0,6$ — $28,3 \pm 1,4$ г/дм³.

З метою підвищення біотехнологічних характеристик меляси досліджено вплив попередньої її обробки та видалення барвних речовин. Встановлено, що обробка меляси будь-яким із досліджених способів призводить до втрати 1,0—1,5 % цукру, зменшує кольоровість суслу від 0,5 до 42,0 % світлопропускання по відношенню до води. Разом з барвними речовинами віділяються деякі амінокислоти (треонін, серин, глутамін, аланін, лейцин, тирозин і особливо аміномасляна кислота).

Високий вихід глутамінової кислоти та коефіцієнт конверсії вуглеводів забезпечувався попередньою обробкою меляси аніонообмінною целюлозою АМЦ-3. Оптимальні умови для сорбції речовин-репресорів синтезу глутамінової кислоти досягаються при дозі АМЦ-3 $10,0$ г/дм³ та значенні рН суслу 7,0 (таблиця 1).

Біосинтез глутамінової кислоти підпорядковується вуглець-катаболітній репресії. Тому попередня обробка мелясового суслу інвертазою дає змогу наблизити фазу синтезу глутамінової кислоти до фази росту культури. На середовищі з інвертованою мелясою вже на дванадцятю годину росту продуктивність культури *Corynebacterium glutamicum* по біомасі була на 40 % вища, ніж на суслі без обробки ферментом, і кількість синтезованої на цей час глутамінової кислоти

**Таблиця 1 – Вплив обробки м'ясового сусла
аніонообмінником АМЦ–3 на біосинтез глютамінової кислоти;
 $M \pm m$, $n=5$**

Доза АМЦ–3	Показники культурної рідини на 48 год. ферментації				
	Значення рН	Оптична густина	Глутамінова кислота, г/дм ³	Залишок редуючих речовин, %	Коефіцієнт конверсії вуглеводів, %
0,0	6,3	25,0	29,8±1,4	3,5	43,5
5,0	5,7	27,4	30,8±1,5	4,0	54,9
10,0	5,9	27,1	35,6±1,7	3,7	65,9
20,0	7,0	25,5	36,5±1,8	3,0	66,1

становила $17,0 \pm 0,98$ проти $8,6 \pm 0,7$ г/дм³. Коефіцієнт перетворення вуглеводів у глютамінову кислоту на кінець ферментації на інвертованому суслі також був вищим на 3 %, ніж на неінвертованому, а кількість невикористаного цукру була в 2,3 раза меншою і становила 5,9 проти 12,8 г/дм³.

Кількісний та якісний склад органічних кислот, визначений у процесі ферментації, свідчить про те, що ферментативна обробка сусла стимулює функцію циклу трикарбонних кислот і за рахунок цього скорочується період ферментації та підвищується економічний коефіцієнт процесу біосинтезу глютамінової кислоти.

Джерело азоту та фосфору. Визначеним джерелом азоту із неорганічних солей, яке забезпечує інтенсивний ріст культури *Corynebacterium glutamicum*, є хлористий амоній у присутності однозаміщеного фосфорнокислого калію. Водночас, кількість синтезованої глютамінової кислоти на середовищах з хлористим амонієм помітно змінюється залежно від концентрації в ньому іонів цинку, які вносяться з м'ясою, що обумовлено зміною

направленості синтезу з утворенням глютаміну. Чим вища концентрація хлористого амонію в середовищі, тим менші дози іонів цинку призводять до збільшення синтезу глютаміну. Так, при вмісті в ферментаційному середовищі $0,25 \text{ г/дм}^3$ хлористого амонію і $1,0 \text{ г/дм}^3$ сірчаноокислого цинку глютамін синтезується в кількості $5,5 \text{ г/дм}^3$. При збільшенні вмісту хлористого амонію до $4,0 \text{ г/дм}^3$ уже $0,02 \text{ г/дм}^3$ сірчаноокислого цинку спричиняє синтез глютаміну в кількості $3,8 \text{ г/дм}^3$. Таким чином, одержано підтвердження, що високі концентрації хлористого амонію в слабокислому середовищі в присутності іонів цинку сприяють перетворенню глютамінової кислоти в глютамін. Застосування для посівного середовища двозаміщеного фосфорнокислого амонію, який є одночасно джерелом азоту і фосфору, дає змогу послабити репресивний ефект іонів цинку на синтез глютамінової кислоти та зменшити її втрати на утворення глютаміну. Результати експериментів по визначенню умов, що підвищують ефективність використання поживного середовища (таблиця 2), показали, що накопичення глютамінової кислоти зростає в міру збільшення дози кукурудзяного екстракту в посівному середовищі.

Доза кукурудзяного екстракту практично не впливає на кількість синтезованої біомаси, але істотно підвищує її продуктивність. Можливо, що кукурудзяний екстракт, здійснюючи азотну регуляцію, виступає в процесі ферментації як носій енергетичних запасів клітин і підвищує активність глютамінсинтетази.

Апроксимацією функції однієї перемінної величини отримано залежність виходу глютамінової кислоти від дози кукурудзяного екстракту, яка описується рівнянням:

$$y = 21,1 + 3,5x - 0,147x^2,$$

де y — кількість глютамінової кислоти, г/дм^3 ; x — кількість кукурудзяного екстракту в посівному середовищі, г/дм^3 .

Таблиця 2 – Вплив дози кукурудзяного екстракту на продуктивність культури *Cor. glutamicum* 3144; $M \pm m$, $n = 9$

Доза кукурудзяного екстракту, г/дм ³	Кількість біомаси в посівній культурі, г/дм ³	Показники культуральної рідини			Питома продуктивність	
		Значення рН	Концентрація біомаси, г/дм ³	Вміст глутамінової кислоти, г/дм ³	Посівної культури на 24 годину росту	Культури на 48 годину ферментації
0,0	28,2	5,8	30,9±1,47	21,1±0,98	0,748	0,683
3,0	31,0	5,7	31,1±1,40	30,4±1,42	0,981	0,977
4,5	27,7	5,8	31,7±1,38	33,7±1,38	1,217	1,063
6,0	23,3	5,2	33,4±1,57	36,9±1,60	1,584	1,105

Біологічні дослідження, в яких кількість кукурудзяного екстракту розраховувалась за допомогою рівняння, показали, що вихід глутамінової кислоти досягає максимального значення при дозі екстракту 11,9 г/дм³ і дорівнює 41,9 г/дм³.

Технологічна вода. Вивчено склад вод різних джерел водопостачання, які за сумою катіонів і аніонів, визначеною за величиною мінерального залишку, розміщуються в такий ряд: питна вода із колектора > артезіанська > із криниці > дистильована. Використання цих вод у ферментаційному середовищі по-різному впливало на біосинтез глутамінової кислоти. Максимальне її накопичення відбувалося при використанні артезіанської води, а також на суміші рівних частин артезіанської та дистильованої вод.

За аніонами, здатними асоціювати з молекулами води та знижувати її активність, досліджувані води відрізняються за вмістом хлоридів, які зменшують вихід глутамінової кислоти. Тому вода, що використовується в промисловому виробництві, в своєму складі не

повинна містити хлоридів, важких металів і мати загальну твердість не більше 3 мг-екв/дм³.

Титрувальний агент для рН-стабілізації. Присутність у середовищі крейди обумовлена необхідністю підтримувати буферність та рН середовища. Експериментальні дані (таблиця 3) показали, що застосування крейди, як титрувального агента в межах від 0 до 1,0 % не впливає на утворення та вихід глютамінової кислоти. Отримані результати вказують на те, що крейду можна вилучити із складу ферментаційного середовища, а корекцію величини рН слід проводити внесенням сечовини в процесі ферментації. Це дасть змогу значно спростити процес виділення продуцента із культуральної рідини і зменшити втрати глютамінової кислоти при її очищенні.

Таблиця 3 – Вплив вмісту крейди в ферментаційному середовищі на вихід глютамінової кислоти; $M \pm m$, $n = 5$

Вміст крейди в ферментаційному середовищі, %	Показники культуральної рідини на 48 годину ферментації				
	Значення рН	Оптична густина	Залишкове значення, РР, %	Вихід глютамінової кислоти, г/дм ³	Степінь конверсії, %
0,0	5,6	23,0	4,6±0,21	28,9±1,4	39,6
0,2	5,6	24,0	5,1±0,24	24,5±1,2	36,0
0,4	5,6	23,5	5,3±0,20	23,5±1,0	35,0
0,7	5,6	26,0	4,6±0,22	28,1±1,3	38,8
1,0	5,6	22,0	4,8±0,23	27,0±1,4	38,4

Оптимізація складу ферментаційного середовища. Методом математичного планування експерименту з використанням ортогональних багаторівневих планів оптимізували склад ферментаційного середовища для росту *Corynebacterium glutamicum*

та синтезу глютамінової кислоти. Вхідними факторами були вибрані: меляса, як джерело вуглецю, з діапазоном виміру, %: $10,0 \leq x_1 \leq 20$; діамоній фосфат, як джерело азоту та фосфору, з діапазоном виміру, г/дм³: $0 \leq x_2 \leq 3,0$; кукурудзяний екстракт, як джерело ростових речовин, з діапазоном виміру, г/дм³: $0 \leq x_3 \leq 12,0$. Кількість внесеного в середовище сірчаноокислого магнію — 0,3 % залишалася на одному рівні у всіх варіантах дослідів. Діапазон вимірів для джерел живлення добирали так, щоб рівні кожного із факторів знаходились у лімітуючій зоні. За критерій оптимізації було обрано кількість синтезованої глютамінової кислоти на 48 годину ферментації. Після реалізації дослідів відповідно з матрицею планування трьохфакторного експерименту, розрахунків коефіцієнтів пошукової моделі та оцінки їх значимості по Стюденту отримано рівняння регресії, яке описує досліджуваний процес:

$$y = 2,548 \cdot X_1 + 0,389 \cdot X_2 - 0,434 \cdot X_3 - 0,074 \cdot X_1^2 + 0,229X_1 \cdot X_2 + 0,028X_1 \cdot X_3 - 1,306 \cdot X_2^2 + 0,081 \cdot X_2 \cdot X_3 + 0,08 \cdot X_3^2 - 9,103.$$

Всі змінні мають формалізовані значення, що дає змогу порівняти їх вплив у діапазоні розглядання. Вихід глютамінової кислоти досягає максимуму при такому співвідношенні компонентів ферментаційного середовища:

меляса, % — 18,0;

діамонійфосфат, г/дм³ — 2,5;

кукурудзяний екстракт, г/дм³ — 12,0;

сірчаноокислий магній, % — 0,3,

при цьому вихід глютамінової кислоти на 48 годину ферментації становить 20,85 г/дм³ при коефіцієнті конверсії сахарози — 48,3 %.

Вплив концентрації вуглецю. З підвищенням концентрації меляси в ферментаційному середовищі приріст біомаси змінюється від 7,2 до 23,2 г/дм³ культуральної рідини, а кількість синтезованої глютамінової кислоти поступово зростає і досягає максимуму — 33,1

г/дм³ при концентрації меляси 14,0 %, а потім зменшується у міру підвищення концентрації від 33,1 до 25,2 г/дм³. Чим вища концентрація вуглецю, тим більше інгібується ріст біомаси й тим більше зміщується в часі фаза синтезу глутамінової кислоти.

При розв'язанні системи 3-х диференційних рівнянь першого порядку визначення питомих швидкостей утворення біомаси (m), продукту (p) та споживання субстрату (s) при різній концентрації меляси були визначені їх значення за формулами:

$$dx/dt = \mu \cdot x \quad dp/dt = g_p \cdot x,$$

$$dS/dt = -E_S \cdot dx/dt - E_p \cdot dp/dt,$$

де $\mu = K_i \cdot S / (K_s + S)$; $g_p = g_m \cdot S \cdot x / (K_p + p)$

$K_i = 0,0748$, $K_s = 50,8$, $K_p = 26,44$, $g_m = 0,00304$, $E_x = 4,15$; $E_p = 0,194$.

При збільшенні концентрації зростають питомі швидкості утворення біомаси та глутамінової кислоти, але економічний коефіцієнт використання цукру при цьому зменшується. Середня фізіологічна активність культури досягає максимального значення при концентрації меляси в середовищі 14 % або 100,64 г/дм³ цукру.

Кількість та якість посівного матеріалу. Із урахуванням фізіологічного стану популяції і з метою отримання посівного матеріалу в певній фазі росту використовували інокулят, вік якого був 12, 18, 24, 30 і 36 годин.

За здатністю ефективно накопичувати глутамінову кислоту найбільш придатним був інокулят після 24 годин культивування. При збільшенні тривалості вирощування інокуляту до 30-36 годин його продуктивність зменшувалась відповідно на 7 і 16 %.

Дослідження впливу кількості посівного матеріалу на біосинтез глутамінової кислоти (таблиця 4), які проведені на середовищах з різними мелясами, показали, що збільшення величини засіву від 2,5 до 5,0 % за об'ємом стимулювало утворення глутамінової кислоти і її накопичення збільшилось від 27,8 до 31,7 г/дм³, на 3–7 % менше

синтезувалось кислоти при величині засіву 7,5 об. %. Проте і в цьому варіанті дослідів її кількість була більшою, ніж при засіві 2,5 об.%. Кількість біомаси в культуральній рідині на 48 годину ферментації була на одному рівні, незалежно від величини засіву, однак її приріст у процесі ферментації був тим більший, чим меншою була величина засіву.

Таблиця 4 – Вплив кількості посівного матеріалу на біосинтез глутамінової кислоти; $M \pm m$, $n = 5$

Кількість посівного матеріалу, об. %	Показники 48-годинної культуральної рідини				
	Значення рН	Оптична густина	Залишкова кількість редуруючих речовин, г/дм ³	Кількість глутамінової кислоти, г/дм ³	Коефіцієнт конверсії цукру, %
2,5	5,8	33,2	1,31	27,8±1,25	35,7
5,0	5,8	33,7	1,64	31,7±1,26	42,5
7,5	5,8	34,5	1,80	30,6±1,19	41,9
10,0	5,7	37,0	1,49	26,2±1,25	34,9

Інтенсивність аерації. У ферментаторах типу АНКУМ і АК-210 з корисним об'ємом відповідно 7,8 і 6,9 дм³ з мішалкою, в якій регулюється швидкість від 0 до 1200 хв⁻¹., визначені умови, що забезпечують інтенсивність адсорбції кисню від 2,9 до 15,4 г О₂/дм³. При збільшенні витрат повітря від 60 до 120 дм³ /дм³ · хв без перемішування, кількість розчиненого кисню в середовищі зросла від 2,9 до 7,5 г О₂/дм³ · год., а при працюючій мішалці цей показник зростав тим більше, чим вища швидкість обертання мішалки, і досягав 15,4 г О₂/дм³ · год. при 100 хв⁻¹. Найбільша продуктивність культури по глутаміновій кислоті досягнута при кількості розчиненого кисню в середовищі 9,9 г О₂/дм³ · год. і становила 36,1 г/дм³.

Співвідношення вуглець: азот. Технологічні показники культуральної рідини, яка отримана при ферментації на середовищах з різним співвідношенням вуглецю і азоту (таблиця 5), свідчать про залежність продуктивності культури *Corynebacterium glutamicum* від цього показника і тим більше, чим менша концентрація цукру.

Таблиця 5 – Вплив співвідношення вуглець: азот на біосинтез глутамінової кислоти; $M \pm m$, $n = 5$

Концентрація вуглеводів у середовищі, г/дм ³	Співвідношення вуглець: азот	Показники 48-годинної культуральної рідини			
		Значення рН	Оптична густина	Кількість глутамінової кислоти, г/дм ³	Коефіцієнт конверсії вуглеводів, %
45,6	10,5:1	5,8	29,0	16,6±0,8	40,6
	5,4:1	5,8	27,0	20,4±1,0	46,3
	3,6:1	6,4	27,0	26,7±1,3	58,6
70,2	10,5:1	5,7	33,0	19,8±1,0	34,2
	5,4:1	5,7	26,0	26,9±1,3	44,9
	3,6:1	6,2	26,0	30,2±1,5	46,9
94,3	10,5:1	5,2	30,0	21,6±1,0	33,3
	5,4:1	5,7	27,0	26,7±1,3	36,5
	3,6:1	5,9	26,0	30,8±1,5	42,3

Зменшення показника співвідношення вуглець: азот з 10,5 до 3,5 збільшувало накопичення глутамінової кислоти при всіх досліджених концентраціях цукру. Найбільш економічний процес біосинтезу можна вважати при концентрації цукру 45-50 г/дм³, де коефіцієнт його конверсії в глутамінову кислоту був найвищим та досягав максимуму 58,6 % при співвідношенні вуглець:азот — 3,5:1. Таким чином, збільшення вмісту сечовини в середовищі сприяє підвищенню

кількості глютамінової кислоти, а збільшення при цьому концентрації цукру призводить до збільшення його нераціональних витрат.

Оптимізація технологічного режиму біосинтезу глютамінової кислоти. Дослідження впливу складових частин середовища та технологічних параметрів культивування показали, що фізіологічний стан культури *Corynebacterium glutamicum* характеризується адекватною реакцією на дію середовища. За вхідні параметри оптимізації режиму біосинтезу прийнято концентрацію цукру в середовищі, його співвідношення до азоту, вік посівного матеріалу та дозу кукурудзяного екстракту. Вихідними параметрами вважали вихід глютамінової кислоти, коефіцієнт конверсії цукру та коефіцієнт активності культури.

Умови культивування, при яких питома швидкість росту культури залишилась би на одному рівні (економічний коефіцієнт — максимальний, витрати цукру на підтримку життєдіяльності — мінімальні), досягаються в розробленому й реалізованому в дослідно-промислових умовах способі ферментації з підживленням концентратом меляси (таблиця 6).

В розробленому способі підтримання концентрації цукру на рівні 20-30 г/дм³, оптимальне його співвідношення з азотом сечовини, наявність в середовищі кукурудзяного екстракту стимулювало біосинтетичну активність культури *Corynebacterium glutamicum*. Кількість синтезованої в даних умовах глютамінової кислоти становила 57,6 г/дм³, а коефіцієнт конверсії цукру досягав 60,8 %. У результаті математичної обробки результатів експерименту було розраховано значення виходу глютамінової кислоти й коефіцієнт фізіологічної активності, а також створено апроксимаційні моделі залежності цих величин від кількості споживаного цукру.

$$ГК = 75,39 \cdot \text{Цук.} + 20070/\text{Цук.} - 13,472 \cdot \text{Цук.} \cdot (\text{Цук.} - 1526,3), \text{ г/дм}^3$$

$$K \text{ ф.а} = \text{Цук.} (1375 - 53,53 \cdot \text{Цук.} + 0,69 \cdot \text{Цук.}^2 - 0,0028 \cdot \text{Цук.}^3)$$

При цьому було враховано, що максимальна швидкість утворення глутамінової кислоти має місце в період закінчення фази експоненціального росту біомаси. Отримані результати відповідають відомому принципу максимуму Понтрягіна, при якому максимальне значення інтегральної характеристики забезпечується максимумом диференціальної характеристики в кожний момент часу. Таким чином, з метою оптимізації процесу біосинтезу доцільно проводити культивування культури *Corynebacterium glutamicum* з підживленням субстратом, підтримуючи його концентрацію на рівні 20-30 г/дм³.

Таблиця 6 – Показники ферментації *Corynebacterium glutamicum* з підживленням концентрованим субстратом;

$M \pm m, n = 5$

Концентрація вуглеводів у середовищі, г/дм ³	Показники 48-годинної культуральної рідини				
	Значення рН	Оптична густина	Кількість цукру після підживлення, г/дм ³	Кількість глутамінової кислоти, г/дм ³	Коефіцієнт конверсії, %
0,0	7,0	5,5	53,0	0,0	—
24	7,0	31,0	35,0	3,4	—
30	7,8	33,0	33,0	5,7	—
36	7,5	37,0	41,0	17,2	—
42	7,2	46,0	31,0	28,4	—
48	7,1	48,0	23,0	42,1	—
60		57,0	10,0	53,5	62,0

ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ РЕЖИМІВ ОБРОБКИ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ТА ВИДІЛЕННЯ ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ

Виділення клітин продуцента. Дослідження процесу виділення клітинної біомаси з культуральної рідини свідчать, що повне відокремлення клітин від глютамінової кислоти досягається методом мікрофільтрації. Найбільш високу продуктивність серед перевірених мембран показали мембрани типу САМ і КГМ (Німеччина) та ІРМ-Р і МФФК-1 (Росія). Слід відзначити, що продуктивність вказаних мембран істотно зростає при зменшенні значення рН культуральної рідини перед фільтрацією. Так, при зменшенні значення рН від 7,0 до 4,0 досягалось збільшення середньої швидкості фільтрації з 45 до 73 $\text{дм}^3 \cdot \text{год.}/\text{м}^2$ для мембран типу САМ і від 50 до 78 $\text{дм}^3 \cdot \text{год.}/\text{м}^2$ для МФФК-1, що можна пояснити зміною величини дзета-потенціалу колоїдів та зменшенням впливу концентраційної поляризації.

Вивчено вплив коефіцієнта об'ємної концентрації, об'єму і кратності введення води при діафільтрації на продуктивність мембран та вихід глютамінової кислоти. Найменші її втрати досягаються при коефіцієнті об'ємної концентрації, що дорівнює двом, при трикратному введенні води рівними порціями.

Таким чином, розроблено й апробовано у виробничих умовах спосіб виділення біомаси із культуральної рідини, який дає змогу зменшити втрати глютамінової кислоти на цій стадії до 10,0 %, поліпшити технологічні властивості розчину для обробки на наступних стадіях і екологічну ситуацію процесу, порівняно з іншими відомими способами виділення продуцента.

Вплив фізико-хімічних факторів на виділення глютамінової кислоти способом іонного обміну. Досліджено вплив швидкості

фільтрації, концентрації глютамінової кислоти, висоти фільтруючого шару на процес сорбції. Встановлено, що при збільшенні швидкості фільтрації зменшується ємність катіоніту по глютаміновій кислоті. За величиною втрат амінокислоти оптимальна швидкість сорбції 1,1 см³/хв., при якій зменшується і проскакування катіонів у фільтрат. Враховуючи особливості сорбції глютамінової кислоти на катіоніті, тобто різке зменшення коефіцієнта її селективності при заповненні іоніту, досліджено вплив насичення смоли на процес сорбції (рисунок 1).

Показано, що проскакування глютамінової кислоти починається після проходження двох об'ємів рідини. Вихідна крива сорбції зростає тим крутіше, чим більше об'ємів культуральної рідини пропущено через колону. Після чотирьох об'ємів рідини концентрація глютамінової кислоти в фільтраті навіть перевищує її рівень у вихідному розчині, що обумовлено зменшенням константи обміну й



Рисунок 1 – Вплив насичення смоли на процес сорбції глютамінової кислоти

витисненням глютамінової кислоти з колони іншими іонами. Тому культуральну рідину з активністю 30-40 г/дм³ слід пропускати через колону в кількості не більше двох об'ємів на об'єм смоли.

Експериментальні дані сорбції глютамінової кислоти залежно від її концентрації (рисунк 2) свідчать, що із збільшенням вмісту амінокислоти в розчині ємність катіоніту зростає, розмитість фронту сорбції у фільтруючому шарі іоніту зменшується і відбувається концентрування глютамінової кислоти. Таким чином, у фільтруючому шарі катіоніту формується зона глютамінової кислоти й мінеральних речовин, які виявляють виштовхуючу дію по відношенню до глютамінової кислоти. Цей процес було покладено в основу хроматографічного розподілу глютамінової кислоти і мінеральних іонів.

Вплив довжини шару на формування зони глютамінової кислоти вивчали залежно від кількості катіонітових фільтрів, що працюють послідовно. Визначено, що збільшення кількості фільтрів до трьох

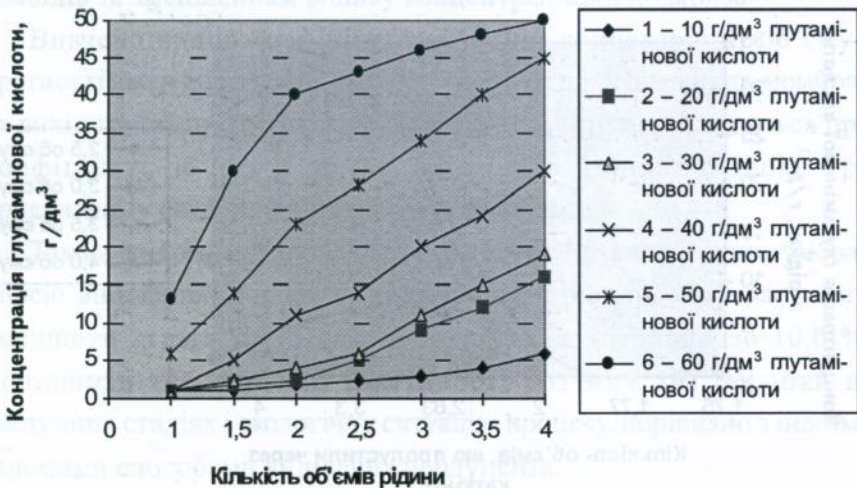


Рисунок 2 – Залежність сорбції глютамінової кислоти від її концентрації в рідині

підвищує сорбційну ємність смоли по глютаміновій кислоті, подовжує міжрегенераційні цикли й забезпечує високу економічність процесу.

Елюція та регенерація. При роботі катіоніту КУ-2-8 в NH_4 формі процес елюції і регенерації проводився одночасно аміачним розчином. Досліджено вплив концентрації елюенту, швидкість елюції і кількість фільтрів для послідовного з'єднання. Експериментальні дані про вплив швидкості пропускання елюючого розчину на процес елюції глютамінової кислоти у вигляді вихідних кривих представлено на рисунку 3.

Максимальної концентрації глютамінової кислоти в перших фракціях елюату ($96-92 \text{ г/дм}^3$) при найменшому його об'ємі було досягнуто при початковій швидкості елюенту $2,4 \text{ см}^3/\text{хв.}$ з наступним її зменшенням до $1,1 \text{ см}^3/\text{хв.}$

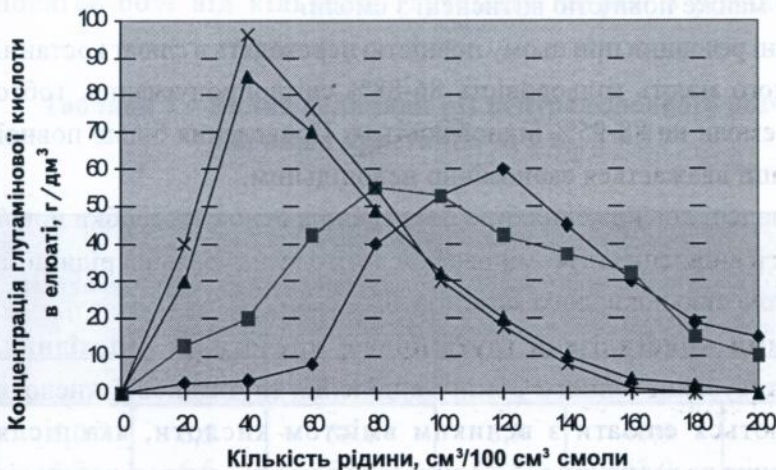


Рисунок 3 – Залежність елюції глютамінової кислоти від швидкості проходження елюенту

- ◆ 1 – 1,1 см³/хв.
- 2 – 2,4 см³/хв.
- ▲ 3 – 3,3 см³/хв.
- × 4 – 2,4 → 1,1 см³/хв.

У процесі досліджень було отримано велику кількість експериментальних даних, які вказують на те, що концентрація елюенту і швидкість його подачі на колону мають певну залежність: чим менша концентрація елюенту, тим меншою повинна бути швидкість фільтрації і чим більша концентрація аміаку, тим більша швидкість пропускання елюенту.

Для дослідженої швидкості проходження елюенту оптимальною його концентрацією є 1,0 н розчин аміаку. При цьому в перших 3-4 фракціях глутамінова кислота виділяється у вигляді кристалів, які містять 98,5-99,0 % основної речовини. Такий ступінь чистоти глутамінової кислоти дає змогу використовувати її без перекристалізації для отримання глутамату натрію.

У зв'язку з тим, що основним показником закінчення елюції є вміст у фільтраті глутамінової кислоти до $0,2 \text{ г/дм}^3$, то аналіз мінеральних домішок K^+ , Na^+ і $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ на цей період вказує на те, що вони майже повністю витиснені з смоли.

Барвні речовини при цьому повністю переходять в елюат і останні порції його мають кольоровість 86-88% світлопропускання, тобто ємність смоли на 88-95% відновлюється. Проведення більш повної регенерації вважається економічно недоцільним.

Викладені дослідження було покладено в основу розробки нової технології виділення глутамінової кислоти з культуральної рідини за допомогою сильнокислого катіоніту КУ-2-8.

Режими кристалізації глутамінової кислоти та її похідних.

При застосуванні іонного обміну виділення глутамінової кислоти утворюються елюати з великим вмістом кислоти, яка після підкислення до величини рН 3,2 випадає з елюату у вигляді кристалів ромбічної форми. Вихід глутамінової кислоти становить не менше 95 %, маточний розчин повертається на попередню стадію і за рахунок цього зменшуються її втрати на 2,38%.

Кінетику кристалізації солей глутамінової кислоти вивчали залежно від співвідношення глутамінова кислота: вода, величини рН нейтралізованого розчину, його пересичення і температури.

Експериментально встановлено, що при розчиненні глутамінової кислоти для отримання її солей калію та натрію оптимальним співвідношенням кислота: вода є 1:2. Проте, вже на стадії нейтралізації глутамінової кислоти між цими солями спостерігаються істотні відмінності. При отриманні глутамату натрію нейтралізацію необхідно проводити до величини рН розчину рівної 6,0, оскільки після його освітлення вугіллям і упарювання значення рН розчину підвищується, зменшуючи вихід кристалів глутамату натрію (таблиця 7).

Стійка рівновага розміру кристалів з розчином забезпечується при його концентрації 58-60% сухих речовин (таблиця 8).

При цьому забезпечується необхідний ріст кристалів, а їх вихід досягає 60% від кількості глутамату натрію в розчині. При

Таблиця 7 – Вплив величини рН нейтралізованого розчину на вихід кристалів; $M \pm m$, $n = 3$

Величина рН	Показники розчину				Вихід кристалічного глутамату натрію, %
	Після кристалізації		Після упарювання		
	Значення рН	Кількість сухих речовин, %	Значення рН	Кількість сухих речовин, %	
6,0	6,5	55,1	6,7	40,0	57,0
6,2	6,6	55,2	6,8	43,0	56,2
6,4	7,0	55,1	8,5	42,0	55,2
6,6	7,8	55,4	9,0	41,0	55,2
6,8	8,0	56,0	9,0	43,0	55,2
6,9	8,3	55,8	9,6	43,0	55,2

Таблиця 8 – Вплив пересичення розчину на вихід кристалічного глутамату натрію; $M \pm m$, $n = 5$

Сухі речовини в упареному розчині, %	Вміст глутамату натрію в упареному розчині, г/дм ³	Маса кристалів глутамату натрію, г	Вихід кристалічного глутамату натрію, %
46,0	268±2,6	2,4	5,2
48,0	320±3,1	4,0	8,3
50,0	408±1,4	5,8	11,6
52,0	450±7,2	10,9	21,0
54,0	480±5,2	22,1	50,0
56,0	510±4,3	28,3	55,8
58,0	526±2,1	34,5	60,0
60,0	556±6,5	35,6	60,4
62,0	586±10,1	—	—
64,0	616±7,2	—	—

пересиченні нижче вказаних концентрацій зародження кристалів та їх ріст триває повільніше й при досконалій формі кристала вихід цільового продукту зменшується. Із збільшенням пересичення розчину більше 60% сухих речовин відбувається миттєве й масове утворення дрібних кристалів і отримати товарний глутамат не вдається. Це явище спостерігається й при швидкому переохолодженні розчину. Тому в процесі кристалізації слід проводити поступове й плавне зменшення температури не більше 3-4°C за годину, щоб за перші 12 годин процесу досягти температури розчину 10°C. Після цього, зменшуючи температуру до 5°C, можна збільшити вихід кристалічної речовини. Крива, що характеризує залежність розчинності калієвої солі від температури (рисунок 4) показує, що глутамат калію, на відміну від натрію, сильнорозчинний у воді,

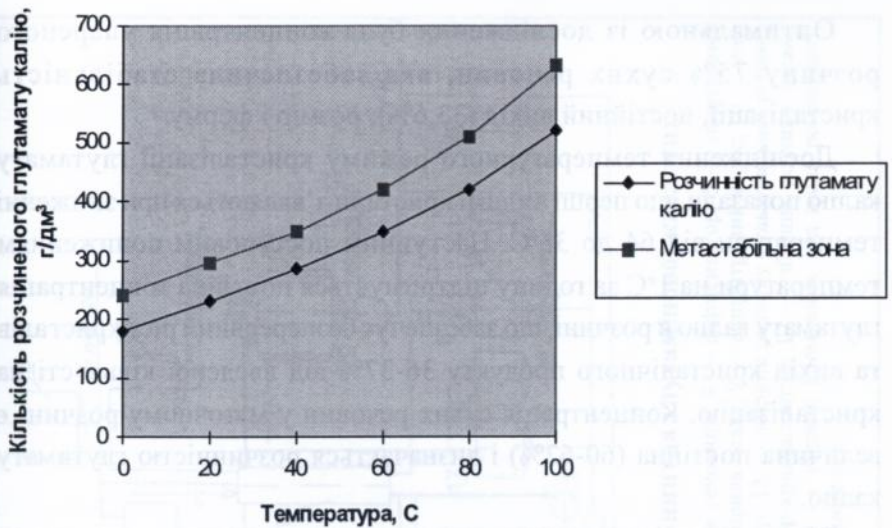


Рисунок 4 – Залежність розчинності глютаму калію від температури

розчинність якого різко зростає в межах температур 70-100°C. Ці дані вказують на те, що для досягнення стану пересичення розчину в ньому повинна бути висока концентрація сухих речовин.

При приготуванні розчинів з вмістом сухих речовин 58, 64, 70, 75 і 82% та їх охолодженні встановлено, що поступовим збільшенням лише концентрації сухих речовин не вдалось вивести процес на самозародження кристалів. Навіть при охолодженні упареного розчину з вмістом сухих речовин — 82% до температури 18°C кристалізація не відбулася. Введення в цей розчин мінімальної кількості кристалів глютаму калію (не більше 0,5% до його вмісту в розчині) було моментом прикладання енергії до активації подальшого росту кристалічних зародків і переходу системи до спонтанної кристалізації.

Оптимальною із досліджених була концентрація упареного розчину 75% сухих речовин, яка забезпечила стабільність кристалізації, постійний вихід (33,6%), розмір і форму.

Дослідження температурного режиму кристалізації глютамату калію показали, що перші видимі кристали з'являються при зниженні температури від 64 до 38°C. Наступним поступовим пониженням температури на 1°C за годину підтримується постійна концентрація глютамату калію в розчині, що забезпечує безперервний ріст кристалів та вихід кристалічного продукту 36-37% від введеної кількості на кристалізацію. Концентрація сухих речовин у маточному розчині є величина постійна (60-62%) і визначається розчинністю глютамату калію.

Відпрацювання режимів технології на дослідно-промисловій установці показало, що основні показники процесу біосинтезу та обробки культуральної рідини на стадії виділення глютамінової кислоти були на рівні аналогічних показників, які досягалися на стендовій установці.

Технологічний процес отримання солей глютамінової кислоти подається на апаратурно-технологічній схемі (рисунок 5), яка характеризується наступними техніко-економічними показниками процесу.:

Концентрація глютамінової кислоти в культуральній рідині г/дм ³ , не менше	40,0
Тривалість процесу ферментації, год.	52-66
Коефіцієнт заповнення ферментатора	0,6
Вирощування посівного матеріалу, год.	24
Повний оберт посівного апарата, год.	40
Повний оберт ферментатора, год.	72
Витрати стерильного розчину сечовини на ферментацію, м ³	0,057
Повний оберт збірника сечовини, год.	36

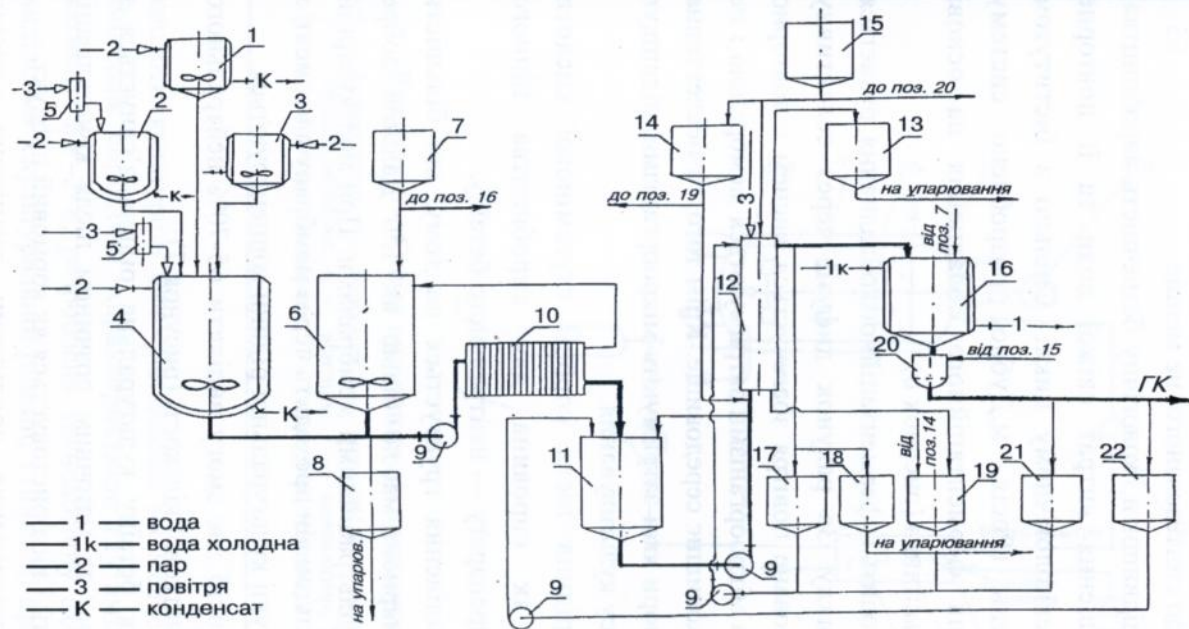


Рисунок 5 – Апаратурно-технологічна схема виробництва глютамінової кислоти:

1 — апарат-сателіт поживного середовища; 2 — інокулятор; 3 — збірник сечовини; 4 — ферментатор; 5 — повітряний фільтр; 6 — реактор; 7 — збірник концентрованої сірчаної кислоти; 8 — збірник осаду; 9 — відцентровий насос; 10 — мікрофільтраційна установка; 11 — збірник фільтрату; 12 — іонітний фільтр; 13 — збірник розчину культуральної рідини; 14 — збірник елюату; 15 — збірник дистильованої води; 16 — реактор-кристалізатор; 17 — збірник розчину аміаку (елюенту); 18 — збірник останньої фракції регенеруючого розчину; 19 — збірник промивних вод після регенерації; 20 — нутч-фільтр; 21 — збірник маточного розчину; 22 — збірник промивних вод

Кількість завантажень ферментатора за тиждень	2
Вихід продукту, % до синтезованого, не менше	65

Для того, щоб підвищити екологічну безпечність виробництва, передбачено зменшення витрат свіжої води та її повторне використання в технологічному циклі. Спільно з Інститутом ядерних досліджень (Росія, м.Дубно) розроблено систему повітрязабезпечення ферментаційного обладнання на основі дифузійного газообмінника (рисунок 6).

Повітря, яке виходить із ферментаційного обладнання, рухається по замкнутому циклу. За рахунок дифузії через селективну мембрану відпрацьоване повітря збагачується киснем і повторно використовується, а мікроорганізми затримуються мембраною і не потрапляють у навколишнє середовище. Крім того, газоселективна ядерна мембрана, пори якої затримують мікроорганізми, підвищує стерильність процесу культивування.

Культуральна рідина після сорбції глютамінової кислоти використовується як сировина для виробництва цінного фармакологічного препарату — нейтрального бетаїну.

Спосіб його виділення ґрунтується на тому, що більшість речовин з молекулярною масою більш як 150 Дальтон добре затримується нанофільтраційними мембранами. При молекулярній масі бетаїну 119 Дальтон він проходить через мембрану в пермеат, а інші органічні сполуки культуральної рідини концентруються.

Розроблений спосіб дає змогу виділити 65-70% нейтрального бетаїну від його початкової кількості (рисунок 7).

Після виділення бетаїну культуральна рідина з'єднується з мікробною біомасою та маточним розчином після кристалізації глютамінової кислоти і використовується як кормовий продукт.

У результаті проведених досліджень визначено основні технологічні та біологічні параметри біосинтезу глютамінової

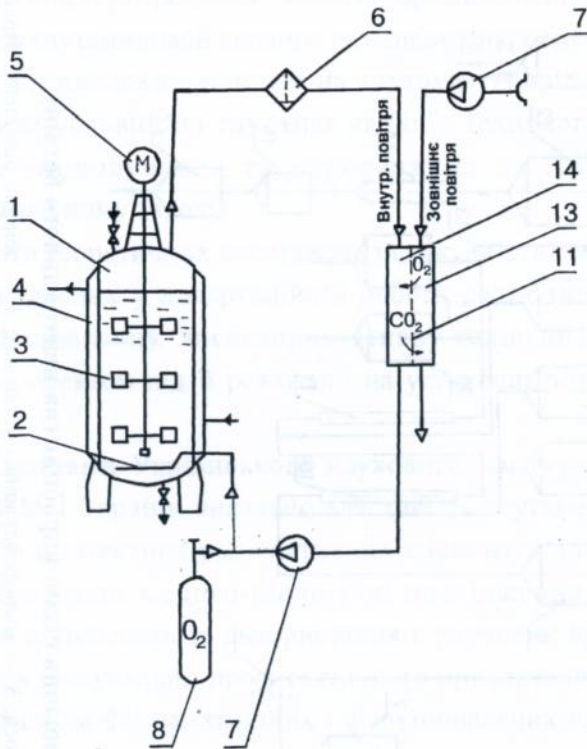


Рисунок 6 – Схема очищення відпрацьованого повітря:

- 1 — ферментатор; 2 — барботер; 3 — мішалка; 4 — охолоджувальна оболонка;
 5 — привод мішалки; 6 — вентиль; 7 — вентилятор; 8 — джерело кисню;
 9 — напівпроникна мембрана; 10 — контур внутрішній; 11 — контур зовнішній

кислоти культурою *Cor. glutamicum* на м'ясових середовищах. Вивчено сорбційні характеристики глютамінової кислоти на катіоніті КУ-2-8, розроблено технологічну схему виробництва її виділення з культуральної рідини, утилізації промислових відходів та захисту повітряного басейну.

На основі відпрацювання технологічних режимів на всіх стадіях

виробничого циклу розроблено: “Опытнo-промышленный регламент производства глутаминовой кислоты на основе микробиологического синтеза”, “Технические условия на глутамат натрия пищевой”, “Технические условия на глутамат калия”. Технологія пройшла виробничі випробування та впроваджена на Лужанському експериментальному заводі.

Результати теоретичних досліджень та сукупність технологічних рішень, викладених у дисертаційній роботі, дали змогу створити конкурентоспроможну, високопродуктивну технологію з річним екологічним ефектом від її реалізації на установці потужністю 10 тонн на рік.

Дослідженнями Українського наукового центру радіаційної медицини АМН України виявлено властивість глутамату калію як ефективного протектора радіоактивних елементів для організму людини. Проведені медико-біологічні дослідження глутаматів підтвердили доцільність їх використання в харчових продуктах як масового, так і лікувально-профілактичного призначення.

З урахуванням фізико-хімічних і функціональних властивостей та рекомендованих доз глутаматів, необхідних для життєдіяльності організму людини, розроблено рецептури нових видів харчових продуктів з глутаматами: сольові композиції, суп “Вермишельовий особливий”, м’ясні консерви, паштет “Детский”. Аналіз цих продуктів показав, що внесення глутаматів посилює їх смакові якості.

ВИСНОВКИ

Узагальнюючи викладане, можна стверджувати, що проведені дослідження дали змогу опрацювати теоретичні положення взаємного впливу сукупних факторів, які лімітують біосинтез глютамінової кислоти і, як наслідок, збільшити економічний коефіцієнт і продуктивність процесу при його реалізації у виробництві.

Дослідження та математичне моделювання процесів післяферментаційної обробки культуральної рідини дало можливість розробити технологію виділення глютамінової кислоти та її очистки до вимог, що пред'являються до харчових продуктів.

1. Науково та експериментально обгрунтовано перспективність виробництва L-глютамінової кислоти на основі мікробіологічного синтезу. Розроблено і реалізовано у виробництві ефективний спосіб одержання глютамінової кислоти шляхом культивування мутанта *Corynebacterium glutamicum* ВНДГенетика 3144, який здатний її синтезувати на м'ясових середовищах з високим вмістом біотину.

2. Розроблено наукові основи та оптимізовано параметри підвищення технологічних властивостей м'яса шляхом сорбції високомолекулярних сполук і інверсії цукру. Здійснення процесу попередньої обробки м'ясового розчину дало змогу наблизити фазу синтезу глютамінової кислоти до фази росту культури, збільшити ефективність використання цукру на 17,0–24,0 % та економічність процесу — від 46,0 до 65,9 %.

3. Проведено скрінінг та підібрано комплексне джерело азоту й фосфору, що не репресує і не змінює направленості синтезу глютамінової кислоти з утворенням глютаміну в присутності іонів цинку, які надходять у ферментаційне середовище з м'ясою.

4. Методом математичного планування трьохфакторного експерименту розроблено й оптимізовано склад ферментаційного сере-

довища для збалансованого росту культури та синтезу глютамінової кислоти. Розроблено математичну модель, за допомогою якої можна прогнозувати склад середовища для максимального виходу цільового продукту.

5. Встановлено, що найбільша біосинтетична активність культури *Corynebacterium glutamicum* проявляється при використанні інокуляту, вік якого не перевищує 24 години. Незалежно від складу м'яса, стійкий пік синтезу глютамінової кислоти знаходиться при внесенні в середовище 5,0–7,5 об.% інокуляту.

6. Доведено, що біосинтез глютамінової кислоти залежить від співвідношення вуглець:азот і тим більше, чим менша концентрація вуглецю в середовищі. Найбільша економічність процесу біосинтезу досягається при співвідношенні вуглець : азот, як 3,5 : 1, при якому коефіцієнт конверсії в глютамінову кислоту максимальний і становить 58,6%.

7. Науково обгрунтовано й розроблено технологію біосинтезу глютамінової кислоти при регульованій концентрації цукру на необхідному і достатньому рівні (20–30 г/дм³), що зменшує субстратну репресію. Реалізація такої технології в промислових умовах забезпечила збільшення продуктивності процесу до 57,6 г/дм³ глютамінової кислоти проти 40,0 г/дм³ за традиційним способом.

8. Науково обгрунтовано й оптимізовано параметри мікрофільтраційного виділення бактеріальної біомаси із культуральної рідини, що сприяє ефективній подальшій її обробці: установка UF1 30/20, плоскопаралельна, при перепаді тиску — 0,1 МПа.

9. На підставі дослідження та оптимізації технологічних режимів сорбції та елюції розроблено маловідхідну технологічну схему іонообмінного виділення глютамінової кислоти на катіоніті КУ-2-8 в NH₄⁺-формі, яка забезпечує її концентрування з одночасним

відокремленням від основної маси мінеральних речовин.

10. Досліджено і розроблено оптимальні режими кристалізації калієвої (концентрація сухих речовин 74-75 %, швидке зниження температури до 38°C з наступним її зниженням на 1°C за годину) та натрієвої (концентрація сухих речовин 58-60 % при поступовому зниженні температури на 3-4 °C за годину) солей глютамінової кислоти. При розроблених параметрах вихід кристалічних глютаматів калію та натрію становить відповідно 57 та 37 % від їх вмісту в розчині.

11. Розроблено принципово нову схему постачання повітря в ферментаційне обладнання на основі дифузійного газообмінника, що забезпечує ефективний захист навколишнього середовища від викидів мікроорганізмів при ферментації.

12. Із застосуванням нанофільтрації, зворотного осмосу та іонного обміну розроблено технологію нейтрального бетаїну з відходів виробництва, яка забезпечує істотне зменшення вмісту органічних речовин в культуральній рідині, що підлягає очищенню. Вихід нейтрального бетаїну становить 65 % від його вмісту в культуральній рідині, що вище, ніж в існуючому хімічному способі.

13. Собівартість глютамату натрію за розробленою технологією становить 11,2 гривні за 1 кг при його виробництві 10 тонн на рік. При рівні рентабельності 34 % термін окупності капітальних вкладень — 4,4 року, а очікуваний річний економічний ефект становить 13 500 гривень.

14. Із застосуванням вітчизняних глютаматів розроблено рецептури та напрацьовані дослідно-промислові партії сольових композицій та харчових концентратів. Встановлено, що добавка глютамату калію позитивно впливає на кінетику радіоізотопів, посилює смак натуральних продуктів довготривалого зберігання,

забезпечує зменшення кількості радіоцезію на 12,6 та радіостронцію на 15,7 % в організмі людини.

Науково-практичний рівень і економічна ефективність виробництва глютамінової кислоти, які досягнуті завдяки впровадженню запропонованих у дисертаційній роботі технологій, не є граничними. Застосування більш продуктивних штамів продуцентів та середовищ для їх культивування, використання дешевих джерел вуглецю, баромембранної техніки та технології на стадіях біосинтезу і виділення глютамінової кислоти можуть значно підвищити ефективність та поліпшити екологію виробництва.

Основний зміст роботи викладено в наступних наукових публікаціях:

Брошури:

1. Методические указания к выполнению лабораторных работ по теме: "Биосинтез глутаминовой кислоты" дисциплины "Общая технология микробиологических производств"/Артюхов В.Г.,Олійничук С.Т., Поводзинский В.Н.,Решетняк Л.Р.- К.:КТИПП.- 1991.- 39 с.

Статті у наукових виданнях:

2. Оптимизация питательной среды при сбраживании мелассы/ Л.В.Левандовский,С.Т.Олійничук, А.Д.Коваленко и др.// ЭИ Пищевая промышленность.Серия 7: Винодельческая, спиртовая, ликероводочная и пиво-безалкогольная промышленность.-1986.-Вып.1.-С.13-15.

3. Лаврищева Т.Н.,Олійничук С.Т.,Омельянчик Т.К. Оптимизация процесса отделения биомассы при получении глутаминовой кислоты микробиологическим синтезом // Сборник научных трудов ВНИИППД "Химия и технология пищевых продуктов", вып.1.- К.,1988.- С.36-40.

4. Лаврищева Т.Н.,Олійничук С.Т.,Омельянчик Т.К. Сравнительная оценка эффективности анионитов при сорбции красящих веществ растворов глутаминовой кислоты // Сборник научных трудов ВНИИППД "Химия и технология пищевых продуктов", вып.1.-К.,1988- С.41-50.

5. Лаврищева Т.Н., Олійничук С.Т. Получение глутамата натрия микробиологическим синтезом // Сборник научных трудов ВНИИППД "Химия и технология пищевых продуктов", вып.2 - Киев, 1990.- С. 22-28.

6. Использование органических растворителей при выделении глутаминовой кислоты из культуральной жидкости/ Олійничук С.Т.,Левандовский Л.В.,Строкова Т.С.,Омельянчик Т.К.// Сборник научных трудов ВНИИППД "Химия и технология пищевых продуктов", вып.3.-К.,1991.- С.43-48.

7. Олійничук С.Т.,Лаврищева Т.Н.,Красун Е.П.Изучение условий выделения ионов жесткости из культуральной жидкости при сорбции

глутаминовой кислоты катионитом КУ-2// Сборник научных трудов ВНИИППД “Химия и технология пищевых продуктов”, вып.3.- К.,1991.- С.41-50.

8. Влияние магнитного поля на продуктивность культуры *Corynebacterium glutamicum* / Воловик П.Н.,Зубченко В.С., Исай В.И., Олійничук С.Т., Ткаченко Л.В., Строкова Т.С. // Известия вузов “Пищевая технология”.- 1992.- №38. - С. 51-53.

9. Янчевський В.К., Олійничук С.Т., Кравець О.Ф. Перспективи створення індустрії біологічно повноцінних продуктів харчування в Україні // Вісник аграрної науки.- 1992.- №10 (510).- С. 106-111.

10. На основі мікробіологічного синтезу/Олійничук С.Т., Вакуленко В.О., Шевченко В.І та інші // Харчова і переробна промисловість . - 1993. - N 9. - С.8- 9.

11. Нейтральний бетаїн/Олійничук С.Т.,Шевченко В.І., Шалабанов С.М., Ус С.В.// Харчова і переробна промисловість.-1993.-№9.- С.8-9.

12. Олійничук С.Т.,Левандовський Л.В. Ферментація м'ясового сусла / /Харчова і переробна промисловість.-1995.-№7.-С.9-11.

13. Мікробіосинтез глутамінової кислоти / Олійничук С.Т., Вакуленко В.О., Шевченко В.І., Омелянчик Т.К. // Харчова і переробна промисловість.- 1996.- №1.- С. 24.

14. Олійничук С.Т.,Вакуленко В.О.Вплив складу м'яси на ріст штаму *Corynebacterium glutamicum* і синтез глутамінової кислоти // Вісник аграрної науки. - 1996.-№6.- С.75-78.

15. Олійничук С.Т.,Шевченко В.І.,Гайдай Л.І. На онові баромембранної техніки//Харчова і переробна промисловість.-1996.-№ 4.- С.22.

16. Олійничук С.Т. Використання відходів виробництва глутамінової кислоти та її солей// Вісник аграрної науки.-1996.-№11.-С.59-61.

17. Олійничук С.Т. Вдосконалення технології одержання глутамінової кислоти та її солей //Харчова і переробна промисловість.-1996.-№12.- С.35-36.

18. Олійничук С.Т. Вплив ферментаційного середовища на біосинтез глутамінової кислоти культурою *Corynebacterium glutamicum*//Харчова

і переробна промисловість.-1997.-№2.-С.37.

19. Олійничук С.Т.Оптимізація технологічного режиму кристалізації глутамінової кислоти та її натрієвої солі// Вісник аграрної науки.-1997.-№2.- С.60-62.

20. Олійничук С.Т.Оптимальні параметри одержання глутамінової кислоти//Вісник аграрної науки.-1997.-№3.- С.58-61.

Авторські свідоцтва СРСР та патенти України:

21. А.с.№ 1075741 (СССР), С 12 С 7/04. Способ подготовки мелассы к сбраживанию / Янчевский В. К., Олійничук С.Т., Коваленко А. Д. - Оpubл.22.10.83.

22.А.с.№ 1361486 (СССР), G 01 N 33/14. Способ определения количества сбраживаемых сахаров в мелассе / Левандовский Л.В., Коваленко А.Д.,Олійничук С.Т., Островская Т.В. - Оpubл. 22.08.87.

23.А.с.1342029(СССР), МКИ С12 Р 7/06. Способ сбраживания мелассного сусла/ А.Д.Коваленко, С.Т.Олійничук, Л.В.Левандовский, В.И.Шевченко.-4с.

24. А.с.№ 1571500 (СССР), G 01 N 33/14. Способ определения начальной концентрации сбраживаемого углеводсодержащего сусла / Левандовский Л.В., Олійничук С.Т., Коваленко А.Д. Оpubл. 15.02.90.

25. А.с.№ 1017713 (СССР), С 12 С 7/04. Способ подготовки мелассы к сбраживанию/ Олійничук С.Т., Янчевский В.К., Коваленко А.Д., Омелянчик Т.К. - Оpubл. 14.01.83.

26. А.с.№ 1637335 (СССР), МКИ С 12 Р13/14. Способ выделения глутаминовой кислоты из культуральной жидкости / Тер-Саркисян Э.М., Олійничук С.Т., Макаренко К.Д., Петухова Н.Н., Левандовский Л.В. и др. - Оpubл.20.04.96

27. А.с.№ 1682393 (СССР), МКИ С 12 Р13/14. Способ выделения глутаминовой кислоты из культуральной жидкости / ОлійничукС.Т.,Тер-Саркисян Э.М., Левандовский Л.В. и др. Оpubл.07.10.91.

28. А.с.№1738844 (СССР), МКИ С 12 М 1/08. Установка для культивирования микроорганизмов/Олійничук С.Т.,Овчинников

- В.В.Кузенков В.А.,Заднепрный Ю.В. и другие - Опубл.8.02.1992.
29. Спосіб біосинтезу L-глутамінової кислоти / Олійнічук С.Т., Вакуленко В.О.Рішення про видачу патента України від 11.12.1995, № заявки 95125214.
30. Спосіб виділення глутамінової кислоти / Олійнічук С.Т., Вакуленко В.О., Шевченко В.І. Рішення про видачу патента України від 19.01.1996, № заявки 96010237.
31. Спосіб підготовки живильного середовища для біосинтезу L-глутамінової кислоти / Олійнічук С.Т., Вакуленко В.О. Рішення про видачу патента України від 11.12.1995, № заявки 95125213.
32. Спосіб одержання нейтрального бетаїну / Олійнічук С.Т., Шевченко В.І., Гайдай Л.І.,Савчук М.Я.Рішення про видачу патента України від 21.12.1995, № заявки 95125402

Депановані статті:

33. Вплив концентрації вуглецю та посівного матеріалу на біосинтез глутамінової кислоти/Олійнічук С.Т.: УкрНДІспиртбіопрод.-Київ,1996.-9с.- Деп.в УкрІНТЕІ 25.12.96, №339-Ук- 96.
34. Залежності біосинтезу глутамінової кислоти від джерел азоту/ Олійнічук С.Т.: УкрНДІспиртбіопрод.-Київ,1996.-13с.-Деп.в УкрІНТЕІ 25.12.96, №340,Ук-96.
35. Оптимизация условий элюирования глутаминовой кислоты при ионообменном способе ее выделения из культуральной жидкости/ Олійнічук С.Т.,Лаврищева Т.Н.:-УкрНДІспиртбіопрод.-Киев,1995.-8с.- Библиограф.:2назв.-Рус.-Деп.в ГНТБ Украины 21.11.95,№2440-Ук-95.
36. Вплив якості технологічної води на ферментацію *S.glutamicum*/ Олійнічук С.Т.:-Укр.НДІспиртбіопрод.-Київ,1996.-6с.-Деп.в УкрІНТЕІ 25.12.96,№ 338-Ук- 96.
37. Вплив кукурудзяного екстракту на ріст і продуктивність культури *S.glutamicum*/Олійнічук С.Т.: -УкрНДІ спиртбіопрод.-Київ, 1996.-8с.- Укр.-Деп.в УкрІНТЕІ25.12.96,№337-Ук-96.

Тези доповідей:

- 38.** Олійничук С.Т., Кизюн Г.А. Перспективи применения мембранных процессов в производстве глутаминовой кислоты. Перспективы сотрудничества в области мембранной техники с ГДР// Совершенствование технологических процессов производства новых видов пищевых продуктов и добавок: Тезисы докладов Всесоюзной конференции молодых ученых и специалистов, март 1989 г.- К.,1989.- С.57-58.
- 39.** Разработка технологии выделения глутаминовой кислоты способом ионного обмена / Лаврищева Т.П.,Олійничук С.Т., Омельянчик Т.К., Красун Е.П.// Разработка и внедрение высокоэффективных ресурсосберегающих технологий, оборудования и новых видов пищевых продуктов в пищевую и перерабатывающую отрасли АПК: Тезисы докладов Республиканской научно-технической конференции, 24-26 сентября 1991 г. - К.,1991. - С.117.
- 40.** Применение микрофльтрации для выделения продуктов в биотехнологических процессах / Олійничук С.Т., Левандовский Л.В., Шевченко В.И.,Омельянчик Т.К.// Мембранная техника в медицине и биотехнологии: Тезисы докладов Всесоюзной конференции, 23-24 октября 1991 г.,г.Москва.-М.,1991.-С.11-12.
- 41.** Олійничук С.Т.,Шевченко В.И.,Омельянчик Т.К. Баромембранное выделение продуцента глутаминовой кислоты из культуральной жидкости // Совершенствование технологических процессов производства новых видов пищевых продуктов и добавок. Использование вторичного сырья пищевых ресурсов: Тезисы Всесоюзной научно-технической конференции, октябрь 1991, ч.2.- К., 1991.- С. 16-17.
- 42.** Розробка технології одержання препарату глутамату калію / Олійнічук С.Т., Вакуленко В.О., Омельянчик Т.К., Новінська М.Є. // Розробка та впровадження нових технологій і обладнання у харчову та переробні галузі АПК. Тези доповідей Міжнародної науково-технічної конференції, 19-21 жовтня 1993р. - К., 1993.- С.168-169.
- 43.** Новий замінювач солі лікувально-профілактичного призначення /

Притульська Н.В., Олійнічук С.Т., Казаченко С.В., Горшков В.П.// Розробка та впровадження нових технологій і обладнання у харчову та переробні галузі АПК: Тези доповідей Міжнародної науково-технічної конференції, 19-21 жовтня 1993 р.- К.,1993.- С. 229-230.

44. Новые виды пищевых концентратов с радиозащитными свойствами/ Зеленюх З.В.,Олійничук С.Т.,Вовнянко Е.К.,Заднепрная З.А.,Осовик А.Н. и другие //Протирадіаційні засоби та їх застосування у зв'язку з аварією на ЧАЕС: Матеріали симпозиуму,28-29 вересня 1995 р,-К.,1995,- С. 21.

45. К вопросу получения глутамата калия / Олійничук С.Т.,Вакуленко В.А.,Корзун В.Н.,Сагло В.И.// Протирадіаційні засоби та їх застосування у зв'язку з аварією на ЧАЕС: Матеріали симпозиуму, 28-29 вересня 1995 р.-К.,1995.- С.47.

46. Олійнічук С.Т.,Вакуленко В.А.Глутамати,їх цінність і можливість одержання для України// Україна в світових,продовольчих і кормових ресурсах і економічних відношеннях: Матеріали міжнародної конференції,11-12 грудня 1995р.- Вінниця,Інститут кормів,1995,- С.230.

47. Олійничук С.Т.,Шевченко В.И.,Гайдай Л.И. Технология получения нейтрального бетаина из мелассной барды // Экология пици: химические взаимодействия в пищевых системах (Ессенуки, июнь 1995 г.): Тезисы докладов- Е.,1995.-С.22 .

Олійничук С.Т.

Разработка и внедрение технологий глутаминовой кислоты и ее производных на основе микробиологического синтеза.

Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 05.18.07 — технология продуктов брожения.

Украинский государственный университет пищевых технологий, Киев, 1997 г.

Защищаются 47 научных работ, в том числе-8 авторских свидетельств СССР, 4 Решения на выдачу патента Украины, содержащие комплекс теоретических и экспериментальных исследований по биосинтезу, выделению и очистке глутаминовой кислоты и получения ее производных калия и натрия.

Определены состав ферментационных сред и влияние физико-химических факторов на продуктивность культуры *Corynebacterium glutamicum* по глутаминовой кислоте. Разработаны технологии выделения продуцента из культуральной жидкости, получения кристаллической глутаминовой кислоты и ее солей калия и натрия. Разработаны пути и рецептуры использования производных глутаминовой кислоты в пищевой промышленности. Создано и освоено промышленное производство разработанных технологий на Лужанском экспериментальном заводе, разработан технологический регламент и нормативно-техническая документация на производные глутаминовой кислоты. Приведены данные об эффективности разработанной технологии.

Ключові слова: культура *Corynebacterium glutamicum*, біосинтез, сорбція, елюція, мікрофільтрація, кристалізація, глутамінова кислота, солі глутамінової кислоти.

Olynychook S. T.

Working out and introduction of advanced know-how of glutaminic acid and its derivatives on the basis of microbiological synthesis.

The thesis for doctor's degree of technical sciences for field 05.18.07-the technology of fermentation products.

Ukrainian State Universitet of food technologies, Kiev, 1997.

47 scientific works and 8 author's certificate USSR, 4 Resolution for issue of Ukrain patent were defended and contain a complex theoretical and experimental researches for biosynthesis, select and purifi of glutaminic acid and receiving its potassium and sodium derivatives.

The contain of fermentation meduims and influence of physical-chemistry factors for productivity of *Corynebacterium glutamicum* for glutaminic acid were determinationed. The technologies of selecting producent from cultural liquid and receiving of crystalline glutaminic acid and its potassium and sodium salts had been worked out. The ways and recipes for use of glutaminic acid derivatives had been worked out. The industrial production of know-how was created and assimilationed on the Lujansky experimental plant and had been worked out the technological timelimit and normative-technical documentation for glutaminic acid derivatives. The datas about efficiency know-how had been brought.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*, biosynthesis, sorption, eluation, microfiltration, crystallization, glutaminic acid, glutaminic acid salts.

12.2.100

Ar 37680
AB 37.680