

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології**

**«До захисту в ЕК»**  
Директор інституту(декан факультету)  
\_\_\_\_\_ Наталія ГРЕГІРЧАК  
(підпис) (прізвище та ініціали)

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**«До захисту допущено»**  
Завідувач кафедри  
\_\_\_\_\_ Віктор СТАБНІКОВ  
(підпис) (прізвище та ініціали)

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: «Біосинтез метіоніну *Brevibacterium heali*»

Виконала: здобувачка 5 курсу, групи ЗБТ-5-1

ЗАМРІЙ (КОМАНДИРЧИК) Вікторія Миколаївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент НИЧИК Оксана

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Я як здобувачка Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ - 2025р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)

Освітньо-професійна програма « Біотехнології: фармацевтична  
промислова, харчова, природоохоронна»  
(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ  
“ 01 ” листопада 2024 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЗАМРІЙ (КОМАНДИРЧИК) Вікторії Миколаївни  
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез метіоніну *Brevibacterium heali*»

керівник роботи СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна, асистент,  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 5 листопада 2024 року № 932-к

2. Строк подання здобувачем роботи 07.01.2025

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Brevibacterium heali*; цільовий продукт: метіонін; геометричний об'єм ферментера: 3 м<sup>3</sup>; коефіцієнт заповнення: 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва; охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу метіоніну – 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу метіоніну – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2024 року

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика метіоніну</i>	<i>01.11.2024-02.11.2024</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>03.11.2024-10.11.2024</i>	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>10.11.2024-20.11.2024</i>	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>21.11.2024-30.11.2024</i>	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>01.12.2024-11.12.2024</i>	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>12.12.2024-22.12.2024</i>	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>23.12.2024-05.01.2024</i>	
8.	<i>Охорона довкілля</i>	<i>06.01.2024-20.01.2024</i>	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>21.01.2024-07.02.2024</i>	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Вікторія ЗАМРІЙ** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

**Тетяна СУЛЕЙКО** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу метіоніну із застосуванням мікроорганізму-продуцента *Brevibacterium heali* LT27. Під час культивування цей штам продукує 25,5 г/л метіоніну. Запропоновано використання отриманого продукту як лікарського засобу для лікування цирозу печінки. Відповідно до статистичних даних щодо захворювань населення, що річна потужність виробництва для покриття 25% потреб українців становить 371,6 кг метіоніну за рік (145,7 м<sup>3</sup> культуральної рідини).

Процес виробництва метіоніну включає допоміжні операції (стерилізація повітря, підготовка титрувальних розчинів натрій гідроксиду та соляної кислоти, підготовка і стерилізація поживних середовищ), а також основні стадії технологічного процесу. Вирощування посівного матеріалу здійснюється у три етапи: у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 30 та 300л, після чого відбувається біосинтез у ферментері місткістю 3м<sup>3</sup> із коефіцієнтом заповнення 0,6. Розроблено карту контролю доферментаційних процесів і біосинтезу, зазначено методи аналізу концентрації біомаси метіоніну, а також вуглецевих джерел та рівня азоту.

Кваліфікаційна робота містить 84 сторінок, включає 13 таблиць, 5 рисунків, складається зі вступу, 8 розділів, технологічної (1 аркуш А1) та апаратурної (1 аркуш А1) схем, списку використаної літератури 64 найменувань і 3 додатків. .

**Ключові терміни:** метіонін, продуцент, *Brevibacterium heali* LT27, амінокислота, біосинтез, гідроксид натрію, глюкоза, цироз печінки, медикамент.

## ABSTRACT

The qualification thesis is dedicated to the development of technological and apparatus schemes for the biosynthesis of methionine using the producer microorganism *Brevibacterium heali* LT27. During cultivation, this strain produces 25.5 g/L of methionine. The use of the obtained product as a pharmaceutical agent for the treatment of liver cirrhosis has been proposed. According to statistical data on population diseases, the annual production capacity required to meet 25% of the demand among Ukrainians is 371.6 kg of methionine per year (145.7 m<sup>3</sup> of culture liquid).

The methionine production process includes auxiliary operations (air sterilization, preparation of titration solutions of sodium hydroxide and hydrochloric acid, preparation and sterilization of nutrient media) as well as the main stages of the technological process. The cultivation of the inoculum is carried out in three stages: in flasks on shakers, in inoculators with volumes of 30 L and 300 L, followed by biosynthesis in a 3 m<sup>3</sup> fermenter with a filling coefficient of 0.6. A control chart for pre-fermentation processes and biosynthesis has been developed, along with methods for analyzing the concentration of methionine biomass, carbon sources, and nitrogen levels.

The thesis contains 85 pages, includes 13 tables, 5 figures, and consists of an introduction, 8 chapters, a technological scheme (1 A1 sheet), an apparatus scheme (1 A1 sheet), a list of references (64 sources), and 3 appendices.

**Keywords:** methionine, producer, *Brevibacterium heali* LT27, amino acid, biosynthesis, sodium hydroxide, glucose, liver cirrhosis, pharmaceutical.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ЗМІСТ.....	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА <i>Brevibacterium heali</i> LT27	
2.1. Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	16
2.2. Морфологічно-культуральні та фізіологічно-біохімічні ознаки біологічного агента <i>Brevibacterium heali</i> LT27.....	20
2.3. Таксономічний статус біологічного агента <i>Brevibacterium heali</i> LT27.....	22
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	
3.1. Розрахунок потреби у цільовому продукті – Метіоніні.....	24
3.2. Розрахунок потужності виробництва Метіоніну.....	25
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	26
3.4. Розрахунок кількості стацій підготовки посівного матеріалу.....	27
3.5. Біосинтез цільового продукту метіоніну.....	29
3.5.1. Схема біотрансформації ростового субстрату у цільовий продукт.....	29
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА МЕТІОНІНУ	
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера для синтезу метіоніну <i>Brevibacterium heali</i> LT27.....	31
4.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря.....	32
4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для біосинтезу метіоніну <i>Brevibacterium heali</i> LT27.....	33
4.3.1. Розрахунок складу поживного середовища для біосинтезу метіоніну <i>Brevibacterium heali</i> LT27.....	33
4.3.2. Обґрунтування підготовки та стерилізації підживлювального розчину глюкози.....	36
4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	37
4.3.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	38
4.3.5. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	40
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА.....	42

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА МЕТІОНІНУ.....	47
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	
7.1. Карта постадійного контролю.....	53
7.2. Мікробіологічний контроль.....	59
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	60
7.3.1. Концентрація біомаси.....	60
7.3.2. Концентрація глюкози як джерела вуглецю.....	61
7.3.3. Концентрація джерела азоту.....	62
7.3.4. Визначення концентрації цільового продукту.....	63
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	65
8.2. Перспектива впровадження системи екологізації виробництва.....	66
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	66
8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	67
8.2.3. Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів.....	68
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	42
ДОДАТКИ.....	78

## ВСТУП

Розвиток сучасної промисловості тісно пов'язаний із впровадженням новітніх технологій, що сприяють підвищенню продуктивності та якості виробництва. Україна, маючи значний потенціал у сфері агропромислового виробництва, постійно потребує вдосконалення технологій для забезпечення ефективного вирощування та переробки сільськогосподарської продукції.

Значну роль відіграє оптимізація процесів біосинтезу амінокислот, що є необхідними для забезпечення життєдіяльності рослин, тварин і мікроорганізмів. Однією з найважливіших є метіонін – незамінна амінокислота, що бере участь у синтезі білків та інших біологічно активних сполук. Метіонін має високу біологічну цінність і виконує важливі фізіологічні функції, зокрема стимуляцію росту, детоксикацію, антиоксидантну дію та участь у синтезі білків. Його широко застосовують у спортивному харчуванні, оскільки він сприяє нарощуванню м'язової маси та виведенню аміаку з організму. Крім того, метіонін впливає на зниження рівня холестерину і фосфоліпідів у крові, що є важливим для людей із серцево-судинними захворюваннями. [3]

Метіонін відіграє важливу роль у формуванні імунної системи худоби та птиці, впливаючи на розвиток імунних органів та функцій. Вивчення процесу біосинтезу цієї амінокислоти сприяє розширенню знань про клітинні механізми та вдосконаленню біотехнологій, спрямованих на підвищення його виробництва.

Значні економічні виклики, спричинені військовими діями, завдали серйозних збитків аграрному сектору України, що оцінюються в 34,2 мільярди доларів. У зв'язку із цим актуальним є розвиток галузі з акцентом на продукти з високою доданою вартістю, серед яких метіонін, який використовується як кормова добавка. Розмір його світового ринку досяг 5 мільярдів доларів США, що підтверджує високий попит на цю амінокислоту. [4]

Одним із перспективних мікроорганізмів для синтезу метіоніну, є

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
<i>Розроб.</i>		<i>Замрій В.М.</i>			<b>ВСТУП</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							8	84
<i>Керівник</i>		<i>Сулейко Т.Л.</i>				<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав.каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
					<b>8</b>			

*Brevibacterium heali*, який демонструє високу продуктивність 25,5г/л і може бути ефективно використаний у біотехнологічних процесах. Розуміння механізмів його біосинтезу відкриває нові можливості для отримання метіоніну з використанням мікроорганізмів.

**Актуальність теми.** Метіонін окрім своєї ключової ролі у біосинтезі білків, має значний вплив на здоров'я людини і може застосовуватися у медицині для підтримки функцій органів та зміцнення імунної системи. Ця амінокислота відома своєю здатністю зменшувати токсичність шкідливих речовин в організмі, захищаючи печінку та нирки від ушкоджень. Завдяки цьому вона є важливим компонентом у підтримці нормальної роботи життєво необхідних органів. У медичній практиці метіонін застосовується як фармакологічний засіб для лікування різних захворювань. Він володіє ліпотропною дією, сприяючи зниженню рівня холестерину в крові та покращенню функціонування печінки. Окрім цього, метіонін може мати антидепресивний ефект, впливаючи на біосинтез адреналіну. Його участь у синтезі холіну, лецитину та інших фосфоліпідів позитивно впливає на роботу різних органів, зокрема мозку та серця. Завдяки цьому він сприяє загальному зміцненню організму та підтримці його оптимального функціонування. [5,6]

Метою даної кваліфікаційної роботи є розроблення технологічної та апаратурної схем біосинтезу метіоніну з використанням *Brevibacterium heali* LT27, що дозволить ефективно виробляти амінокислоту у промислових масштабах.

### **Новизна.**

Новизна дослідження полягає у застосуванні генетично модифікованих штамів *Brevibacterium heali* LT27 із підвищеною продуктивністю 25,5 г/л.

Таким чином, розуміння процесів біосинтезу метіоніну має велике значення не лише для промисловості, а й для медицини, зокрема у лікуванні цирозу печінки та зміцненні здоров'я людини.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Метіонін (лат. Methioninium (рід. Methionini)) – одна з дев'яти незамінних амінокислот, що містить сірку. Він відіграє важливу роль як попередник для інших сірковмісних амінокислот та їх похідних. Вперше метіоніну був відкритий у 1922 р американським імунологом Джоном Ховард Мюллером під час досліджень факторів росту стрептокока, використовуючи для цього гідролізати казеїну. Його хімічна назва - (S)-2 аміно-4-(метилтіо) бутанова кислота, а формула -  $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SCH}_3$ , структурна формула –  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ . Його молекулярна маса складає 149,21 г/моль, щільність – 1,34 г/см<sup>3</sup>. Метіонін добре розчиняється у воді – 33 г/1000г води при 25°C і має рН 5,6-6,5 у 2,5% водному розчині. Під впливом високих температур (плавлення при 281°C) виділяє токсичні оксиди азоту та оксиду сірки. Виглядає як білий кристалічний порошок із характерним запахом і солодкуватим смаком. Ця амінокислота містить асиметричний атом карбону, томк існує у двох енантіомерих формах – L-метіонін та D-метіонін.

На рисунку 1.1. наведено структурну формулу метіоніну.



Рис. 1.1. Структурна формула метіоніну [29]

У природі переважає L –форма, яка є біологічно активно. D-метіонін

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ</b>		
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>			
Розроб.		Замрій В.М.			Лім.	Арк.	Акрушів
Консульт.						10	84
Керівник		Сулейко Т.Л.			10		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.П.					

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА  
ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

зустрічається рідко, оскільки організм погано його засвоює і потребує додаткових енергетичних затрат для перетворення на L-метіонін. Його отримують хімічним шляхом з акролеїну та метилмеркаптан, після чого використовують у виробництві кормових добавок та добрив.

L-метіонін є важливим компонентом білків та пептидів, наприклад, метенкафаліну й окситоцину. Значні його концентрації містяться у казеїні. У людському організмі він виконує функцію донора метильних груп у синтезі вітаміну B<sub>4</sub> (холіну) та адреналіну, а також бере участь у біосинтезі  $\alpha$ -аміно- $\beta$ -тіопропіонової кислоти. Метіонін залучений у численні метаболічні процеси, серед яких синтез S-аденозилметіоніну (SAM), L-цистеїну, глутатіону, таурину, сульфатів, фосфоліпідів, а також креатину і карнітину.

Оскільки організм людини не здатний самостійно синтезувати метіонін, він має надходити з їжею. Добова норма споживання для дорослої людини становить приблизно 13 мг на кілограм маси тіла. Дефіцит цієї амінокислоти спостерігається рідко, оскільки вона міститься у білкових продуктах тваринного і рослинного походження. Вміст метіоніну в продуктах рослинного та тваринного походження наведено в таблиці 1.1.

**Таблиця 1.1. Вміст метіоніну в продуктах харчування.**[30]

<i>Продукт</i>	<i>Мг/100г</i>	<i>Продукт</i>	<i>Мг/100г</i>
Ікра осетрова	635	Кунжут	1656
Тунець	732	Проростки пшениці	456
Лосось	626	Насіння соняшника	390
Яловичина	588	Арахіс	310
Свинина	478	Пшеничне борошно	212
Баранина	473	Грецькі горіхи	212
Курка	510	Горох, нут	205
Тверді сири	780	Квасоля	117
Нежирний кисломолочний сир	480	Кукурудза	197

Метіонін сприяє здоров'ю волосся, шкіри та нігтів, оскільки з'єднання L-метіоніну з S-аденозилем бере участь у процесі синтезу колагену. Він допомагає знизити рівень холестерину, стимулюючи утворення лецитину в печінці, а також захищає печінку від жирової дистрофії. Його застосовують для виведення важких металів з організму, нормалізації функцій сечового міхура та захисту від токсичних речовин, таких як ацетамінофен. [6,7]

Дефіцит метіоніну призводить до порушень обміну речовин через нестачу метильних груп, що знижує рівень біологічно активних речовин.

Метіонін випускається у формі таблеток, вкритих оболонкою. Він належить до фармакотерапевтичної групи антидотів (АТС V03A B26). Таблетки мають круглу форму, двоопуклу поверхню, рожевий колір, можуть містити вкраплення. Одна таблетка містить 0,25 г D,L-метіоніну та допоміжні компоненти: картопляний крохмаль, стеаринову кислоту, аеросил, полісорбат-80, тальк, титану діоксид, барвник Понсо 4R тощо.

#### **Фармакологічні властивості.**

**Фармакодинаміка метіоніну.** Метіонін – це життєво необхідна амінокислота, що входить до складу білків і відіграє важливу роль у біохімічних процесах організму. Його фармакодинаміка охоплює кілька ключових механізмів. Метіонін бере участь у реакціях метилювання, проявляє ліпотропний ефект, сприяє утворенню фосфоліпідів і холіну, а також відіграє важливу роль у синтезі креатину та адреналіну. Крім того, він підсилює активність гормонів, ферментів, вітамінів. Завдяки здатності до метилювання токсичних речовин, метіонін діє як детоксикант. Також ця амінокислота сприяє зниженню рівня холестерину в крові та підвищенню концентрації фосфоліпідів.

**Фармакокінетика.** Метіонін є незамінною амінокислотою, що містить сірку. Він необхідний для синтезу білків і бере участь у численних метаболічних процесах, таких як метилювання, дезамінування та декарбоксілювання. Швидко всмоктується в кишечнику, а його виведення з організму відбувається здебільшого через сечовидільну систему у незначній кількості.

### **Показання до застосування.**

Препарат використовується для профілактики та терапії хвороб печінки, а також при її токсичних ураженнях, спричинених впливом отруйних речовин, таких як миш'як, бензол, хлороформ та інші гепатотоксичні сполуки. Показаний при токсичному гепатиті, цирозі, алкогольній гепатопатії. Застосовується у складі комплексної терапії при діабеті, хронічному алкоголізмі, білковій дистрофії, що виникає після інфекційних хвороб та дизентерії. Також ефективний при атеросклерозі, у післяопераційний період, при важких опіках.

### **Спосіб застосування та дозування.**

Для дорослих рекомендована доза становить 0,5–1,5 г тричі або чотири рази на день. Дітям призначають у таких дозах: від 3 до 6 років – 0,25 г, старшим за 7 років – 0,5 г з кратністю прийому 3–4 рази на добу. Вживати препарат слід за 30–60 хвилин до їжі. Тривалість лікування варіюється від 10 до 30 днів або курсами по 10 днів з аналогічною перервою між ними.

**Побічні ефекти.** У рідкісних випадках можливі диспепсичні розлади, зокрема нудота та блювання, а також алергічні реакції.

**Протипоказання.** Не слід застосовувати при вірусних гепатитах у гострій формі, печінковій енцефалопатії, індивідуальній гіперчутливості до діючої речовини. Заборонений для дітей молодше 3 років у цій лікарській формі.

**Передозування.** Може супроводжуватися такими симптомами, як гіпотонія, тахікардія, порушення орієнтації. У таких випадках рекомендовано промивання шлунка, прийом сорбентів (активованого вугілля) та симптоматичне лікування.

**Особливості застосування.** Пацієнтам із нирковою недостатністю (гострою або хронічною) слід дотримуватися обережності через ризик розвитку гіперазотемії. Оскільки препарат має специфічний запах, його рекомендується вживати разом із солодкими рідинами, такими як сироп або кисіль, особливо для дітей. Під час вагітності та в період лактації застосування допускається лише у випадках, коли очікувана користь для матері перевищує можливі ризики для плода або немовляти.

**Взаємодія з іншими лікарськими засобами.** У поєднанні з іншими амінокислотами у збалансованих пропорціях метіонін сприяє зменшенню його потенційної токсичності.

**Умови зберігання та термін придатності.** Зберігати препарат слід у захищеному від дітей місці, у заводській упаковці при температурі, що не перевищує 25°C. Строк придатності – 4 роки.

**Умови відпуску.** Реалізується без рецепта.

**Форма випуску.** Упакований у блістери по 10 таблеток, із загальною кількістю 5 блістерів у картонній пачці. [8]



*Рис.1.1.* Таблетована форма препарату з метіоніном

## РОЗДІЛ 2. ОГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА *Brevibacterium heali* LT27

### 2.1. Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування.

Метіонін – це незамінна амінокислота, що містить сірку та не синтезується в людському організмі. Він входить до складу білкових сполук і пептидів, відіграючи ключову роль у метаболічних процесах. Ця амінокислота є попередником цистеїну та таурину, що робить її важливою для біосинтезу цих сполук. Метіонін має потужні антиоксидантні властивості, завдяки чому нейтралізує шкідливі речовини та захищає клітини від руйнування. Він також сприяє виведенню токсинів і важких металів з організму. Недостатність метіоніну може призвести до порушення процесів детоксикації, що спричиняє затримку рідини та розвиток набряків.

Для вибору найбільш ефективного та економічно доцільного продуцента необхідно провести порівняльний аналіз за такими параметрами: вихід цільового продукту, вартість поживного середовища та співвідношення між собівартістю метіоніну та затратами на живильні компоненти.

У промисловому виробництві метіоніну застосовують мутантні штами *Brevibacterium*, *Corynebacterium* а також генетично модифіковані штами *Esherichia coli*.

Розглянемо порівняльні характеристики таких мікроорганізмів: *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium heali*.

(Табл.2.1.)

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Замрій В.М.			<b>РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА <i>Brevibacterium heali</i> LT27</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Консульт.							15	84
Керівник		Сулейко Т.Л.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.						<b>15</b>		
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

## Порівняльна характеристика продуцентів метіоніну

<i>Характеристика</i>	<i>Brevibacterium flavum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>Brevibacterium heali LT27</i>
Продуктивність метіоніну	Висока	Середня	Висока
Оптимальні умови культивування	Аеробні, 30°C, рН 7	Аеробні, 30°C, рН 7	Аеробні, 30°C, рН 7-7,5
Вихід продукту	Стабільний	Високий	Високий
Методи очищення	Традиційні (екстракція, осадження)	Традиційні	Сучасні (мембранна фільтрація, хроматографія)
Час культивування	96 год	160 год	72 год
Склад поживного середовища (г/л)	Глюкоза - 50 Пептон - 10 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 5 NaCl - 5 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 1 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,5 CaCl <sub>2</sub> - 0,1 Тріптофан - 0,5 Біотин - 0,0001	Глюкоза - 50 Екстракт дріжджів - 10 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 5 NaCl - 5 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 1 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,5 CaCl <sub>2</sub> - 0,1 Біотин - 0,0001	Глюкоза - 50 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 7 г/л KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 3 г/л Na <sub>3</sub> -citrate·3H <sub>2</sub> O - 0,5 г/л MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O - 0,1 г/л NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> - 9 г/л Біотин 0,005
Концентрація кінцевого продукту (г/л)	10-15	15-20	25-35
Література	[9]	[10,11]	[12, 13]

Для оцінки економічної доцільності використання різних продуцентів необхідно проаналізувати собівартість середовищ для їхнього культивування. З цією метою складається таблиця, в якій розраховується вартість окремих компонентів живильного середовища в перерахунку на 1 літр рідкого середовища. Це дозволяє визначити фінансові витрати на виробництво метіоніну та обрати оптимальний штам для промислового використання. (Табл.2.2)

## Порівняння вартості середовищ для культивування

КОМПОНЕНТ	Ціна на кг (грн)	<i>Brevibacterium flavum</i> собівартість (грн)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> собівартість (грн)	<i>Brevibacterium heali LT27</i> собівартість (грн)
Глюкоза	59	2,95	2,95	2,95
Пептон	1300	13	-	-
Екстракт дріжджів	1178	-	11,78	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	0,01	0,01	-
NaCl	60	0,3	0,3	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	98	0,098	0,098	0,294
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150	-	-	1,05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200	0,1	0,1	0,01
CaCl <sub>2</sub>	18	0,0018	0,0018	-
Тріптофан	27,5	0,014	-	-
Біотин	1040	0	0	0,005
Na <sub>3</sub> - citrate·3H <sub>2</sub> O	60	-	-	0,03
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	27	-	-	0.243

Примітка\*. Ціни вказано станом на січень 2025р.

1. [https://primehim.com/index.php?route=product/product&path=18&product\\_id=51&gid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5ztbxOBOKrjxUmcndtzF2-6pGuxrDzjkhJ7rkWcYabeU1Bn23Cfq1nBoCIXwQAvD\\_BwE](https://primehim.com/index.php?route=product/product&path=18&product_id=51&gid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5ztbxOBOKrjxUmcndtzF2-6pGuxrDzjkhJ7rkWcYabeU1Bn23Cfq1nBoCIXwQAvD_BwE)
2. <https://shop.hlr.ua/ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>
3. <https://shop.hlr.ua/ua/ekstrakt-kormovyh-drojjevy-pan-gis-12876.html>
4. <https://harkiv-torg.com.ua/ua/p740948461-sulfat-ammoniyaammoniumsulphate.html?srsId=AfmBOorbW-161Iq9WR6p4RGgpBIPE6NEsoNnz3llMd9XaHhT4hzpRnXU>
5. <https://silur.prom.ua/ua/p5216502-natrij-hloristyj.html>

6. [https://him-component.com.ua/ua/p569679738-monokalijfosfat.html?source=merchant\\_center&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5zoFeHQO-P\\_B9zXDtHio6OKPXu3X9A\\_nj4ybKL766\\_xYuGWMM6gB-UxoCHukQAvD\\_BwE](https://him-component.com.ua/ua/p569679738-monokalijfosfat.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5zoFeHQO-P_B9zXDtHio6OKPXu3X9A_nj4ybKL766_xYuGWMM6gB-UxoCHukQAvD_BwE)
7. <https://himreagent.com.ua/ua/p1091383043-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
8. <https://shop.hlr.ua/natriy-fosfornokislyy-2-zameschennyy-bv-pishch-102074.html>
9. [https://mirsemyan.com.ua/ua/pers\\_shop/ydobrenya\\_ua/347474.htm?srsltid=AfmBOoqDP171kfCzCh2RDD5EKAB8o5gYiRW5FcXjCBx0QKW387B0QgoE](https://mirsemyan.com.ua/ua/pers_shop/ydobrenya_ua/347474.htm?srsltid=AfmBOoqDP171kfCzCh2RDD5EKAB8o5gYiRW5FcXjCBx0QKW387B0QgoE)
10. <https://harkiv-torg.com.ua/ua/p739140974-kaltsij-hloristyj-tehnicheskij.html?srsltid=AfmBOoraKXNM6vW2PzRxxunJ3jkbX2kzhX4pv9NqRZHaYL0HWqNUIMj>
11. [https://zahid-agromiks.com.ua/ua/p712517424-aminokislota-triptofan.html?srsltid=AfmBOoqLIDNWRHPNR4IEsiKt1-BgczgwDq78zG\\_y0s\\_SvHjVYpF3RhSc](https://zahid-agromiks.com.ua/ua/p712517424-aminokislota-triptofan.html?srsltid=AfmBOoqLIDNWRHPNR4IEsiKt1-BgczgwDq78zG_y0s_SvHjVYpF3RhSc)
12. [https://primehim.com/index.php?route=product/product&path=25&product\\_id=313&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5zIddogodWEz9jT4\\_F13z3umhMU0NdVnn5mV6JcqGfaQnr\\_u3EqnbhoCi5IQAvD\\_BwE](https://primehim.com/index.php?route=product/product&path=25&product_id=313&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5zIddogodWEz9jT4_F13z3umhMU0NdVnn5mV6JcqGfaQnr_u3EqnbhoCi5IQAvD_BwE)
13. [https://ukrhim.com.ua/ua/p415266387-tiamin.html?gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5zgg35y21oegrNBBK51MK2FRRYKJTWUE60xr-3a7vu3GtsBNt7hW-RoCRqkQAvD\\_BwE](https://ukrhim.com.ua/ua/p415266387-tiamin.html?gad_source=1&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5zgg35y21oegrNBBK51MK2FRRYKJTWUE60xr-3a7vu3GtsBNt7hW-RoCRqkQAvD_BwE)
14. [https://ukrhim.com.ua/ua/p731486833-tsirat-natriya.html?gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5zIYSgplS71Vft0AuOwqJM9f1BZ1RGOEP6mOF\\_FQT7fFHcbS70uYnYxoCSu0QAvD\\_BwE](https://ukrhim.com.ua/ua/p731486833-tsirat-natriya.html?gad_source=1&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5zIYSgplS71Vft0AuOwqJM9f1BZ1RGOEP6mOF_FQT7fFHcbS70uYnYxoCSu0QAvD_BwE)
15. [https://novohim.com.ua/en/catalog/industrial-chemicals-and-raw-materials/ammonium-nitrate/?utm\\_medium=googleads&utm\\_source=mobile&utm\\_campaign=20894506254&utm\\_content&source=source\\_type&device=device\\_type&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5ziXJQe8GLECXXyu4pjHheLpz52Y9\\_awaGXTxP05BBxoOj8li6kob6xoCoAkQAvD\\_BwE](https://novohim.com.ua/en/catalog/industrial-chemicals-and-raw-materials/ammonium-nitrate/?utm_medium=googleads&utm_source=mobile&utm_campaign=20894506254&utm_content&source=source_type&device=device_type&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5ziXJQe8GLECXXyu4pjHheLpz52Y9_awaGXTxP05BBxoOj8li6kob6xoCoAkQAvD_BwE)

Таблиця 2.3.

**Загальна собівартість середовища на 1 літр рідкого середовища у гривнях**

Продуцент	<i>Brevibacterium flavum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>Brevibacterium heali LT27</i>
Загальна собівартість (грн/л)	16,47	15,24	4,58

Подано таблицю 2.4 для порівняння витрат на виробництво цільового продукту та ефективності різних штамів.

Таблиця 2.4.

**Умовна вартість цільового продукту та продуктивність продуцентів**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища (грн)	Концентрація метіоніну (г/л)	Умовна вартість за масову одиницю метіоніну (грн/г)	Тривалість культивування (год)	Продуктивність штаму (г/год)
<i>Brevibacterium flavum</i>	16,57	30	0,549	96	0,31
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	15,24	35	0,435	160	0,22
<i>Brevibacterium heali</i> LT27	4,58	25,5	0,18	72	0,35

**Загальний аналіз продуцентів**

*Brevibacterium heali* та *Corynebacterium glutamicum* використовують дорогі поживні середовища, оскільки містять біотин, що є коштовним компонентом. Проте, продуцент *Corynebacterium glutamicum* за 160 годин культивування здатний синтезувати 35 г метіоніну на літр, тоді як *Brevibacterium heali* LT27 - 25,5 г/л за 72 години. [12, 13] Однак, продуктивність *Brevibacterium heali* LT27 є найвищою серед усіх, оскільки вона становить 0,35 г/год, що робить собівартість виробництва значно нижчою на одиницю середовища. Параметри культивування такі як температура та рН, для обох продуцентів подібні. Тому для досягнення найвищої продуктивності варто обрати *Brevibacterium heali* LT27.

## Обґрунтування вибору умов культивування

Культивування *Brevibacterium heali* LT27 для синтезу метіоніну проводиться при температурі 30°C, а значення рН підтримується в межах 7-7,5 за допомогою титрантів, зокрема розчинів соляної кислоти та гідроксиду натрію. Вибір параметрів культивування таких, як оберти мішалки та рівень аерації, залежить від конкретних умов процесу. Для отримання амінокислот одночасно використовують оберти мішалки в межах 200-400 об/хв та аерацію на рівні 60% від насичення повітрям. [14]. При цих параметрах продуцент синтезує 25,5 г/л метіоніну на виробничому середовищі.

### 2.2. Морфологічно-культуральні та фізіологічно-біохімічні ознаки біологічного агента *Brevibacterium heali* LT27

*Brevibacterium heali* - це грам-позитивні паличкоподібні бактерії, які можуть бути розташовані поодинокі або парами. (Рис 2.2.) Вони часто утворюють скупчення у формі літери V. Їхній діаметр коливається від 0,6 до 1,2 мкм, а довжина варіюється від 1,5 до 6 мкм. Ці бактерії є виключно аеробними, а їхні колонії зазвичай мають жовто-фіолетове забарвлення. [15].



Рис.2.2. Представники роду *Brevibacterium* під мікроскопом

## Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

*Brevibacterium heali* є облігатно аеробними бактеріями, а їх колонії часто мають жовто-фіолетове пігментоване забарвлення.

Оптимальна температура для росту цього виду становить 30-37°C, що є типовим для багатьох бактерій. Ріст може відбуватися в діапазоні температур від 20 до 40°C, але за екстремальних умов цей процес значно сповільнюється або зовсім припиняється. Оскільки *Brevibacterium heali* не є стійкими до нагрівання, його можна легко інактивувати шляхом пастеризації, наприклад, при температурі 80°C протягом 3 хвилин.

Для росту цього мікроорганізму оптимальний рівень рН коливається в межах 7,0-7,5, хоча він здатний рости при рН від 6,0 до 8,0. При значних відхиленнях від оптимального рН можуть виникати проблеми з ростом та продуктивністю метіоніну. Важливо враховувати аеробний характер *Brevibacterium heali* при розробці технологій культивування, оскільки недостатня аерація може призвести до зниження продуктивності.

Цей мікроорганізм демонструє характерні культуральні ознаки на різних поживних середовищах. Хоча немає жорстко селективних агарних середовищ, TSA зазвичай доповнюється 4%-ним розчином NaCl.

Однією з важливих біохімічних характеристик є позитивний результат тесту на каталазу. *Brevibacterium heali* продукує фермент каталазу, який розщеплює перекис водню на воду та кисень. Ця бактерія є оксидаза-негативною, тобто не продукує фермент оксидазу, що допомагає диференціювати її від інших бактерій. Також *Brevibacterium heali* здатна ферментувати глюкозу, утворюючи кислоти без виділення газу, що вказує на її гетероферментативний метаболізм вуглеводів. Бактерія стійка до лізоциму, що руйнує клітинні стінки багатьох грам-позитивних бактерій. Ці біохімічні характеристики можна використовувати для диференціації *Brevibacterium heali* від інших видів цього роду. [14, 15]

## 2.3. Таксономічний статус біологічного агента *Brevibacterium heali*

### LT27

*Brevibacterium heali*, відповідно до класифікації Бергі, відноситься до відділу Firmicutes. Це грам-позитивні бактерії, які за несприятливих умов не утворюють спори. Рід *Brevibacterium* включає як непатогенні, так і патогенні види, а бактерії цього роду є факультативними аеробами. [15, 16, 17]

Згідно з IX і X виданнями Керівництва Бергі з систематики бактерій (фенотипова класифікація), таксономічне положення *Brevibacterium heali* є таким:

Царство	<i>Procarvotae</i>
Відділ	Firmicutes
Королівство	Bacteria
Тип	Actinobacteria
Порядок	Actinomycetales
Підрядок	Micrococcineae
Сім'я	Brevibacteriaceae
Вид	heali
Штам	LT27

Таксономічний статус *Brevibacterium heali* згідно з X виданням Керівництва Бергі (філогенетична класифікація):

Відділ	Firmicutes
Королівство	Bacteria
Тип	Actinobacteria
Порядок	Actinomycetales
Підряд	Micrococcineae
Сім'я	Brevibacteriaceae
Рід	Brevibacterium
Вид	heali
Штам	LT27

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1. Розрахунок потреби у цільовому продукті – Метіоніні.

Потреба в метіоніні зумовлена тим, що він має наступні напрямки застосування: лікування та профілактика захворювань, а також токсичних уражень печінки (алкогольна гепатопатія, цироз печінки, отруєння хлороформом, бензолом і гепатотоксичними речовинами).

Препарат метіонін лежить в основі комбінованої терапії при хронічному алкоголізмі, цукровому діабеті, для лікування дистрофії. Загалом кількість населення України, що потребує додаткову терапію прийому метіоніну складає від 5 до 15% від загального населення в рік.

Спосіб застосування та дози.

Дорослим призначають по 0,5-1,5 г 3-4 рази на добу. Дітям разові дози: у віці 3-6 років 0,25г, 7 років і старше – 0,5 г із частотою прийому 3-4 рази на добу.

Препарат слід приймати за 0,5-1 год до їжі. Курс лікування 30 днів або по 10 днів з 10-денними перервами між цими курсами. [18]

Для обрання розрахункового напрямлення обраного застосування виробленого метіоніну необхідно визначитися з захворюваннями, при яких метіонін буде застосовуватися.

Обираємо напрямлення застосування: цироз печінки.

Для розвитку потреби наводимо статистику захворюваності на вище зазначені захворювання.

За даними Державної служби статистики України у 2015 році зареєстровано 47 650 випадків захворювань на ЦП (131,8 на 100 тис. населення). [19, 20].

Візьмемо, що населення України станом на 2024 рік становить 35,8 млн чоловік. [21] Тоді кількість людей, хворих на цироз печінки становить:

					НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Замрій В.М.			Літ.	Арк.	Акрушів	
Консульт.						23	84	
Керівник		Сулейко Т.Л.			Кафедра БТМ		23	
Н. Контр.								
Зав.каф.		Стабніков В.П.						
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ								

$$(131,8 \times 35,8 \text{ млн}) / 100\,000 = 47\,184 \text{ чол.}$$

Таблиця 1.1..

### Захворюваність населення в Україні на цироз печінки

Назва захворювання	Кількість хворих	Дозування	Курс лікування	Препарату на курс лікування, г	Потреба за рік/г
Цироз печінки	47 184	0,25×3 рази на день	30 днів	22,5	1 061,6 кг

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Згідно з Державним реєстром лікарських засобів [22], єдиним препаратом українського виробництва є Метіонін (АТ «Київський вітамінний завод»).

Потреба в метіоніні для лікування цирозу печінки становить 1 061,6 кг. Враховуючи, що на ринку України вже присутнє підприємство, що випускає подібний препарат, пропонуємо виробляти метіонін для 25% від загальної потреби.

Розрахуємо кількість метіоніну, яку необхідно виробити в рік, щоб забезпечити 25% потреб населення, яке хворіє на цироз печінки. Спосіб застосування даного препарату становить по 1 табл. (0,25г) 3 рази на добу. Курс лікування – 30 днів.

Отже,  $1 \times 3 \times 30 = 90$  таблеток, необхідна для 1 курсу лікування.

Оскільки, 1 таблетка містить 0,25 г метіоніну, то маємо  $90 \times 0,25 \text{ г} = 22,5 \text{ г}$  метіоніну необхідно на 1 курс лікування.

Зі статистики за відомо, що нараховується 47 184 хворих на ЦП. Отже, зробимо розрахунки потреби метіоніну в Україні на рік:

$$47\,184 \times 22,5 \text{ г} = 1\,061\,640 \text{ г} = 1\,061,6 \text{ кг}$$

Однак, ми плануємо забезпечити лише 25% ринку метіоніну в Україні, тому розрахунок потреб виробництва становить:

$$1\,061,6 \text{ кг} \times 25\% = 265,4 \text{ кг}$$

Із врахуванням можливих втрат на виробництві, в розмірі 40%, річна потужність метіоніну складе:  $265,4 \times 1,4 = 371,6 \text{ кг/рік}$ .

Концентрація у культуральній рідині метіоніну становить  $25,5 \text{ г/л} = 2,55 \text{ кг/м}^3$ , а виробництво становить  $371,6 \text{ кг/рік}$ , то об'єм культуральної рідини за рік  $V_{\text{к/рік}} = 371,6 / 2,55 = 145,7 \text{ м}^3$ .

### **3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.**

Приймаємо, що кількість днів виробництва метіоніну на рік – 300 днів. Річний фонд виробництва  $T_p = T_{\text{р}} \times 24 \text{ год} = 300 \times 24 = 7\,200 \text{ годин}$ .

Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{ц}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{доп}} = 72 + 10 = 82 \text{ год, де}$$

$T_{\text{ф}}$  – тривалість біосинтезу (виробничої ферментації);

$T_{\text{доп}}$  - тривалість допоміжних робіт.

Цикл роботи ферментера включає тривалість біосинтезу та підготовчих робіт. Тривалість ферментування – 72 год. Підготовчі роботи для ферментера тривають 10 годин та включають в себе: миття та огляд апарату – 2 год, перевірка на герметичність – 2 год, стерилізація апарату – 2 год, охолодження апарату – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год, вивантаження – 1 год. Отже, цикл роботи ферментера становить – 82 год.

$$\text{Кількість циклів } N_{\text{ц}} = T_p / T_{\text{ц}} = 7\,200 / 82 = 88.$$

Об'єм культуральної рідини за рік становить  $145,7 \text{ м}^3$ .

Розрахуємо необхідну кількість культуральної рідини за цикл:

$$145,7 / 88 = 1,65 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

При коефіцієнті заповнення 0,6 приблизний геометричний об'єм ферментера становить:  $1,65 / 0,6 = 2,75 \text{ м}^3$ .

Так оптимальним ферментером для одержання  $1,65 \text{ м}^3$  культуральної рідини за цикл є ферментер з геометричним об'ємом  $3 \text{ м}^3$ . Перевіримо чи підійде обраний коефіцієнт заповнення:

$K_3 = 1,65 / 3 = 0,55$ , що відповідає вимогам.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.

Для вирощування метіоніну використаємо ферментер загальним об'ємом 3 м<sup>3</sup>. Коефіцієнт заповнення 0,6.

За один виробничий цикл отримують 1,65 м<sup>3</sup> культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%. Отже, з урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{роб1} = V_{кр} \cdot (1 + 10\%) = 1,65 \cdot 1,1 = 1,82 \text{ м}^3$$

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 1,82 м<sup>3</sup>, за вибраного коефіцієнта заповнення 0,6 геометричний об'єм ферментера становить  $1,82 / 0,6 = 3,03 \text{ м}^3$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер 3 м<sup>3</sup>.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Для засіву 1,82 м<sup>3</sup> середовища необхідно приготувати  $1,82 \cdot 0,1 = 0,182 \text{ м}^3$  посівного матеріалу, де 0,1 – це доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = 1,82 - 0,182 = 1,64 \text{ м}^3$$

Врахуємо, що під час одержання 0,182 м<sup>3</sup> інокуляту в посівному апараті 10% культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплиносу через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб2} = V_{пс1} \cdot 1,1 = 0,182 \cdot 1,1 = 0,2 \text{ м}^3 = 200 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 0,2 м<sup>3</sup> із коефіцієнтом заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті на 0,3 м<sup>3</sup>.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву 0,2 м<sup>3</sup> необхідно приготувати

$$V_{пс2} = 0,2 \cdot 0,1 = 0,02 \text{ м}^3 = 20 \text{ л}$$

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пм2}} = 0,2 - 0,02 = 0,18 \text{ м}^3$$

Врахуємо, що під час одержання  $0,02 \text{ м}^3$  (20 л) посівного матеріалу в інокуляторі 10% культуральної рідини буде втрачено. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб3}} = V_{\text{пм2}} \cdot 1,1 = 0,02 \cdot 1,1 = 0,022 \text{ м}^3 = 22 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту  $0,022 \text{ м}^3$  за коефіцієнта заповнення 0.6 можна отримати в посівному апараті 30л.

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища. Для засіву 22 л поживного середовища необхідно:

$$V_{\text{пм3}} = 22 \cdot 0,1 = 2,2 \text{ л}$$

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб3}} - V_{\text{пм3}} = 22 - 2,2 = 19,8 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить  $22 - 19,8 = 2,2 \text{ л}$

Одержання посівного матеріалу 2,2л для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням у колбах на качалці. Для цього використаємо качалочні колби об'ємом 750 мл із коефіцієнтом заповнення 0,2.

Тоді кількість колб становить:  $2420 / (750 \cdot 0,2) = 15$  колб

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу метіоніну *Brevibacterium heali* LT27 необхідно встановити ферменгер біосинтезу об'ємом  $3 \text{ м}^3$ , інокулятор об'ємом 300л, 30л та 15 колб.

### 3.5. Біосинтез цільового продукту метіоніну

#### 3.5.1. Схема біотрансформації ростового субстрату у цільовий продукт

При культивуванні штаму *Brevibacterium heali* LT27 основним джерелом вуглецю та енергії є глюкоза. Цитрат натрію може частково використовуватися в катаболічних процесах, однак це відбувається лише після вичерпання основного джерела — глюкози. Тому при побудові схеми біосинтезу в якості джерела вуглецю та енергії розглядається саме глюкоза.

*Brevibacterium heali* LT27 під час росту на середовищі з глюкозою, перетворює її на Ацетил-КоА через процес гліколізу. Ацетил-КоА потім входить у цикл трикарбонових кислот (ЦТК), де синтезується попередник метіоніну – оксалоацетат. Подальше утворення метіоніну відбувається шляхом послідовних перетворень оксалоацетату на аспартат, потім на гомосерин і в кінцевому результаті – на гомоцистеїн, який є попередником метіоніну..[23-25]

Ферменти: 1 - глюкозофосфорилада (КФ 2.3.4.21); 2 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1.), бетафруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26); 3 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2.); 4 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9.); 5 – фосфофруктокіназа 1 (КФ 2.7.1.11); 6 – фруктозо-1,6-біфосфатаза (КФ 3.1.3.11); 7 та 8 – фруктозобіфосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13); 9 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1.); 10 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 11 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3.); 12 – 2,3-біфосфатзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11), фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 13 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 14 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 15 – піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.4.1.), піруватдекарбоскилаза (КФ 4.1.1.1.), дигідрополіамідацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.12); 16 – цитратсиназа (КФ 2.3.3.1); 17 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3.); 18 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 19 – дигідроліпоамідегідрогеназа (КФ 1.8.1.4.); 20 – сукциніл-КоА синтетаза (КФ 6.2.1.5.); 21 – сукцинатдегідрогеназа, цитохром b 556 субодиниця; 22 – фумаратгідратаза, (КФ 4.2.1.2.); 23 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 24 – фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31); 25 – піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1.); 26 – аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1.);

27 0 аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4); 28 – аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 29 – гомосериндегідрогеназа (КФ 1.1.1.3.); 30 – гомосерин-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.31.); 31 – ацетил-гомосеринліаза (КФ 2.5.1.49), цистеїн-гамасинтаза (КФ 2.5.1.48); 32 – гомосерин-метил-трансфераза (КФ 2.1.1.10.), бетаїн-гомоцистеїн-метил-трансфераза (КФ 2.1.1.5.), метіонінситаза кобаламін незалежна (КФ 2.1.1.14), метіонінсинтаза кобаламін залежна (КФ 2.1.1.13.).

## РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА МЕТІОНІНУ

### 4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера для синтезу метіоніну *Brevibacterium heali* LT27

Основною метою при виборі апарату є створення оптимальних умов для культивування мікроорганізмів і досягнення максимальної кількості продукту відповідно до властивостей продуцента. У промислових умовах біосинтез цільового продукту здійснюється в ферментері, який забезпечує інтенсивний масообмін і теплообмін між клітинами та середовищем. Важливим аспектом є збереження стерильності протягом всього процесу культивування, зокрема при інтенсивній аерації культуральної рідини.

Культивування *Brevibacterium heali* LT27, продуцента метіоніну, проводиться глибинним способом в аеробних умовах. Глибинне культивування є складним процесом отримання продуктів мікробного синтезу, і біосинтез залежить від різних факторів, таких як температура, рН середовища, концентрація розчиненого кисню, тривалість культивування, конструкція обладнання та інші.

Інтенсивність аерації середовища *Brevibacterium heali* LT27 має важливе значення для формування метіоніну. За низької інтенсивності аерації (0,38 г/О<sub>2</sub>/л/год) культура бактерій погано розвивається та слабо синтезує метіонін. Збільшення інтенсивності аерації до 4,38 г/О<sub>2</sub>/л/год сприяє підвищенню темпу росту бактерій і активному споживанню компонентів субстрату.

Для культивування в таких умовах ферментер має бути оснащений рубашкою для подачі глухої пари для стерилізації та підтримки температури, а також приладами для вимірювання температури, тиску, концентрації кисню (рО<sub>2</sub>), барботером для подачі повітря і мішалкою для перемішування [11, 12, 14].

Згідно з нашими розрахунками, для задоволення річної потреби метіоніну

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Замрій В.М.			<b>РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА МЕТІОНІНУ</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Консульт.							30	84
Керівник		Сулейко Т.Л..				30		
Н. Контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Зав.каф.		Стабніков В.П.						

необхідно використовувати ферментер об'ємом 3 м<sup>3</sup>. Для цього підходять ферментери, призначені для культивування мікроорганізмів в аеробних умовах глибинним способом, такі як «Ока МФ-100» та АК-210, що здатні здійснювати культивування в періодичному та безперервному режимах.

Конструкція перемішувального пристрою і системи аерації ферментера дозволяє майже повністю уникнути утворення піни під час аерації та перемішування культуральної рідини, а також підвищити коефіцієнт завантаження ферментера до 0,6 об'єму. Це дозволяє забезпечити стабільний рівень культуральної рідини в ферментері і асептичний захист при реалізації періодичного режиму ферментації. Оскільки ферментер «Ока МФ-100» має кращі технічні характеристики та оснащення в порівнянні з ферментером типу АК-210, ми обрали саме його для реалізації процесу культивування.

#### **4.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря**

*Brevibacterium heali* LT27 є аеробом, тому для його вирощування та біосинтезу метіоніну необхідна подача стерильного аераційного повітря [14, 26]. Для отримання стерильного аераційного повітря, вхідне атмосферне повітря проходить через систему фільтрації, що забезпечує очищення від пилу та мікроорганізмів за допомогою фільтрів різних класів чистоти — від грубої до тонкої очистки [27, 28].

Процес отримання стерильного повітря складається з кількох етапів:

- Відбір атмосферного повітря здійснюється через турбокомпресор, на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі. Повітря забирається через спеціальну шахту, враховуючи висоту ферментера 3 м<sup>3</sup>, що становить 3,45 м, а також висоту поверху –6 м і косий дах будівлі ~1,5 м. Таким чином, забір повітря здійснюється на висоті приблизно 12 м ;
- Очистка повітря на фільтрі грубої очистки. Перший фільтр, грубої очистки, усуває великі часточки пилу, що дозволяє зменшити концентрацію забруднювачів і знизити навантаження на подальші етапи очищення. Цей фільтр має сталеву оцинковану рамку і об'ємний

фільтруючий матеріал, який може складатися з кількох шарів пінополіуретану.

- Компресія повітря в трубокомпресорі до 0,35—0,5 МПа, що необхідно для подолання опору фільтрувальних матеріалів на наступних етапах;
- Нагрівання повітря до температури 120–250°C до допомогою калориферу, після чого повітря поступово охолоджується. У цьому процесі зайва волога видаляється через краплевловлювач.
- Основне очищення відбувається через фільтри основної очистки, які складаються з панелей з поліестеру високої якості, виготовлених за методом термоскріплення синтетичних бікомпонентних волокон. Ці фільтри забезпечують видалення до 98% мікроорганізмів;
- Тонка очистка через фільтри HEPA, які здатні видаляти до 99,999% мікроорганізмів. Фільтри HEPA складаються з фільтрувального матеріалу, складеного у гофру, з хаотично розташованими волокнами різної товщини (0,5-5 мкм), з відстанню між волокнами 5-50 мкм. Після проходження через фільтри HEPA, підготоване повітря по трубопроводах подається безпосередньо до виробничого обладнання, забезпечуючи стерильні умови для культивування *Brevibacterium heali* LT27 [27, 28].

#### **4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для біосинтезу метіоніну *Brevibacterium heali* LT27**

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 3,0 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу відбувається у чотири стадії (в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 40 л та 300 л).

Згідно із інформацією із статті [11,12], для одержання метіоніну було обрано штам *Brevibacterium heali* LT27, який забезпечує вихід цільового продукту – 25,5 г/л, біомаси – 6,8 г/л за 72 год при культивуванні на поживному середовищі наступного складу (г/л): глюкоза – 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3, Na<sub>3</sub>-citrate·3H<sub>2</sub>O – 0,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,1; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 1; Біотин 5 мг/л.

### 4.3.1. Розрахунок складу поживного середовища для біосинтезу метіоніну *Brevibacterium heali* LT27

**Розрахунок вмісту джерела вуглецевого живлення.** У середовищі наведеного складу у якості основного джерела вуглецю використано глюкозу кількістю 2 г/л.

Розглянемо теоретичні розрахунки необхідної кількості глюкози для отримання 25,5 г/л метіоніну. Молярна маса метіоніну  $C_5H_{11}NO_2S$  дорівнює 149,21 г/моль, з яких 60 г/моль складає вуглець. Отже, у 25,5г метіоніну міститься  $(60 \times 25,5) / 149,21 = 10,25$  г вуглецю.

Молярна маса глюкози  $C_6H_{12}O_6$  становить 180 г/моль. Вміст вуглецю в молекулі глюкози можна розрахувати за формулою:  $W(C) = 6M(C) / M(C_6H_{12}O_6) \times 100\% = (72 / 180) \times 100\% = 40\%$ . Таким чином, у 100г глюкози міститься 40 г вуглецю. Розрахуємо, скільки глюкози потрібно для 10,25 г вуглецю:  $(100 \times 10,25) / 40 = 25,625$  глюкози.

Зважаючи на те, що 40% вуглецевмісного субстрату окислюється до  $CO_2$  під час культивування мікроорганізмів для отримання енергії, враховуємо втрати субстрату на окиснення. Для отримання метіоніну середовище повинно містити  $(25,625 \times 0,4) + 25,625 = 35,875$  г/л глюкози.

Тепер розрахуємо, скільки глюкози потрібно для отримання біомаси кількістю 6,8 г/л. Біомаса містить 50% вуглецю, тому в 6,8 г біомаси міститься 3,4 г вуглецю. Для компенсації 40% втрат при окисненні, потрібно внести  $(3,4 \times 0,4) + 3,4 = 4,76$  г/л глюкози.

Загальна кількість глюкози для отримання 25,5 г/л метіоніну і 6,8 г/л біомаси складає  $35,875 + 7,35 = 43,225$  г/л.

Для уточнення: у 100 г глюкози міститься 40 г вуглецю. Якщо необхідно отримати 4,76 г вуглецю, для цього знадобиться 11,9 г глюкози .

Таким чином, для досягнення 25,5 г/л метіоніну і 6,8 г/л біомаси загальна кількість глюкози повинна становити  $35,875 + 11,9 = 47,775$  г/л глюкози.

Отримане значення перевищує експериментальні дані, але згідно з дослідженнями концентрація глюкози в межах 10-60 г/л не повинна

перевищувати 20 г/л для оптимального виходу метіоніну та біомаси, оскільки надлишок глюкози накописується у культуральній рідині.

Таким чином, оптимальна концентрація глюкози в середовищі для максимального виробництва метіоніну та біомаси становить 50 г/л.

**Розрахунок вмісту джерела азотного живлення.** *Brevibacterium heali* LT27 може використовувати амоній нітрат ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) як джерело азоту.

Відомо, що вміст азоту в біомасі мікроорганізмів складає 10..14% азоту, тому Так у 6,8 г біомаси міститься від 0,65 до 0,91 азоту. Молярна маса метіоніну складає 149,21 г/моль, з яких 28г/моль – це азот. Звідси, в 25,5 г метіоніну міститься  $(14 \times 25,5) / 149,21 = 2,4$  г азоту.

Молярна маса амоній нітрату ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) становить 80 г/моль. Відсотковий вміст азоту в амоній нітраті можна обчислити за формулою:  $W(\text{N}) = 2M(\text{N}) / M(\text{NH}_4\text{NO}_3) \times 100\% = 28 / 80 \times 100 = 35\%$ . Отже, в 100 г амоній нітрату міститься 35 г азоту. Для 2,4г азоту потрібно розрахувати кількість амоній нітрату за пропорцією:  $(100 \times 2,4) / 35 = 6,86$  г. Таким чином, для отримання 2,4 г азоту потрібно 6,86 г амоній нітрату.

Далі розрахуємо, скільки азоту потрібно для отримання 6,8г/л біомаси. Біомаса мікроорганізмів містить 10% азоту, тому в 6,8 г біомаси міститься 0,68г азоту. Загальна кількість азоту, необхідна для метіоніну та біомаси становить:  $2,4 + 0,68 = 3,08$  г азоту.

Згідно з розрахунками, для отримання 25,5 г/л метіоніну і 6,8 г/л біомаси, середовище повинно містити  $3,08 / 0,35 = 8,8$  г амоній нітрату.

Склад поживного середовища буде таким:

- Глюкоза – 50 г/л
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 7 г/л
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3 г/л
- $\text{Na}_3\text{-citrate} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0,5 г/л
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,1 г/л
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 9 г/л

- Біотин 5 мг/л.

Перед початком вирощування штаму продуцента *Brevibacterium heali* LT27 необхідно підготувати компоненти поживного середовища та простерилізувати їх, щоб уникнути контамінації під час культивування і біосинтезу. Компоненти середовища розподіляються залежно від режимів і умов стерилізації. Для приготування інокуляту у колбах на качалках готується невеликий об'єм середовища (2,2 л), який стерилізується в автоклаві. Для подальших етапів біосинтезу компоненти середовища стерилізуються в реакторах або в інокуляторах. Глюкозу і  $\text{Na}_3\text{-citrate}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  необхідно стерилізувати в м'якому режимі через термолабільність і схильність до карамелізації.

#### **4.3.2 Обґрунтування підготовки та стерилізації підживлювального розчину глюкози**

Концентрація глюкози в середовищі культивування становить 50 г/л. Спочатку в середовище вносять 20г/л субстрату. Тому для досягнення необхідної концентрації глюкози у процесі культивування необхідно додати  $50-20 = 30$  г/л глюкози у вигляді підживлювального розчину.

Об'єм середовища для біосинтезу складає 1640 л. Отже, загальна кількість глюкози (X) для приготування підживлювального розчину можна обчислити так: 30 г глюкози міститься в 1 л середовища, X г глюкози міститься в 1640 л середовища. Тому:  $X = (1640 \times 30) / 1 = 49200 \text{ г} = 49,2 \text{ кг}$ .

Далі розрахуємо об'єм 40% підживлювального розчину, що містить 49,2 кг глюкози:  $(49,2 \times 0,1) / 40 = 123 \text{ л}$ .

Для підготовки і стерилізації цього підживлювального розчину обсягом 123 л використовують окремий реактор об'ємом 200 л. Умови стерилізації: температура  $112^\circ\text{C}$ , час стерилізації – 30 хв.

Тепер визначимо кількість порцій підживлення та об'єм підживлювального розчину глюкози для однієї порції. Процес біосинтезу триває 72 години, і підживлення вносять кожні 8 годин. Тому кількість порцій становить:  $72 / 8 = 9$  порцій. Отже, кожен порцію підживлення у середовище вносять об'ємом:  $123 / 9 = 14 \text{ л}$  40%-го підживлювального розчину глюкози.

#### **4.3.3 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках**

Для приготування необхідного об'єму інокуляту (2,2 л стерильного поживного середовища) середовище розподіляють на 15 стерильних качалочних колб об'ємом по 750 мл. Коефіцієнт заповнення колб становить 0,2.

Таким чином, для стерилізації компонентів середовища потрібно забезпечити наступні умови:

Композиція А: глюкоза,  $\text{Na}_3\text{-citrate}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа, час 20 – 30 хв).

Композиція Б:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, тиск 0,15МПа).

Композиція В:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, тиск 0,15МПа).

Композиція Г: Біотин

Оскільки біотин додається у дуже малих кількостях, його зазвичай готують окремо у вигляді концентрованого розчину, який додають після стерилізації поживного середовища на всіх етапах, окрім етапу виробничого біосинтезу. Концентрація біотину в цьому розчині становить 5 мг/л.

Зважаючи на великий об'єм культуральної рідини на етапах підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу, доцільно пропорційно збільшувати кількість доданого біотину на наступних етапах після культивування в колбах на качалці. Для цього готують запасний розчин в об'ємі 1,842 л, який стерилізують методом холодної стерилізації (фільтруванням) через фільтр з порами діаметром 0,2 мкм.

Після стерилізації розчин зберігають у лабораторії, а необхідну кількість додають до середовища на відповідному етапі безпосередньо перед культивуванням, щоб забезпечити оптимальний рівень біотину для росту та розвитку культури.

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 2,2 л середовища, г (мл)</b>	<b>Об'єм композиції V, мл</b>
Глюкоза	20	44	400
Na <sub>3</sub> -citrate·3H <sub>2</sub> O	0,5	1,1	
Вода	400		
Конденсат			898,9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0	6,6	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0	15,4	
Вода	898,9		
Конденсат			898,9
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,0	19,8	
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,1	0,22	
Вода	898,9		
Конденсат			2,2
Розчин Біотину	0,005	2,2 мл	
Всього			2200

**4.3.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах**

Підготовка посівного матеріалу включає приготування стерильного поживного середовища об'ємами 19,8 і 180 л , 1640 л.

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 30 л*

Для цієї стадії необхідно 19,8 л поживного середовища. Склад композиції та умови стерилізації є аналогічними пункту 4.3.1. Композицію А готують у збірнику об'ємом 10 л. Композиції Б та В. об'єднуються одному збірнику об'ємом 20л. Для запобігання утворенню нерозчинних солей рН розчину доводять до значення 4-4,6 за допомогою 6%-го розчину НСІ. Приготування відбувається у збірнику об'ємом 20л, після чого стерилізація проводиться в посівному апараті. Оскільки рН розчину не оптимальним для культивування, передбачається також підготовка титрувального розчину 6%-го NaOH, для коригування рН середовища на необхідний рівень.

Таблиця 4.3.2.

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 19,8 л середовища, г (мл)	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20	396	5,5
Na <sub>3</sub> -citrate·3H <sub>2</sub> O	0,5	9,9	
Вода		5	
Конденсат		0,5	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0	59,4	14,28
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0	138,6	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,0	178,2	
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,1	1,98	
Вода		13	
Конденсат		1,28	
Біотин	0,005	19,8 мл	0,02
Всього			19,8

*Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 300 л*

Для цієї стадії необхідно приготувати 180 л поживного середовища. Склад композиції та умови їх стерилізації аналогічні пункту 4.3.2. Композиція Б готується в окремому збірнику об'ємом 200 л, Для запобігання утворенню нерозчинних солей рН розчину доводять до значення 4-4,6 за допомогою 6%-го розчину HCl, після чого стерилізація проводиться в посівному апараті на 300л. Оскільки рН розчину не оптимальним для культивування, передбачається також підготовка титрувального розчину 6%-го NaOH, для коригування рН середовища на необхідний рівень. Композиція А готується в окремому реакторі-змішувачі об'ємом 100 л.

Таблиця 4.3.3.

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 300 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 180 л середовища, г	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20	3600	60,82
Na <sub>3</sub> -citrate·3H <sub>2</sub> O	0,5	90	

Вода	55		119	
Конденсат	5,82			
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,0	540		
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	7,0	1260		
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	9,0	1620		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1	18		
Вода	108			
Конденсат	11			
Розчик біотину	0,005	0,18		0,18
Всього				180

#### 4.3.5. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для цієї стадії необхідно 1,64 м<sup>3</sup> (1640 л) поживного середовища, тому використання установки безперервної стерилізації не є необхідним. Композиція Б готується в окремому збірнику із додаванням 6%-го розчину НСІ доводячи рН до 4-4,5 для попередження утворення нерозчинних солей, тоді стерилізується в інокуляторі для зменшення ймовірності контамінації. Композиція А готується в окремому реакторі-змішувач на 630л.

Таблиця 4.3.4.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1640 л середовища, кг	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20	32,8	483,36
$\text{Na}_3\text{-citrate} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,82	
Вода	440		
Конденсат	43,36		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,0	4,92	1155
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	7,0	11,48	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	9,0	14,76	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1	0,164	
Вода	1050		
Конденсат	105		
Розчин біотину	0,005	1,64	1,64
Конденсат			
Всього			1640

## Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу

### 4.3.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Щоб підтримати оптимальний рН на рівні 7 під час культивування *Brevibacterium heali* LT27 для біосинтезу метіоніну, необхідно попередньо підготувати титрувальний агент у вигляді 6%-вого розчину натрію гідроксиду (NaOH). Оскільки розраховані дані щодо необхідних об'ємів розчинів компонента наведено у таблиці 4.3.5, можна провести розрахунки об'ємів і концентрацій для правильного підбору титрувального агенту.

Таблиця 4.3.5

#### Розраховані об'єми та особливості приготування 6 % р-ну NaOH

Об'єм ПС, л	Об'єм, мл	Особливість підготовки
2,2	4,4	У колбі на 0,5 л
19,8	39,6	
180	360	
1640	3280	у реакторі об'ємом 5 л

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає додаткову стадію з приготування та стерилізації 6% розчину NaOH.

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА МЕТІОНІНУ

Перелік обладнання, що використовується для біосинтезу метіоніну, наведено в таблиці 5.1. Детальний опис цього обладнання представлений у графічній частині роботи (апаратурна схема).

*Таблиця 5.1.*

### Специфікація обладнання. Виробництво метіоніну.

Позиція	Найменування позиції	Кількість	Характеристика обладнання
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник із шахтою вентиляційною 2.2 м Ø 630 Діаметр - 600 мм, довжина 2200 мм[32].
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр для вентиляції (G4) 287x592x300. Номінальна витрата повітря 1155 м <sup>3</sup> /год [33].
К-3	Компресор стиснення	1	Компресор IMPETUS VSD 22 Продуктивність компресора: 4,35 м <sup>3</sup> /хв. Тиск компресора: 7,5 бар. Розміри: 955x1095x1580 мм [34].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Фреоновий охолоджувач SDC 50-30. Виробник: Україна. Холодоагент: вода промислового водопостачання [35].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний РГ 200.500. Виробник: Kongur, Україна. Матеріал: нержавіюча сталь. Робочий тиск: 1,0 МПа [36].

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ</b>		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Замрій В.М.			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						41	84
Керівник		Сулейко Т.Л.			41		
Н. Контр.					<b>Кафедра БТМ</b>		
Зав.каф.		Стабніков В.П.					
<b>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА МЕТІОНІНУ</b>							

Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник Bitzer K033NB Виробник: Німеччина. Витрата води 1,2 м <sup>3</sup> /год [37].
Ф-7	Фільтр головного очищення	1	Фільтр Alter Air F5-F9. Матеріал: поліестер. Розміри: 892x592x600 мм. [38].
ІФ-8, ІФ-9, ІФ-10 ІФ-11	Індивідуальний фільтр	4	Фільтруючий елемент OZA 14T ST-R. Виробник: Omega Air.[39].
Д-12, Д-13, Д-14, Д-15, Д-16, Д-17, Д-18, Д-19, Д-20,	Ваговий дозатор для компонентів середовища	9	Ваговий дозатор ФС-125. Виробник: ТехноМашСтрой, Україна. Межі дозування: 0,150 - 50 кг. Матеріал: нержавіюча сталь. [40]
РЗ-21	Реактор-змішувач для підготовки композиції Б	1	Реактор-змішувач BSF-20L. Об'єм: 20 л. Виробник: Weifan. Матеріал: SUS316L/SUS304 сталь. Швидкість перемішування мішалки - 0 - 460 об/хв. Діапазон робочих температур: 0-260°C. Розміри: 500*500*1850 мм [41]
РЗ-22	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач BSF-10L. Об'єм: 10 л. Виробник: Weifan. Матеріал: SUS316L/SUS304 сталь. Швидкість перемішування мішалки - 0 - 450 об/хв. Діапазон робочих температур: 0-260°C. Розміри: 480*480*1560 мм [42]

I-23	Інокулятор	1	Інокулятор BLBIO-30. Об'єм: 30 л. Виробник: Китай. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Комплектація: сорочка, мішалка, датчики температури, кисню і рН. Розміри: 1300*790*1700 мм [43]
P3-24	Реактор-змішувач для підготовки композиції Б	1	Реактор-змішувач BF-200LS. Об'єм: 200 л. Виробник: Weifan. Матеріал: SUS316L/SUS304 сталь. Швидкість перемішування мішалки - 0 - 450 об/хв. Діапазон робочих температур: 0-260°C. Розміри: 1300*900*3400 мм [44]
P3-25	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач BSF-100L. Об'єм: 100 л. Виробник: Weifan. Матеріал: SUS316L/SUS304 сталь. Швидкість перемішування мішалки - 0 - 460 об/хв. Діапазон робочих температур: 0-260°C. Розміри: 690*6900*2350 мм [45]
I-26	Інокулятор	1	Інокулятор Techfors. Об'єм: 300 л. Виробник: Infors. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Комплектація: сорочка, мішалка, датчики температури, кисню і рН. Розміри: 1600*1450*3400 мм [46]
P3-27	Реактор-змішувач для підготовки композиції Б	1	Реактор-змішувач MR-3000. Об'єм: 3000 л. Виробник: Китай. Матеріал: нержавіюча сталь. Швидкість перемішування мішалки - 0 - 300 об/хв. Розміри: 2000*1500*3400 мм [47]

РЗ-28	Реактор-змішувач для підготовки композиції А	1	Реактор-змішувач СЕон 630L. Об'єм: 630 л. Виробник: «ГК Єврохіммаш К.О.». Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Швидкість перемішування мішалки - 50 об/хв. Діапазон робочих температур: 0-260°C. Розміри: 1380*1380*2790 мм [48]
Ф-29	Ферментер	1	Ферментер 3000 л. Об'єм: 3000 л. Виробник: Китай. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь. Комплектація: сорочка, мішалка, датчики температури, кисню і рН. Розміри: 1750*3450 мм [49]
ВН-30, ВН-31 ВН-32 ВН-33 ВН-34 ВН-35 ВН-36 ВН-37 ВН-38	Насос для перекачування	9	насос JETS100. Виробник: Китай. Потужність: 7,5 кВт. Продуктивність: 50 л/хв. Матеріал: SUS304 нержавіюча сталь [50]
РЗ-39	Реактор-змішувач для приготування NaOH	1	Реактор-змішувач BSF-5L. Об'єм: 5 л. Виробник: Weifan. Матеріал: SUS316L/SUS304 сталь. Швидкість перемішування мішалки - 0 - 460 об/хв. Діапазон робочих температур: 0-260C. Розміри: 450*480*1500 мм [51]

Закінчення таблиці 5.1.

РЗ-40	Реактор-змішувач для приготування HCl	1	Реактор-змішувач BSF-5L. Об'єм: 5 л. Виробник: Weifan. Матеріал: SUS316L/SUS304 сталь. Швидкість перемішування мішалки - 0 - 460 об/хв. Діапазон робочих температур: 0-260С. Розміри: 450*480*1500 мм [51]
РЗ-41	Реактор-змішувач для глюкози	1	Реактор-змішувач BF-200LS. Об'єм: 200 л. Виробник: Weifan. Матеріал: SUS316L/SUS304 сталь. Швидкість перемішування мішалки - 0 - 450 об/хв. Діапазон робочих температур: 0-260°С. Розміри: 1300*900*3400 мм [44]
ВН-42	Відцентровий насос для перекачування	1	Відцентровий Насос WETRON (775021) Виробник: Wetron. Потужність: 0,75 кВт. Продуктивність: 100 л/хв. Матеріал: SUS304 нержавіюча сталь [52]

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА МЕТІОНІНУ

Технологічна схема біосинтезу метіоніну включає допоміжні роботи (далі ДР) та технологічний процес (далі ТП).

### **ДР 1. Підготовка аераційного повітря**

*ДР 1.1. Забір атмосферного повітря через шахту висотою 12 м.*

*ДР 1.2. Очищення від грубих часток пилу.* Здійснюється шляхом подачі повітря на фільтри грубої очистки, де воно звільняється від великих часточок. Ступінь очищення 80% (Ф-2 фільтр для стисненого повітря з акрилового волокна).

*ДР 1.3. Стиснення повітря під дією компресора (К-3), стискається та нагрівається до температури 120-250 °С.*

*ДР 1.4. Охолодження та видалення вологи.* Повітря подається на переохолодження (Т-4) для видалення вологи на крапле-вловлювач, де температура знижується до 25-30 °С.

*ДР 1.5. Нагрівання повітря до 37 °С. (Т-6)*

*ДР 1.6. Фільтрування на фільтрах високої очистки.* Здійснюється висока очистка повітря на фільтрах (Ф-7) другого та третього ступенів очистки з боросилікатного волокна.

*ДР 1.7. Фільтрування на фільтрах індивідуальної очистки перед ферментерами.* Перед ферментером чи інокулятом, повітря проходить через його індивідуальний фільтр (ІФ 8-11) (із фторопластика діаметром пор 0,01 мкм, де очищується до 99,9% забруднень).

### **ДР 2. Приготування і стерилізація допоміжних розчинів**

*ДР 2.1. Приготування та стерилізація титрувального розчину гідроксиду натрію.*

Ваговим дозатором (Д13) зважують 221 г гідроксиду натрію, переносять

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<b>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА МЕТІОНІНУ</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Розроб.		Замрій В.М.					46	84
Консульт.								
Керівник		Сулейко Т.Л.						
Н. Контр.								
Зав.каф.		Стабніков В.П.						
						<b>Кафедра БТМ</b>		

у колбу-реактор на 5л (РЗ-39), з 400 мл питної води. Перемішують та в подальшому стерилізують при температурі 131 °С протягом 40 хв, 0,15МПа.

*ДР 2.2. Приготування та стерилізація підживлюючого розчину глюкози.* Відміряють (Д-12) 49,2 кг глюкози, переносять у реактор на 200 л (РЗ-41), додавши 75 л питної води. Одержують 123 л підживлюючого розчину, стерилізують при температурі 131 °С протягом 40 хв, 0,15МПа.

*ДР 2.3. Приготування титрувального розчину 6%-го р-ну НСІ.*

Для приготування 3,6л 6%-ї хлоридної кислоти в колбу-реактор об'ємом 5л вносять 3л води і при постійному перемішуванні додають 600мл концентрованої 36% хлоридної кислоти.

*ДР 2.4. Приготування та стерилізація запасного розчину біотину*

Розчин вітамінів готується з розрахунку 1 мл на 1 л середовища, звідси загальний об'єм розчину становить:  $2,2+19,8+180+1640 = 1842 \text{ мл} = 1,842 \text{ л}$ .

На технічних вагах зважують 9,21 г біотину та поміщають у колбу місткістю 100 мл. Мірним циліндром доливають 50 мл питної води та перемішують. Фільтрують через стерилізуючий фільтр з порами 0,2 мкм. У колбу ємністю 2 л переливають 50 мл розчину біотину та доливають 1,842л питної води, перемішують.

***ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ***

*ДР 3.1. Приготування і стерилізація 2,2 л поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.* Готуємо 2,2 л поживного середовища.

*ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А.* На технічних вагах зважують 44 г глюкози, 1,1 г  $\text{Na}_3\text{-citrate} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , поміщають в колбу об'ємом 1л, додають 400 мл питної води, перемішують до розчинення та закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 20 хв при температурі 112 °С, тиск 0,05 МПа.

*ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б.* На технічних вагах зважують 6,6 г дигідрофосфат калію, 15,4 г гідрофосфату калію, поміщають у колбу місткістю 2л та додають 898,9 мл питної води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 40 хв при температурі 131 °С, тиску 0,15МПа.

*ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 19,8 г амоній нітрату, 0,22 г  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , поміщають у колбу місткістю 2л та додають 898,9 мл питної води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві 40 хв при температурі 131 °С, тиску 0,15МПа.

*ДР 3.2. Приготування і стерилізація 19,8 л поживного середовища для одержання посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 30 л.*

*ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А.* Зважують (Д-13) 396 г глюкози, 9,9 г  $Na_3-citrate \cdot 3H_2O$  та поміщають у реактор на 10 л (РЗ-22), додають 5 л питної води. Закривають і стерилізують в цьому ж інокуляторі 20 хв при температурі 112 °С, тиск 0,05 МПа.

*ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б.* Зважують (Д-12) 59,4 г дигідрофосфат калію, 138,6 г гідрофосфату калію, 178,2 г амоній нітрату, 1,98 г  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  перемішують, переносять у реактор-змішувач на 20 л, (РЗ-21) додаючи 13 л питної води та розчин соляної кислоти для доведення рН до 4-4,5. Перекачують у інокулятор на 30 л.(І-23). Закривають і стерилізують 40 хв при температурі 131 °С, тиск 0,12МПа.

*ДР 3.3. Приготування і стерилізація 180 л поживного середовища для одержання посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 300л*

*ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А.* Зважують (Д-13) 3,6 кг глюкози, 90 г  $Na_3-citrate \cdot 3H_2O$  та поміщають у реактор на 100 л (РЗ-25), додаючи 55 л питної води, перемішують. Закривають і стерилізують в цьому ж реакторі при температурі 112 °С 20 хв, тиск 0,05 МПа.

*ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б.* Зважують (Д- 14) 540 г дигідрофосфат калію, 1260 г гідрофосфату калію, 1620 г амоній

нітрату, 18 г  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ . Наважку переносять у реактор на 200л (РЗ-24), додаючи 108 л питної води та розчином соляної кислоти доводять рН до 4-4,5. Перекачують у посівний апарат на 300 л (І-26). Закривають і стерилізують при температурі 131 °С 30 хв, 0,15МПа.

*ДР 3.4. Приготування і стерилізація 1640 л поживного середовища для одержання посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 3000л.*

*ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А.* Зважують (Д-17) 32,98 кг глюкози, 0,82 кг  $Na_3-citrate \cdot 3H_2O$  та поміщають у реактор на 630 л, (РЗ-28) додаючи 440 л питної води, перемішують. Закривають і стерилізують в цьому ж реакторі при температурі 112 °С 20 хв, тиск 0,05 МПа.

*ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б.* Зважують (Д-16) 4,92 кг дигідрофосфат калію, 11,48 кг гідрофосфату калію, 14,76 кг амоній нітрату, 164 г  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ . Наважку переносять у реактор на 3000л (РЗ-27), додаючи 1050 л питної води та розчин соляної кислоти для досягнення рН 4-4,5. Перекачують у посівний апарат на 3000 л. (Ф-29). Закривають і стерилізують при температурі 131 °С 30 хв, 0,15МПа.

#### **ТП 4. Підготовка посівного матеріалу**

*ТП 4.1. Підтримання колекційної культури.* Культуру *Brevibacterium heali* LT27 зберігають у холодильнику при  $+4 \pm 1^\circ C$  у вигляді ліофілізованої культури.

*ТП 4.2. Отримання робочої культури на МПА середовищах.*

Колекційну культуру відновлюють в пробірках МПА, тоді розсівають до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА за допомогою мікробіологічної петлі і вирощують 48 год при температурі 30°C.

*ТП 4.3. Вирощування культури на МПА середовищі.*

Отримані ізольовані колонії пересівають в пробірки зі скошеним МПА. Тривалість 48 години при температурі 30°C.

*ТП 4.4. Вирощування культури в колбах на качалках.*

У стерильну колбу об'ємом 5 л додають в асептичних умовах весь об'єм композиції А, Б, В та 2,2 мл розчину біотину, перемішують - це необхідно для вирощування посівного матеріалу. Загальний об'єм виходить 2,2 л. Розливають по 150 мл в 15 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл, вносять посівний матеріал з пробірок з МПА, засіяних *Brevibacterium heali* раніше. Параметри культивування 48 год при температурі 30°C.[16, 17]

*ТП 4.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 30 л.* В інокулятор (I-23), що містить стерильну композицію Б, додають композицію А та 19,8 мл розчину біотину в асептичних умовах, через засівні колби. Тоді додають 2,2 л ПМ зі стадії вирощування на качалках через засівну колбу в асептичних умовах і починають процес культивування. Підтримування рівня рН відбувається шляхом додавання розчинів гідроксиду натрію та соляної кислоти. Культивування триває 48 годин при рН 7, температурі 30°C, постійній аерації та перемішуванні 300 об/хв.

*ТП 4.6. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 300л.* У посівний апарат на 300л (I-26), в якому знаходиться стерильна композиція Б, додають композицію А та 180 мл розчину біотину. Додають 19,8 л посівного матеріалу з попередньої стадії вирощування у 30 літровому посівному апараті через трубу перетиснення, перемішують та розпочинають процес культивування. Рівень рН підтримується завдяки доливанню розчинів соляної кислоти та гідроксиду натрію. Культивування відбувається при рН 7.0, температурі 30°C, аерації та перемішуванні 300 об/хв протягом 48 год.

## ***ТП 5. Біосинтез***

### *ТП 5.1. Виробниче культивування метіоніну *Brevibacterium heali* LT27*

Виробниче культивування метіоніну здійснюють у ферментері (Ф-29) об'ємом 3 м<sup>3</sup> (робочий об'єм – 1,82 м<sup>3</sup>). У ферментер зі стерильною композицією Б, в асептичних умовах вносять стерильну композицію А і 1,64л розчину біотину та посівний матеріал через трубу перетиснення від посівного апарата на 300 л. Рівень рН підтримують шляхом додавання розчинів соляної кислоти та гідроксиду натрію. Починають процес культивування. Аерація підтримується на рівні розчиненого кисню (рО<sub>2</sub>) 60% від насичення повітрям.

Параметри культивування: рН – 7,0, перемішування 200об/хв, температура 30°C, тривалість культивування 72 год. Під час процесу культивування в асептичних умовах поступово вносять підживлюючий розчин глюкози до ферментера. 1 раз в 4 години відбирають проби, щоб проаналізувати процес ферментації (кількість джерела азоту та вуглецю у культуральній рідині, концентрацію біомаси). Процес ферментації продовжують до 72 год, однак остаточна зупинка процесу відбувається при досягненні концентрації цільового продукту у 25,5 г/л.

## РОЗІДЛ 7. Контроль виробництва

### 7.1. Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1

#### Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
ДР 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i> К <sub>Т</sub>	<i>повітрозабірник висота повітрозабірника</i>	—	під час купівлі та встановлення	H = 12 м
ДР 1.2 <i>Очистка від грубих часток пилу</i>	<i>повітря після проходження фільтра грубої очистки</i>	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	E = 80 %
ДР 1.3 <i>Стиснення повітря</i> К <sub>Т</sub>	<i>стиснене повітря після проходження компресора тиск, температура</i>	манометр, термометр	після проходження через компресор	P = 1,0 МПа t = 120 – 250°C
ДР 1.4 <i>Охолодження та видалення вологи</i> К <sub>Т</sub>	<i>охоложене повітря температура, вологість</i>	термометр, психрометр	після охолодження	t = 25– 30°C W = 60–70%
ДР 1.5 <i>Нагрівання повітря</i> К <sub>Т</sub>	<i>нагріте повітря температура, вологість</i>	термометр, психрометр	після нагрівання	t° = 37°C W = 50 %

Продовження таблиці 7.1.

<p>ДР 1.6 Фільтрування на фільтрах високої очистки К<sub>Т</sub></p>	<p>повітря після проходження головного фільтра ступінь очищення</p>	<p>згідно з паспортом фільтра</p>	<p>після проходження через фільтр</p>	<p>E = 95 %</p>
<p>ДР 1.7 Фільтрування на фільтрах індивідуальної очистки перед ферментерами К<sub>Т</sub></p>	<p>повітря після проходження фільтра високої очистки ступінь очищення</p>	<p>згідно з паспортом фільтра</p>	<p>після проходження через фільтр</p>	<p>E = 99,9 %</p>
<p>ДР 2.1 Приготування титрувального розчину гідроксиду натрію К<sub>Т</sub>, К<sub>Х</sub>, К<sub>М</sub></p>	<p>температура, час, тиск, стерильність, концентрація</p>	<p>датчик температури, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>температура, тиск, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T = 131°C P = 0,15 МПа, t = 30 хв стерильність</p>
<p>ДР 2.2 Приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози К<sub>Т</sub>, К<sub>Х</sub>, К<sub>М</sub></p>	<p>температура, час стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>датчик температури, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>температура, тиск, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>T = 131°C P = 0,15 МПа, t = 30 хв стерильність</p>

Продовження таблиці 7.1.

<p>ДР 2.4 Приготування та стерилізація запасного розчину біотину Кт, Км</p>	<p>температура, час стерилізації, стерильність</p>	<p>датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>температура, час – безперервно, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>d=0,2 мкм стерильність</p>
<p>ДР 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А Кт, Км</p>	<p>композиція А температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, час, тиск – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t = 112 °С t = 20 хв P = 0,05МПа стерильність</p>
<p>ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції В Кт, Км</p>	<p>композиція В температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, час, тиск – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t = 131 °С t = 40 хв P = 0,15МПа стерильність</p>
<p>ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції В Кт, Км</p>	<p>композиція В температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, час, тиск – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t = 131 °С t = 40 хв P = 0,15МПа стерильність</p>

Продовження таблиці 7.1.

<p>ДР 3.2.1, 3.3.1, 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А К<sub>Т</sub>, К<sub>М</sub></p>	<p>композиція А температура розчинення, частота обертання мішалки, час і температура стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>манометр, датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура розчинення та швидкість перемішування підтримуються автоматично, температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>n = 50 об/хв t = 112 °С P = 0,05 МПа t = 20 хв стерильність</p>
<p>ДР 3.2.2, 3.3.2, 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б К<sub>Т</sub>, К<sub>М</sub>, К<sub>Х</sub></p>	<p>композиція Б рН, температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>датчик рН, датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>рН – перед стерилізацією, температура, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>рН = 4-4,5 P = 0,15 МПа t = 131 °С t = 40 хв стерильність</p>
<p>ТП 4.1 Підтримання колекційної культури К<sub>Т</sub>, К<sub>М</sub></p>	<p>колекційна культура <i>Brevibacterium heali</i> LT27 температура, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 2 місяці</p>	<p>t° = +4 ±1°С мікробіологічна чистота</p>

Продовження таблиці 7.1.

<p>ТП 4.2 Отримання робочої культури на МПА середовищах КТ, КМ</p>	<p>робоча культура <i>Brevibacterium heali</i> LT27 на чашках Петрі із МПА температура, час, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування</p>	<p>t = 30°C t = 48 год мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 4.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах КТ, КМ</p>	<p>робоча культура <i>Brevibacterium heali</i> LT27 у пробірках температура, час, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування</p>	<p>t = 30°C t = 48 год мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 4.4 Вирощування культури в колбах на качалках КТ, КМ</p>	<p>посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, частота обертання колб підтримується автоматично, мікробіологічний контроль – після культивування</p>	<p>t° = 30 °C t = 48 год n = 250 хв<sup>-1</sup> мікробіологічна чистота</p>

Закінчення таблиці 7.1.

<p>ТП 4.5, 4.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 0,03м<sup>3</sup>, 0,3 м<sup>3</sup> Кт, Км</p>	<p>посівний матеріал рН, температура, час, швидкість, перемішування, витрата аераційного повітря, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, датчик рН, годинник, тахометр, ротаметр, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>рН – перед початком процесу, температура, частота обертів мішалки та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси та мікробіологічний контроль – кожні 8 год і після культивування</p>	<p>рН = 7 t = 30°C t = 48 n = 300 об/ хв мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 5.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 3 м<sup>3</sup> Кт, Км</p>	<p>культуральна рідина температура, час, швидкість перемішування, витрата аераційного повітря, рН, концентрація біомаси, концентрація метіоніну, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, рН, годинник, тахометр, ротаметр, хроматограф, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, швидкість перемішування та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси, лізину, мікробіологічний контроль – кожні 4 год</p>	<p>рН = 7 t = 30°C t = 72 год n = 200 хв<sup>-1</sup> С (метіоніну) = 25,5 г/л мікробіологічна чистота</p>

## 7.2. Мікробіологічний контроль.

Протягом процесу культивування зразки культуральної рідини відбирають через кожні 4 години з метою мікробіологічного аналізу, визначення рівня біомаси, концентрації метіоніну, а також вмісту вуглецю та азоту.

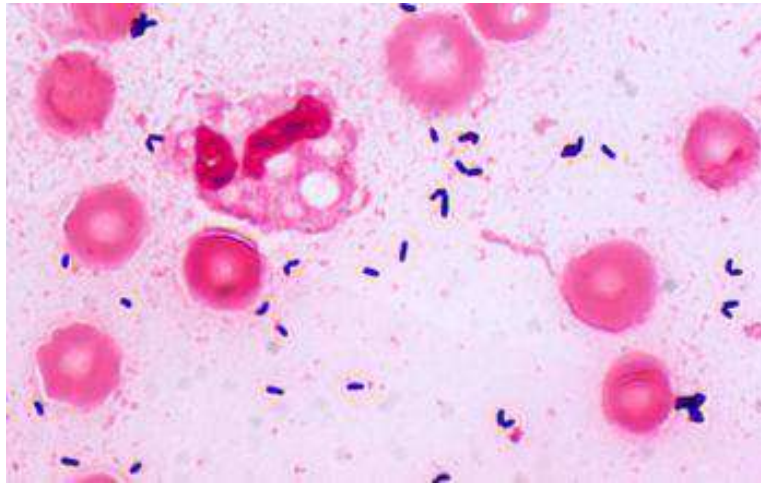
Для мікробіологічного контролю застосовують метод висіву розведених проб культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованими живильними середовищами різного складу, а також мікроскопічне дослідження.

Мікроскопію проводять за допомогою препарату «розведена крапля», який готують на знежиреному предметному склі. На скло наносять невелику краплю культуральної рідини, накривають покривним склом і досліджують під мікроскопом, використовуючи об'єктив з 40-кратним збільшенням або імерсійний метод зі збільшенням 90х. Під час аналізу морфолого-культуральних властивостей продуцента особливу увагу приділяють характерним особливостям клітин.

У разі необхідності перед мікроскопією проводять забарвлення за Грамом для перевірки чистоти культури. Для цього готують мазковий препарат, фіксують його в полум'ї пальника, після чого накладають фільтрований папір, просочений генціанвіолетом, і додають кілька крапель дистильованої води. Через дві хвилини папір видаляють, а залишки барвника зливають. Потім мазок обробляють розчином Люголя, витримують дві хвилини і також зливають. Далі відбувається знебарвлення 96% етиловим спиртом протягом 20–30 секунд, після чого мазок промивають водою. На наступному етапі на зразок наносять фуксин Пфейфера на 1–2 хвилини, після чого препарат промивають, висушують і мікроскопіюють. Грампозитивні бактерії забарвлюються у фіолетовий колір, а грамнегативні – у червоний. [12]

(рис. 7.1.)

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Замрій В.М.			<b>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНЦИТВА</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Консульт.							58	84
Керівник		Сулейко Т.Л.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав.каф.		Стабніков В.П.						



*Рис. 7.1. Мікроскопія **Brevibacterium heali** за грамом*

*Brevibacterium heali* - це грам-позитивні бактерії паличкоподібні, які розташовуються поодинокі або парами. Вони часто утворюють характерні V-подібні скупчення. Їхні розміри варіюються від 0,6 до 1,2 мкм у діаметрі та від 1,5 до 6 мкм у довжину. Ці мікроорганізми є обов'язково аеробними, а їхні колонії мають жовто-фіолетовий пігмент. Оптимальні температурні умови для їхнього розвитку знаходяться в межах 20–35°C. Для знищення бактерій достатньо стандартної пастеризації при 70°C протягом 2 хвилин.

*Brevibacterium* добре розмножуються на більшості універсальних та факультативних живильних середовищ. Їх можна виділити методом прямого висіву або шляхом збагачення. Останній передбачає інкубацію при 20–25°C у середовищах із мінеральними компонентами. Хоча жорстко селективних агаризованих середовищ для цього виду немає, найчастіше застосовують TSA із додаванням 4% NaCl, інкубуючи протягом 5–7 днів перед подальшою ідентифікацією.

*Brevibacterium* здатні засвоювати різноманітні вуглеводи, зокрема глюкозу, фруктозу, галактозу, лактозу, а також певні полісахариди.

### **7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту**

#### **7.3.1. Концентрація біомаси**

Концентрацію біомаси визначають шляхом вимірювання оптичної густини клітинної суспензії, після чого виконують перерахунок на масу сухої речовини за калібрувальним графіком щодо стандартного зразка.

Для аналізу до пробірки додають 9 мл дистильованої води та 1 мл культуральної рідини. Після ретельного перемішування вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм.

#### **7.3.2. Концентрація глюкози як джерела вуглецю**

Основним джерелом вуглецю в середовищі є глюкоза. Для визначення її концентрації використовують модифікований метод глюкозооксидази з використанням біосенсорів, на яких іммобілізована глюкозооксидаза, а також амперометричний датчик.

Для аналізу відбирають 50 мл культуральної рідини з ферментера і переносять її в центрифугу. Центрифугування здійснюється на швидкості при 1500 об/хв протягом 15-20 хв. Після цього фільтрують утворену суспензію через фільтрувальний папір, а фільтрат збирають в окрему ємність. Відбирають певний об'єм цього фільтрату і розводять його в межах від 250 до 1000 разів. Потім відбирають 5-10 мл розведеного розчину і переносять в 20 мл буферного розчину системи:  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  з рН 7,2. До цієї суміші додають іммобілізовану глюкозооксидазу на полімері ЕДТ (20 мМ фосфатний буфер, рН 6,2), що містить  $10^{-2}\text{M}$  3,4-етилендіокситіофену,  $10^{-3}\text{M}$  поліетиленглікою та 30 мг/мл розчину ГОД у вигляді суспензії.

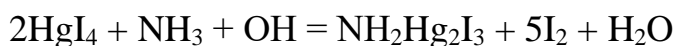
Концентрація глюкози визначається за допомогою амперометричного приладу з триелектродною системою. Для вимірювання датчик опускається в розчин, що містить з глюкозооксидазу та підготовлену культуральну рідину і вимірюється сила струму.

Концентрацію глюкози обчислюють за допомогою калібрувальної кривої, що показує залежність між силою струму (нА) і концентрацією

глюкози (мМ). Потім отримане значення множать на коефіцієнт розведення та переводять концентрацію з мМ у г/л, оскільки вміст карбону в глюкозі 40%, 1 г глюкози відповідає 0,4 г карбону. [54, 55]

### 7.3.3. Концентрація джерела азоту

Метод визначення концентрації амонійного азоту заснований на застосуванні реактиву Несслера, який використовують для виявлення амонійного азоту в солях, що є джерелом азоту в середовищі. Метод ґрунтується на утворенні забарвленої важкорозчинної сполуки, коли аміак взаємодіє з реактивом Несслера ( $K_2HgI_4$ ) в нейтральних або лужних середовищах.



Застосовувати надлишкову кількість лугу небажано, оскільки це призводить до розкладу  $NH_2Hg_2I_3$  із утворенням гідраргіуму оксиду. Утворена забарвлена сполука має тенденцію до формування негативно заряджених колоїдних часток. Для забезпечення стабільності суспензії та її рівномірності до розчину додаються захисні колоїди, такі як желатин або полівініловий спирт. Розчини при низькій концентрації аміаку мають жовте забарвлення, а при високих концентраціях – коричневе.

Колоїди, що утворюються в процесі визначення методом Несслера, можуть коагулювати, що значно знижує точність результату аналізу.

Для визначення аміаку до 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 1 мл реактиву Несслера. Після цього вимірюється коефіцієнт екстинції на довжині хвилі 400-425 нм. Концентрація аміаку визначається за калібрувальним графіком. Варто зазначити, що фотометричне визначення аміаку методом Несслера може бути зашкоджене іонами, які випадають в осад в лужному середовищі та утворюють нерозчинні сполуки з йодид-іонами та іонами ртуті. [54].

### 7.3.4. Визначення концентрації цільового продукту

Для визначення концентрації метіоніну в біомасі бактерій використовується вискоелективна рідинна хроматографія (HPLC) з попереднім гідролізом зразків. Метод дозволяє отримати точні кількісні показники вмісту метіоніну у клітинній біомасі.

Відбирають 10 мл культуральної рідини для аналізу, центрифугують при 10 000 об/хв протягом 10 хв для осадження бактеріальної біомаси. Осад промивають стерильним фізіологічним розчином 0,9% NaCl, потім повторно центрифугують. Висушену біомасу зважують та подрібнюють до однорідного порошку. 100 мг висушеної біомаси поміщають у мікрохвильову посудину із додаванням 5 мл 6М HCl для гідролізу білків. Закривають посудину і нагрівають на потужності 600-800Вт протягом 5-15 хв. Після нагрівання, охолоджують пробу до кімнатної температури. Тоді центрифугують пробу для видалення нерозчинених часток. Використовуючи роторний випарник, випаровують надлишок HCl з супернатанту. Далі сухий залишок розчиняють у 2 мл цитратного буфера (pH 2,2) для подальшого аналізу.

Використовують колонку Hypersil BDS C18 (250×4,6 мм, розмір часток 5µm). Рухома фаза: фосфатний буфер (А) і суміш (вода: ацетонітрил : метанол 20:20:60) (В). Температура колонки підтримується на рівні 45°C, швидкість потоку встановлюється на 1,7 мл/хв, об'єм інжекції становить 50l. Виявлення метіоніну здійснюється спектрофотометрично при 570 нм після дериватизації ортофталевим альдегідом (OPA). [53-55]

## РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

### 8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Процес біосинтезу метіоніну за участю *Brevibacterium heali* LT27 супроводжується утворенням рідких відходів, зокрема залишкової культуральної рідини та мийно-дезінфекційних розчинів. Компоненти, що містяться у цих рідинах, можуть завдавати шкоди навколишньому середовищу, що обумовлює необхідність впровадження систем для їх ефективного знешкодження.

На біотехнологічних підприємствах формуються три основні категорії стічних вод: виробничі, побутові та атмосферні.

Середній обсяг виробничих стічних вод за зміну розраховується наступним чином:  $Q_e = q_e \cdot n = 10000 \cdot 371,6 = 3716 \text{ м}^3/\text{рік} = 10,18 \text{ м}^3/\text{добу}$ , де  $q_e$  – норматив водовідведення (л) на одиницю продукції (орієнтовно прийнято 10000 л/кг);  $n$  – кількість продукції, виготовленої за зміну (371,6 кг).

Обсяг побутових стічних вод за зміну становить:

$Q_n = q_n \cdot N = 25 \cdot 15 = 375 \text{ л/зміну}$ , де  $q_n$  – норматив водовідведення (л) на одного працівника (для холодного цеху – 25 л/зм);  $N$  – кількість працівників у зміні.

За добу загальний обсяг побутових стічних вод розраховується так:

$Q_n = Q_n \cdot N_{зм} = 375 \cdot 3 = 1225 \text{ л/добу}$ , де  $N_{зм}$  – кількість змін за добу (3).

Обсяг атмосферних стічних вод визначається за формулою:

$Q_a = Q_n/5 = 375/5 = 75 \text{ л/добу}$ .

Отже, загальний добовий обсяг стічних вод на підприємстві становить:

$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 10,18 + 1,225 + 0,075 = 11,48 \text{ м}^3/\text{добу}$ .

Під час біосинтезу метіоніну утворюються також газоподібні відходи, зокрема аераційне повітря, що містить клітинний аерозоль мікроорганізмів і

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.04 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Замрій В.М.</i>			<b>РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							63	84
<i>Керівник</i>		<i>Сулейко Т.Л.</i>				<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Н. Контр.</i>						<b>63</b>		
<i>Зав.каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

продукти їхньої життєдіяльності.

Процес отримання інокуляту триває 48 годин, а основний біосинтез – 72 години. Для аерації середовища використовується стерильне повітря зі швидкістю подачі 1,2 л на 1 л культуральної рідини на хвилину. Виробниче приміщення оснащено трьома біореакторами об'ємом 30 л, 300 л та 3 м<sup>3</sup>.

Обсяг повітря для інокулятора 30 л:

$$1,2 \cdot 19,8 = 23,76 \text{ л/хв, за 48 годин: } 23,76 \cdot (48 \cdot 60) = 68\,428,8 \text{ л} = 68,43 \text{ м}^3.$$

Для інокулятора 300 л:

$$1,2 \cdot 180 = 216 \text{ л/хв, за 48 годин: } 216 \cdot (48 \cdot 60) = 622\,080 \text{ л} = 622,08 \text{ м}^3.$$

Обсяг повітря для ферментера 3 м<sup>3</sup>:

$$1,2 \cdot 1,64 = 1,968 \text{ м}^3/\text{хв, за 72 години: } 1,968 \cdot (72 \cdot 60) = 8\,501,76 \text{ м}^3.$$

Таким чином, загальний обсяг відпрацьованого аераційного повітря становить:  $68,43 + 622,08 + 8\,501,76 = 9\,192,3 \text{ м}^3$ .

## **8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва**

### **8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів**

Рідкі відходи, що підлягають утилізації, можуть бути ефективно очищені за допомогою системи зворотного осмосу RO-7000 Small (Аква Форсайт, Україна) з продуктивністю 168 000 л/добу. Механізм роботи цієї технології базується на подачі рідини під тиском на спеціалізовану мембрану, яка затримує забруднювачі, дозволяючи очищеній воді проходити далі [59]. Основною перевагою цього методу є здатність видаляти низькомолекулярні сполуки з рідини, а також можливість повторного використання очищеної води у виробничих процесах [60]. Автоматизована система забезпечує захист насоса від сухого ходу, мембран від надмірного тиску, а також виконує гідравлічне промивання мембран. Крім того, обладнання укомплектоване передфільтром Big Blue 20 із розміром пор 5 мкм та контролером для зручного управління процесом очищення.



Рис. 8.1. Система зворотного осмосу RO-7000

Системи зворотного осмосу мають і певний недолік: їх безпосереднє застосування для очищення відпрацьованої рідини є економічно не вигідним через швидке засмічення фільтрів та компонентів системи [60]. Зважаючи на те, що у комплектацію обладнання входить передфільтр із пропускною здатністю 5 мкм [59], доцільно додатково встановити фільтр MPF моделі MPF1002AG2P10NBP01 (MP Filtri, Італія) з розміром пор 10 мкм [61]. Це дозволить знизити навантаження на передфільтр, тим самим продовжуючи термін його експлуатації. Для ще більш ефективного захисту системи рекомендовано додати гідравлічний зливний фільтр MPF1003AG3P25NBP01 (MP Filtri, Італія), здатний утримувати частки розміром понад 25 мкм. В обох пристроях як матеріал фільтроелемента використовується мікрокартон із просоченням [61].

### 8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Процес біосинтезу метіоїну за участю *Brevibacterium heali* LT27 супроводжується утворенням твердих відходів, таких як залишки біомаси та упаковки від мийно-дезінфікуючих засобів і компонентів поживного середовища.

Утилізація біомаси пропонується шляхом автоклавування в спеціальних установках. Щодо утилізації пластикових упаковок, пропонується сортувати відходи, а потім передавати їх на підприємства, що спеціалізуються на переробці цього виду матеріалів. Упаковки та кришки сортують за типами пластику, після чого ретельно миють і просушують перед передачею на переробку. В Україні ці процеси здійснює компанія «Регіон-2001» [63, 64].

Під час виробництва може також утворюватися невеликий обсяг скляних відходів через пошкодження лабораторного посуду. Склобій необхідно збирати в окремі контейнери та передавати на утилізацію відповідним підприємствам. Крім того, можуть з'являтися картонні відходи через використання картонних коробок для групової упаковки мийно-дезінфікуючих засобів чи компонентів поживного середовища. Скляні та картонні відходи також можна передавати на переробку в «Регіон-2001» [64].

### **8.2.3. Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів**

Для нейтралізації газоподібних продуктів життєдіяльності доцільно встановити вологі скрубери моделі Spray Venturi Scrubbers від AСMAN [62]. Таке обладнання широко застосовується в хімічній та фармацевтичній промисловості й ефективно видаляє як великі, так і дрібні частинки, включаючи ті, що мають розмір менше 1 мікрона або високу вологість і липкість. Завдяки цьому ефективність очищення повітря досягає 98,5%.

Для наших потреб оптимальним варіантом буде модель FCT-40, що має продуктивність у межах 3786–4527 м<sup>3</sup>/год. Система оснащена насосом потужністю 0,75 кВт, резервуаром для води об'ємом 700 л, а діаметр корпусу апарата становить 950 мм.



*Рис. 8.2.* Скрубер моделі Spray Venturi Scrubbers

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проєкту для здобуваїв вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 «Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79с.
2. Біохімічні основи мікробного синтезу: метод. рекомендації до викон. курс. роботи для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. / Уклад. Т.П. Пирог, А.Д. Конон. – К.: НУХТ, 2014. – 23 с. (№8355).
3. Cai, Zhifei Liu, Zhenqiang Zhao, Hongxuan Wu, Meijuan Xu, Zhiming Rao (2023). Microbial production of L-methionine and its precursors using systems metabolic engineering. Journal of ScienceDirect. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108260 [Електронний ресурс] – Режим доступу:<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975023001672?via%3Dihub>
4. Укрінформ. Агропереробка після війни[Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://clipr.cc/8gKCb>
5. Метіонін /Mst-distributor [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://mstnutrition.ua/ru/wiki/shho-take-l-metionin/>
6. J. Gomes, D. Kumar. Production of L-methionine by submerged fermentation. Enzyme and Microbial Technology 37 (2005) 3-18. [Електронний ресурс] – Режим доступу: [https://www.academia.edu/7380004/Production\\_of\\_l\\_methionine\\_by\\_submerged\\_fermentation\\_A\\_review?email\\_work\\_card=thumbnail](https://www.academia.edu/7380004/Production_of_l_methionine_by_submerged_fermentation_A_review?email_work_card=thumbnail)
7. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 6137, Methionine" 2024. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methionine>.

8. Нормативно-директивні документи МОЗ України. Метіонін.  
[Електронний ресурс] – Режим доступу:  
<https://mozdocs.kiev.ua/likiwiew.php?id=20526>
9. Kikuchi, Y., & Terui, G. (2008). Improvement of Methionine Production by *Brevibacterium flavum* Through Metabolic Engineering. "Applied Microbiology and Biotechnology", 79(1), 91-98. [Електронний ресурс] – Режим доступу: DOI: 10.1007/s00253-008-1429-3.
10. Hermann, T. (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology*, 104(1-3), 155-172. [Електронний ресурс] – Режим доступу: DOI: 10.1016/S0168-1656(03)00149-4.
11. Matthias Boy, Daniela Klein, Hartwig Schröder. Пат. №US7785846 B2, Method for the production of methionine- опублік. 31 сер. 2010.[Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://image-ppubs.uspto.gov/dirsearch-public/print/downloadPdf/20070122888>
12. Mondal, S., Das, Y. B., & Chatterjee, S. P. (1994). L-Methionine production by double auxotrophic mutants of a methionine resistant strain of *Brevibacterium heali*. *Acta Biotechnologica*, 14(1), 61–66. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1002/abio.370140111>
13. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B<sub>12</sub>. Bernard D. Davis and Elizabeth S. Mingioli. U. S. Public Health Service, Tuberculosis Research Laboratory, Cornell University Medical College, New York 21, N. Y. Received for publication March 27, 1950. . [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jb.60.1.17-28.1950>.
14. Sakamoto, J., & Murata, S. (2019). Process Optimization for Enhanced Methionine Production Using *Brevibacterium heali*. "Biochemical Engineering Journal", 143, 137-145. [Електронний ресурс] – Режим доступу: DOI: 10.1016/j.be.

15. Brevibacterium. [Електронний ресурс]- Режим доступу:  
<http://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/brevibacterium>
16. Пирог, Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник / Т.П. Пирог, Ю.М. Пенчук. – К. :Ліра-К, 2019. – 258 с.
17. LPSN Brevibacterium heali [Електронний ресурс]- Режим доступу:  
<https://lpsn.dsmz.de/species/brevibacterium-healii>
18. Нормативно-директивні документи МОЗ України. Метіонін.  
[Електронний ресурс] – Режим доступу:  
<https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=20526>
19. Цироз печінки: рекомендації АГА. Український медичний часопис.  
Хиць А.Р. 2019р. [Електронний ресурс] – Режим доступу:  
<https://umj.com.ua/uk/novyna-164686-tsiroz-pechinki-rekomendatsiyi-aga>
20. Уніфікований клінічний протокол первинної та спеціалізованої медичної допомоги «Цироз печінки компенсований»/ ГС 2024-1734-2. 2024 р. [Електронний ресурс] – Режим доступу:  
<https://www.dec.gov.ua/?ZG93bmxvYWQ=d3AtY29udGVudC91cGxvYWZlZlZlMjQvMTAveWtwbWRfMTczNF8xMDEwMjAyNF9kb2RfMi5wZGY=>
21. Скільки населення в Україні. РБК-Україна. 2024р. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.rbc.ua/rus/news/skilki-naselennya-ukrayini-otsinka-sogodni-1727847652.html>.
22. Державний реєстр лікарських засобів України. Інформаційний фонд. Метіонін. [Електронний ресурс] – Режим доступу:  
<http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&query=%E5%F2%B3%EE%ED%B3%ED>
23. KEGG – Table of Contents. Citrate cycle [Електронний ресурс]- Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00020](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00020)

- 24.KEGG – Table of Contents. Glycolysis [Електронний ресурс]- Режим доступу:[https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map=map00010&show\\_description=show](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00010&show_description=show)
- 25.KEGG – Table of Contents. Cysteine and methionine metabolism [Електронний ресурс]- Режим доступу: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map=map00270&show\\_description=show](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00270&show_description=show)
26. Smith, A.B., Bogoslawski, A., Reimann, J., Schott, A.K., Klätschke, K., Berghoff, B.A. (2020). Biosynthesis of Methionine in *Brevibacterium*: Current Insights and Future Perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 47(5), 514-520.[Електронний ресурс] – Режим доступу: DOI: 10.1007/s10295-020-02248-1.
- 27.Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. – 373 с.
- 28.Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К.:НУХТ, 2009. – 336 с.
- 29.3 Unique Benefits Of Methionine. Walter Nichman 2023. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://swolverine.com/blogs/blog/methionine-benefits>.
30. L метіонін: для чого приймають, корисні властивості метіоніну для організму людини. BELOK.UA. 2023. [Електронний ресурс] – Режим доступу: [https://belok.ua/blog/ua/l-metionin-dlya-chogo-prijmayut-korysni-vlastyvosti-metioninu-dlya-organizmu-lyudyny/?srsltid=AfmBOopKjB0xln\\_XL8p8BDRxDe6bNYu\\_lhe6UpCp3CQMJJUHLi\\_o973x](https://belok.ua/blog/ua/l-metionin-dlya-chogo-prijmayut-korysni-vlastyvosti-metioninu-dlya-organizmu-lyudyny/?srsltid=AfmBOopKjB0xln_XL8p8BDRxDe6bNYu_lhe6UpCp3CQMJJUHLi_o973x)
- 31.Stipanuk, M.H. (2007). Sulfur amino acid metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annual Review of Nutrition*, 26, 203-221. .[Електронний ресурс] – Режим доступу: DOI: 10.1146/annurev.nutr.26.061505.111259.

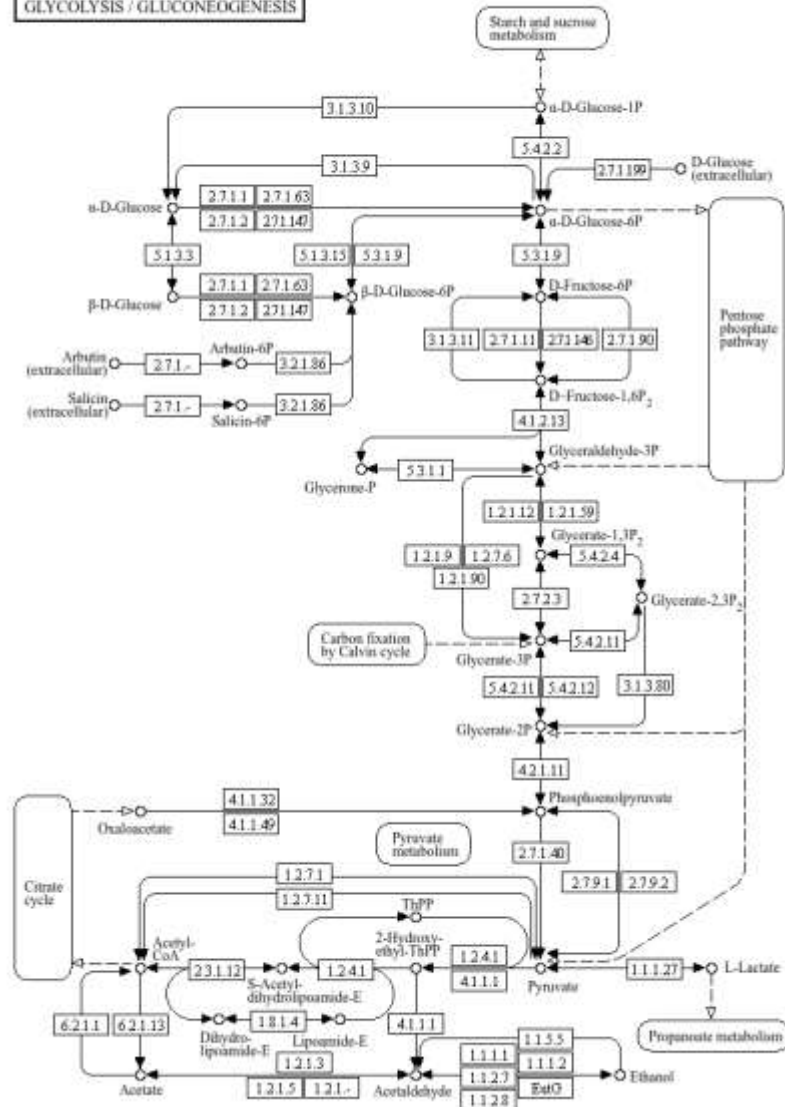
32. Повітрязабірник із вентиляційною шахтою Ø 630 [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://ukrferma.com.ua/shakhta-ventyliatsiina-d-630-mm-380-v/?gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiApY-7BhVjEiwAQMrEdBkkN6CMSzTPSCLTsPSOo5zOFRYb4tpj\\_S1e8PZom-eTbtk6EG7URoCkwUQAvD\\_BwE](https://ukrferma.com.ua/shakhta-ventyliatsiina-d-630-mm-380-v/?gad_source=1&gclid=CjwKCAiApY-7BhVjEiwAQMrEdBkkN6CMSzTPSCLTsPSOo5zOFRYb4tpj_S1e8PZom-eTbtk6EG7URoCkwUQAvD_BwE)
33. Фільтр для вентиляції (G4) [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://tehno-parts.com.ua/karmannyi-filtr-dlia-ventiliatsii-g4?srsltid=AfmBOoqpNdddmRkhaQ7aftntgagqFRMAFbn9SCfouqCNw23\\_k5WXAqEj](https://tehno-parts.com.ua/karmannyi-filtr-dlia-ventiliatsii-g4?srsltid=AfmBOoqpNdddmRkhaQ7aftntgagqFRMAFbn9SCfouqCNw23_k5WXAqEj)
34. Компресори IMPETUS VSD 22 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/dvostupinchati-kompresori-seriyi-impetus-22-75-1-02-13-22-m3-hv/>
35. ФРЕОНОВИЙ ОХОЛОДЖУВАЧ SDC 50-30. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://teko-ua.com/ua/freonoviyj-oxladitel-sdc-50-30.html>
36. РЕСИВЕР ПОВІТРЯНИЙ ВЕРТИКАЛЬНИЙ РГ 200.500. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kongyr.com.ua/ua/products/resiver-vozdushniy-gorizontalny-rg-200.500.html>
37. Теплообмінник Bitzer K033NB. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://intercool.com.ua/teploobmenniki/teploobmenniki-zhidkost/kozuhotrubnye/teploobmennik-kozuhotrubnyj-bitzer-k033nb.html>
38. Фільтр Alter Air F5-F9. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/pocket-filter-f-class/>
39. Фільтруючий елемент OZA 2055 ST-R [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://alpha-matic.com.ua/ua/p198272592-filtruyuschij-element-oza.html>
40. Ваговий дозатор ФС-125 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://tmsukraine.com.ua/ua/p1345448684-vesovoj-dozator-125.html?srsltid=AfmBOorrNN32Av6en7X77-a6nyoWhEFYg4QIA1Da5lgIf4Ty95VMFieR>

41. Реактор-змішувач BSF-20L [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/20l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>
42. Реактор-змішувач BF-10LS [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/glass-reactor/jacketed-glass-reactor/chemglass-reactor.html>
43. Біореактор BLBIO-30. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://www.medicalexpo.com/prod/knik-co-ltd/product-298447-995305.html>
44. Реактор-змішувач BF-200LS [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/glass-reactor/jacketed-glass-reactor/chemglass-reactor.html>
45. Реактор-змішувач BSF-100L [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/100l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>
46. Інокулятор Techfors – 300L. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://infors-ht.com/getmedia/965fc4cc-3c3c-4b2f-b3b8-e409a6a76542/Product-Data-Sheet-Techfors-2-en-GB-1>
47. Реактор-змішувач 3000 л [Електронний ресурс] – режим доступу:  
<https://ua.mixermanufacture.com/mixing-tank/reactor/stainless-steel-jacketed-reactor.html>
48. Реактор-змішувач 630L. [Електронний ресурс] – режим доступу:  
[http://euromash.kiev.ua/ru/aparati\\_emal\\_mehanicheskim\\_perem\\_ustroystvom\\_ru.php](http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ru.php)
49. Fermenter-003 [Електронний ресурс] – режим доступу:  
[https://itbprmo.en.made-in-china.com/product/vdZTsxPwrDrR/China-Bacteria-Fermentor-for-Production-of-Antibiotics-3000-Liter-Fermenter.html?pv\\_id=1ijtv09ug276&faw\\_id=1ijtv9k0n981](https://itbprmo.en.made-in-china.com/product/vdZTsxPwrDrR/China-Bacteria-Fermentor-for-Production-of-Antibiotics-3000-Liter-Fermenter.html?pv_id=1ijtv09ug276&faw_id=1ijtv9k0n981)

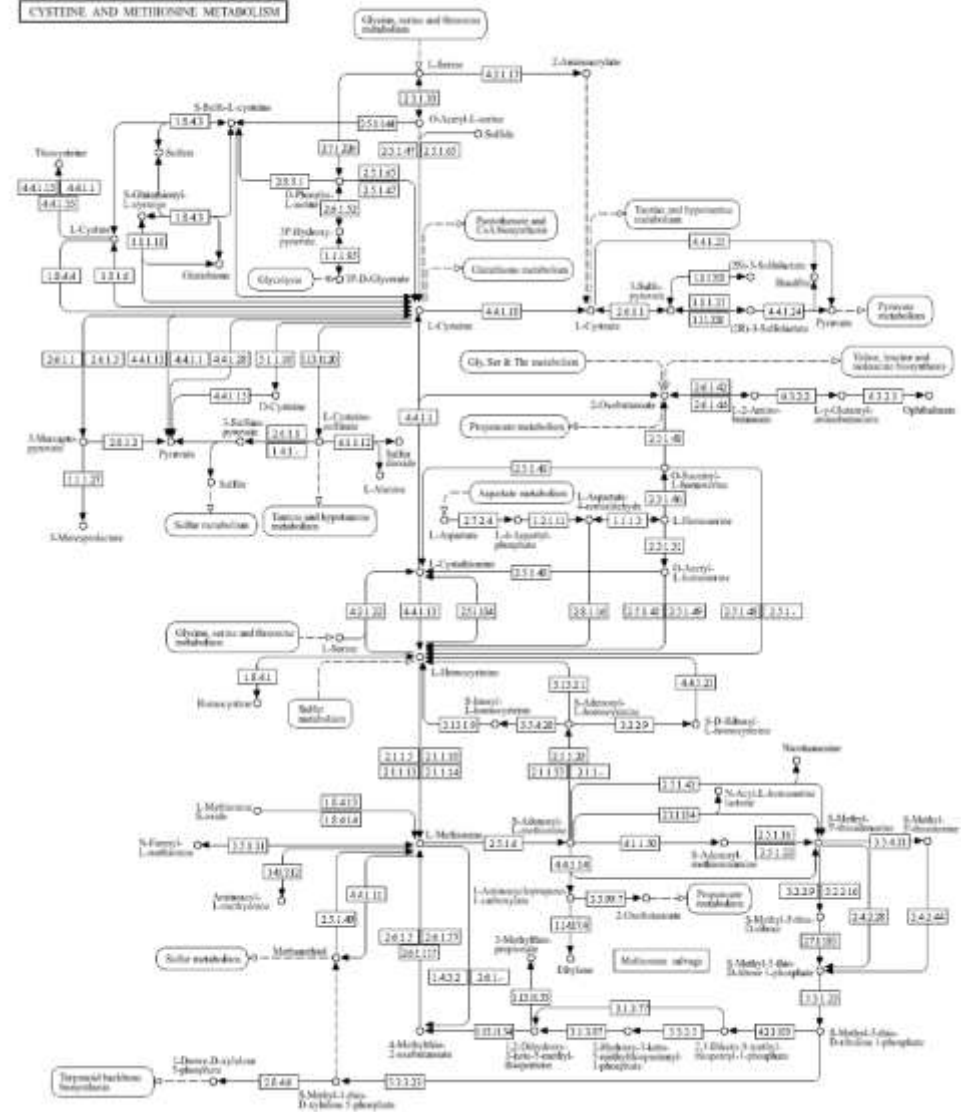
50. Відцентровий насос JETS100 [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://rs4u.com.ua/ua/p36538-jets100-nasos-vidcentrovij-nerzh-075kvt-qmax-50l-hv-h50m-tonasosy>
51. Реактор-змішувач BSF-5L [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ua.beifanequipment.com/chemical-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>
52. Відцентровий Насос WETRON (775021) [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://skvagina.com.ua/ua/poverhnostniy-nasos/775021.html>
53. Iulia Varzaru et al. "Development and Validation of an RP-HPLC Method for Methionine, Cystine and Lysine Separation and Determination in Corn Samples." *Revista de Chimie*, 2013. [Електронний ресурс] – режим доступу: <file:///C:/Users/Dell/Downloads/VARZARUI.pdf713.pdf>
54. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2005. – ст: 102-354.
55. Традиційні та біосенсорні методи визначення моносахаридів і дисахаридів. В.М. Пешкова, О.Я. Саяпіна, О.О. Солдаткін, С.В. Дзядевич. К.: наук. Журн. Т.3. №3/ НАН України. Київ 2010р. [Електронний ресурс] – Режим доступу: [https://elibrary.nuft.edu.ua/library/DocDescription?doc\\_id=357435](https://elibrary.nuft.edu.ua/library/DocDescription?doc_id=357435)
56. Визначення концентрації біомаси. [Електронний ресурс] – Режим доступу : <https://studfile.net/preview/5194349/page:18/>
57. Wang, G., Huang, L., Xu, S., Han, Y., Chen, J., Yan, Z., & Zheng, Y. (2019). Enhanced methionine production by methylotrophic *Escherichia coli* strains via improved homoserine O-acetyltransferase activity. *Biotechnology Letters*, 41(1), 115-122. [Електронний ресурс] – Режим доступу: DOI: 10.1007/s10529-018-2640-9
58. Matsui, K., & Kaneko, K. (2017). Advances in *Escherichia coli* Strains for High-Level Methionine Production. "Journal of Biotechnology", 244, 15-25. [Електронний ресурс] – Режим доступу: DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.01.003.

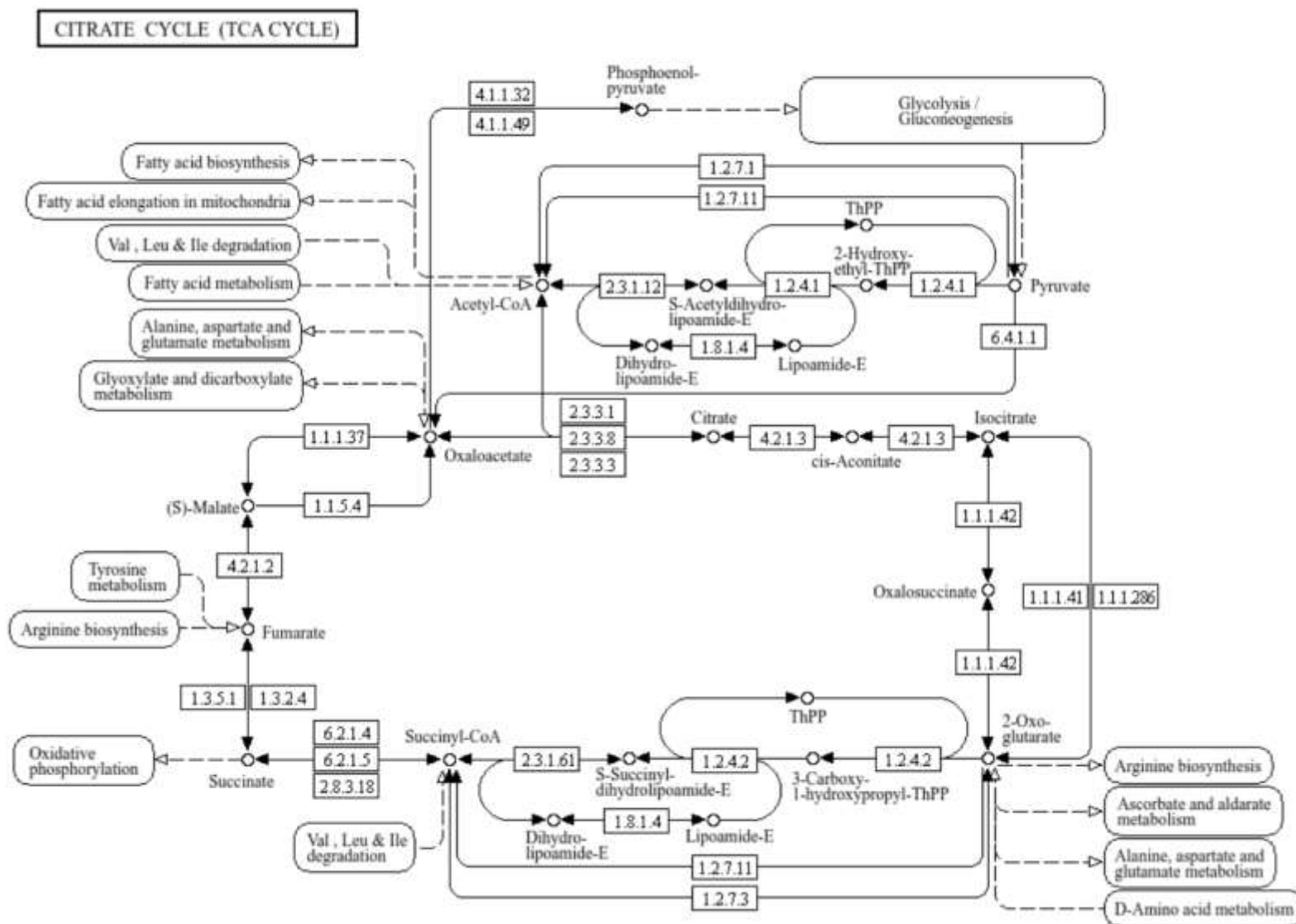
59. Система зворотного осмосу RO-7000 [Електронний ресурс] –Режим доступу:  
[https://prom.ua/ua/p2382778059-sistema-obratnogo-osmosa.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1\\_5297199152&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5ztAYAi4MQV7qBHf7WD\\_JAZL2TkImZy1dKhD8SQyzICn8a1ozHCld2xoCjggQAvD\\_BwE](https://prom.ua/ua/p2382778059-sistema-obratnogo-osmosa.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAqrG9BhAVEiwAaPu5ztAYAi4MQV7qBHf7WD_JAZL2TkImZy1dKhD8SQyzICn8a1ozHCld2xoCjggQAvD_BwE)
- 60.Красінько В.О. Природоохоронні біотехнології [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв. – проф. прогр. «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. - К: НУХТ, 2020. – 218 с.
- 61.Фільтр зливний (зворотної лінії) MP Filtri MPF 1811 [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://hydraulic.ua/filtr-zlivniy-zvorotnoi-linii-mp-filtri-mpf1811-mikrokarton-z-propitkou-10-mkm-280-l-khv/>
62. Скрубер моделі Spray Venturi Scrubbers. [Електронний ресурс] - Режим доступу:<https://www.acman-dustcollector.com/pid18439175/Venturi-Scrubber-Spray-Venturi-Scrubbers-Manufacturers-Venturi-Wet-Scrubber-Air-Pollution-Control.htm>
- 63.Позначки на пластику. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://solvetpv.lviv.ua/poznachky-na-plastyku-shho-potribno-znaty-koly-vy-kuuyete-vodu-v-plastykovij-plyashtsi/>
- 64.Заготівельно-виробниче приватне підприємство «Регіон-2001» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://region-2001.com.ua/services/pererobka-vtorsirovini/pererobka-smittyta-tavidkhodiv/pererobka-plastika>.

GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS



CYSTINE AND METHIONINE METABOLISM





## **L-Methionine Production by Double Auxotrophic Mutants of a Ethionine Resistant Strain of *Brevibacterium heali***

MONDAL, S., DAS, Y. B., CHATTERJEE, S. P.

Burdwan University  
Department of Botany  
Microbiology Laboratory  
Golapbag, Burdwan — 713 104 India

### **Summary**

A number of lysine plus threonine double auxotrophs have been isolated from a ethionine resistant methionine producing strain of *Brevibacterium heali* previously isolated from soil by mutagenesis with N-methyl N'-nitro-N-nitrosoguanidine in two steps. This strain excreted L-methionine in sufficient amounts. For the three potent mutants tested, the medium of ALFOLDI was judged to be the best. Biotin and ammonium nitrate were found to be optimal at 5 µg/l and at a 40 mM level, respectively. With such an optimal dose, the strain BhLT 27 yielded 25.5 g/l methionine in a flask culture containing methionine-analogue ethionine at a minimal inhibitory concentration.

### **Introduction**

Methionine is an essential amino acid which is required in the diet of man and other mammals for the normal growth and function of the body [1]. Production of methionine has been reported from auxotrophic or regulatory mutants of microorganisms such as *Escherichia coli* [2], *Pseudomonas* G-132-13, *P. xanthae*, *Torula lactis*, *Penicillium islandicum* [3], *Ustilago maydis* [4], *Salmonella typhimurium* [5], *Micrococcus glutamicus* [6], *Corynebacterium glutamicum* [7], *Serratia marcescens* [8], *Methylomonas* sp. [9], *Pseudomonas* sp. [10], and *Bacillus megaterium* [11]. The present paper deals with the isolation of double auxotrophs of *Brevibacterium heali* which have previously been treated as ethionine resistant mutants.

### **Materials and Methods**

#### *Isolation and Determination of the Organism*

The strain of *Brevibacterium heali* was previously isolated as a methionine overproducer from a soil sample, and the strain was treated as analogue, i.e. ethionine resistant mutant, and maintained on ALFOLDI's [12] agar slants with an MIC (minimal inhibitory concentration) of ethionine. The taxonomic identification has been done with the help of BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology [13] and the Genera of Bacteria [14].

#### *Growth and Cultivation of the Organism*

The microorganisms were cultivated in 20 ml medium taken in 100-ml ERLLENMEYER flasks on a rotary shaker at 30 °C. Growth was measured turbidimetrically in an EEL Photoelectric Colorimeter;

methionine excreted into the culture medium was quantitatively estimated by the colorimetric method [15], as well as by microbiological assay, using a methionine auxotroph. The mutants excreting methionine alone were confirmed by paper chromatography using an authentic sample of *L*-methionine. The unspent glucose in the culture medium was evaluated by the dinitrosalicylic acid method [16].

#### *Mutagenesis and Selection of Mutants*

Bacterial cells grown overnight on agar slants were harvested and washed two times with a sterile TRIS-maleate buffer (pH 6.0). A 0.2 ml solution containing 400/ $\mu$ g of N-methyl N'-nitro N-nitrosoguanidine (NTG) in a TRIS-maleate buffer was added to 0.8 ml of cell suspension ( $10^8$ /ml). The suspension was incubated at 37 °C for 30 minutes without shaking, and then 4.5 ml of ALFOLDI's broth supplemented with amino acids and an MIC of ethionine was added. After an incubation for 12 h at 30 °C on a rotary shaker, the cells were plated on ALFOLDI's agar medium supplemented with amino acid(s) and an MIC of ethionine. The plates were incubated at 37 °C until colonies appeared and replicated on complete as well as on minimal agar plates using the replica plating technique [17]. The colonies which failed to grow on minimal agar, but grew on complete agar, were selected provisionally as auxotrophs. Such colonies were picked up on agar slants, and their requirement was confirmed by comparing their growth on minimal and complete agar plates.

#### **Results and Discussion**

In the first step of mutation a few lysine and threonine single auxotrophs excreting methionine in different amounts were obtained. Among them a lysine auxotroph BhL-52 was found to be potent for methionine production. The lysine auxotroph BhL-52 was then treated with NTG in the same way as before. As a result, a further series of auxotrophs were isolated with the double requirements of lysine plus threonine. Among these strains only three strains namely BhLT 15, BhLT 20, BhLT 27 were selected as potent methionine excretors for further investigation.

#### *Suitability of Different Media for Growth and Methionine Production by the Mutants*

In order to find a suitable basal medium for methionine production, mineral-salts media of ALFOLDI [18], DAVIS and MINGIOLI [19], TANAKA [20], TOKORO [21], and ROBINSON [22] with an MIC of ethionine were tested. The strains were found to grow and produce methionine in all the five mineral salt media with glucose as the carbon source and the MIC of ethionine as the analogue resistant. For all these strains, the medium of ALFOLDI [18] was judged to be the best for methionine production. In order of presence, the medium of TANAKA [20] and TOKORO [21] came next. The medium of DAVIS and MINGIOLIS [19] and ROBINSON [22] were found not very suitable for methionine production by the mutants. On the basis of these results, the medium of ALFOLDI [18] was selected as the basal medium for further fermentations. The yield in an industrial fermentation largely depends on the formulation of a medium composition [23], particularly the carbon and nitrogen sources. The results obtained, however, strongly corroborates with the above generalization.

#### *Effect of Different Levels of Biotin on Growth and Methionine Production*

As the strains were natural auxotrophs of biotin, the suitability of different levels of biotin for growth and methionine production by these mutants was tested. From Tab. 2, it was found that all the mutants failed to grow and produce methionine in the absence of biotin. A gradual increase in the level of biotin in the medium stimulated growth and methionine production. Methionine production was optimal at the level of 5  $\mu$ g/l biotin. Above this concentration, in the growth of the strains, though stimulated, methionine production was hampered. This observation is similar to the observation of BANIK and MAJUMDAR [24]

Tab. 1. Growth and methionine production in different synthetic media

Strain No.	Media <sup>c</sup>									
	ALFOLDI [18]		TANAKA [20]		TOKORO [21]		DAVIS and MINGIOLI [19]		ROBINSON [22]	
	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>
BhLT 15	5.2	12.0	3.2	4.5	2.8	3.0	2.0	1.1	1.5	2.2
BhLT 20	6.0	15.0	2.8	4.0	3.0	2.5	2.1	2.1	1.8	3.2
BhLT 27	6.5	17.0	3.0	4.2	3.2	3.0	1.8	3.1	1.3	3.5

a = O.D. [in EEL units] after 48 h

b = culture filtrate [g/l]

c = glucose (4%) as a carbon source

Tab. 2. Effect of different levels of biotin on growth and methionine production by the double auxotroph

Concentration of biotin [ $\mu\text{g/l}$ ]	Strain No.					
	BhLT 15		BhLT 20		BhLT 27	
	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>
0	1.2	0	1.5	0.02	1.3	0.02
0.05	2.0	3.0	4.0	5.0	4.0	8.0
0.1	3.0	5.0	5.1	8.0	5.0	10.0
1.0	5.2	10.5	5.5	12.0	5.5	15.0
5.0	6.9	15.0	6.2	18.0	6.5	20.0
10.5	8.0	12.0	6.8	13.0	7.0	12.0
25.0	8.5	9.0	7.8	9.0	7.4	7.0
50.0	9.0	Nil	8.5	Nil	7.8	Nil

a = growth, O.D. [in EEL units] after 48 h

b = methionine [g/l]

who reported on a maximum methionine production by an auxotrophic mutant of *Micrococcus glutamicus* at a biotin level suboptimal for growth. A further increase in the biotin level stimulated growth, but not methionine production. From the results in the table given above, it was also found that at a biotin concentration above 25  $\mu\text{g/l}$ , methionine was not produced at all. The exact role of biotin in the amino acid production by microorganisms is not clear. While TANAKA *et al.* [25] believed that biotin functions by limiting growth and allowing the carbon and nitrogen sources to the formation of amino acids rather than to the synthesis of cell matter, SHIIO *et al.* [26], VELDKAMP *et al.* [27] and OTSUKA *et al.* [28] believed that a low biotin concentration makes the bacterial cells more permeable resulting in a higher leaching out of amino acids into the surrounding medium.

#### Suitability of Different N Sources

Among the different nitrogen sources tested (Tab. 3) for growth and methionine production, ammonium nitrate was the most suitable for methionine production.

Tab. 3. Suitability of different N sources for growth and methionine production

N <sub>2</sub> sources <sup>c</sup>	Strain No.					
	BhLT 15		BhLT 20		BhLT 27	
	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>
Ammonium chloride	3.5	15.0	3.8	17.0	4.2	15.5
Ammonium nitrate	5.7	19.0	4.9	21.0	6.7	22.5
Ammonium sulphate	4.0	12.0	6.0	15.0	5.5	17.3
Asparagine	6.0	5.0	5.5	10.2	6.0	15.0
Potassium nitrate	5.3	3.0	4.8	5.5	5.2	6.9
Urea	4.4	Nil	5.0	Nil	4.8	Nil

a = growth, O.D. [in EEL units] after 48 h

b = methionine [g/l]

c = N level, 20 mM each

Tab. 4. Influence of the different levels of the selected N sources on growth and methionine production

Concentration of ammonium nitrate in mM level	Strain No.					
	BhLT 15		BhLT 20		BhLT 27	
	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Methionine <sup>b</sup>
10	2.5	15.0	2.7	17.0	3.5	17.5
20	6.3	19.0	6.2	21.0	4.5	22.5
40	6.6	22.0	6.9	24.0	6.8	25.5
60	6.9	20.0	7.0	20.0	7.2	15.5
80	7.2	15.0	7.2	10.5	7.5	12.0
100	7.5	5.0	8.0	6.0	8.0	5.0

a = growth, O.D. [in EEL units] after 48 h

b = methionine [g/l]

In order to find out the optimum concentration of the selected nitrogen sources, ammonium nitrate was tested at different levels. From Tab. 4, it can be seen that ammonium nitrate at a 40 mM level was optimal for the methionine production by all the mutants. A further increase in the level of nitrogen sources in the medium did not inhibit growth, methionine production was adversely affected.

The ammonium salts are preferable for methionine production over other nitrogen sources. This was reported earlier with *M. glutamicus* [6], *Corynebacterium glutamicum* [7], *Methylomonas* sp. [8], and *Serratia marcescens* [9].

#### Acknowledgement

The authors are thankful to CSIR (India) for giving financial support to this work.

Received 15 April 1993

#### References

- [1] ROSE, W. C.: The Nutritive Significance of the Amino Acids. *Physiol. Rev.* **18** (1938), 109–136.
- [2] ADELEBERG, E. A.: Selection of Bacterial Mutants which Excrete Antagonists of Antimetabolites. *J. Bacteriol.* **76** (1958), 326–328.
- [3] French Pat. 1, 331, 847, Sumitomo Chem. Co., 1963.
- [4] DULANEY, E. L.: Microbial Production of Amino Acids in Microbial Technology. H. J. PEPPLER (Ed.), New York: Reinhold Publishing Corporation, 1967, 308–343.
- [5] LAWRENCE, D. A., SMITH, D. A.: Regulation of Methionine Synthesis in *Salmonella typhimurium* Mutants Resistant to Inhibition by Analogues of Methionine. *Genetics* **58** (1968), 473–492.
- [6] BANIK, A. K., MAJUMDER, S. K.: Effect of Minerals on the Production of Methionine by *Micrococcus glutamicus*. *Indian J. Exp. Biol.* **13** (1975), 510–512.
- [7] KASE, H., NAKAYAMA, K.: L-Methionine Production by Methionine Analogue-Resistant Mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **39** (1975) 1, 153–160.
- [8] GHOSH, B. B., BANERJEE, A. K.: Production of Methionine and Glutamic Acid from n-Alkanes by *Serratia marcescens* var. *kiliensis*. *Folia Microbiol.* **31** (1986), 106–112.
- [9] YAMADA, H., MORINAGA, Y., TANI, Y.: L-Methionine Overproduction by Ethionine Resistant Mutants of Obligate Methyotroph Strain OM 33. *Agric. Biol. Chem.* **46** (1982), 47–55.
- [10] MORINAGA, Y., TANI, Y., YAMADA, H.: L-Methionine Production by Ethionine-Resistant Mutants of a Facultative Methyotroph of *Pseudomonas* FM 518. *Agric. Biol. Chem.* **46** (1982), 473–480.

- [11] ROY, S. K., MISHRA, A. K., NANDA, G.: Extracellular Production of *L*-Methionine by *Bacillus megaterium* B71 Isolated from Soil. *Curr. Sci.* **53** (1984), 1296–1297.
- [12] ALFOLDI, L.: La production induite de methionine sur milieu synthetique. *Annals de l'Institute Pasteur* **94** (1958), 474.
- [13] BUCHANON, R. E., GIBBON, N. E. (editors): *BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology*. (Williams & Wilkins Company Baltimore, U.S.A.). 8th edition, 1974, 625–628.
- [14] SKERMANN, V. B. D.: *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria* (Williams' and Wilkins Co., Baltimore, Maryland), 1959, 103–104.
- [15] WORK, Elizabeth: Reaction of Ninhydrin in Acid Solution with Straight Chain Amino Acids Containing two Amino Groups and its Application to the Estimation of  $\alpha$ -*c*-Diamino Pimelic Acid. *Biochem. J.* **67** (1957), 416–423.
- [16] BERNFELD, P.: Amylase,  $\alpha$ - $\beta$ . *Methods in Enzymology*. Vol. 1. (Eds. S. P. COLOWICK, N. P. KAPLAN). New York: Academic Press, 1955, 149–158.
- [17] LEDERBERG, J., LEDERBERG, E. M.: Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants. *J. Bacteriol.* **63** (1952), 399–406.
- [18] DAVIS, B. D., MINGIOLI, E. S.: Mutants of *Escherichia coli* Requiring Methionine or Vit. B. *J. Bacteriol.* **60** (1950), 17–28.
- [19] TANAKA, K., KIMURA, K.: Can. Pat. No. 777130, 1968.
- [20] TOKORO, Y., OSHIMA, K., TANAKA, K., KINOSHITA, S.: Production of Amino Acids from Hydrocarbon. *Amino Acids. Nucleic Acids* **19** (1969), 115–119.
- [21] ROBINSON, D. S.: Oxidation of Selected Alkanes and Related Compounds by a *Pseudomonas* Strain. *Antonie van Leeuwenhoek* **30** (1974), 303–316.
- [22] BANIK, A. K., MAJUMDAR, S. K.: Studies on Methionine Fermentation: Part I – Selection of Mutants of *Micrococcus glutamicus* and Optimum Conditions for Methionine Production. *Ind. J. Exp. Biol.* **12** (1974) 4, 363–365.
- [23] TANAKA, M., IWASAKI, H., KINOSHITA, S.: *L*-Glutamic Acid Fermentation V. Biotin and *l*-Glutamic Acid Accumulation by Bacteria. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **34** (1960b), 593–600.
- [24] SHIIO, I., OTSUKA, S., TAKAHASHI, M.: Effect of Biotin on the Bacterial Formation of Glutamic Acid. I. Glutamate Formation and Cellular Permeability of Amino Acids. *J. Biochem. (Tokyo)* **51** (1962), 56–62.
- [25] VELDKAMP, H., VAN DEN BERG, G., ZEVENHUIZEN, L. P. T. M.: Glutamic Acid Production by *Arthrobacter globiformis*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **29** (1963), 35–51.
- [26] OTSUKA, S., MIYAJIMA, R., SHIIO, I.: Comparative Studies on the Mechanism of Microbial Glutamate Formation. II. Effect of Biotin. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1** (1965), 295–301.

## MUTANTS OF *ESCHERICHIA COLI* REQUIRING METHIONINE OR VITAMIN B<sub>12</sub>

BERNARD D. DAVIS AND ELIZABETH S. MINGIOLI

*U. S. Public Health Service, Tuberculosis Research Laboratory, Cornell University  
Medical College, New York 21, N. Y.*

Received for publication March 27, 1950

The penicillin method (Davis, 1948; Lederberg and Zinder, 1948) has permitted convenient isolation of auxotrophic<sup>1</sup> mutants of *Escherichia coli* with specific growth requirements for most of the known water-soluble vitamins, as well as amino acids, purines, and pyrimidines. Accordingly, when crystalline vitamin B<sub>12</sub> became available, a search was made for mutants requiring this nutrilit. Several strains of the desired type were promptly recovered. In all cases methionine, but not homocysteine, could be substituted for the vitamin. This paper describes certain biochemical properties of these mutants, as well as of others responding to methionine but not to B<sub>12</sub>.

### EXPERIMENTAL RESULTS

*Methods.* The mutants were isolated by the penicillin method (Davis, 1949) from the W strain of *E. coli* (ATCC 9637) following ultraviolet irradiation. The minimal medium, improved over that previously reported (Davis, 1949), had the following composition: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0; Na<sub>2</sub>-citrate·3H<sub>2</sub>O, 0.5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0; glucose (autoclaved separately), 2; H<sub>2</sub>O, 1,000; pH 7.0. Solid media contained Difco agar<sup>2</sup> 1.5 per cent. Cultures were incubated at 37 C.

*Response to methionine and homocysteine.* By the use of minimal medium supplemented with 10 mμg per ml of vitamin B<sub>12</sub>, three B<sub>12</sub>-requiring strains were obtained in one experiment. They were all found to grow rapidly on methionine, but not on homocysteine, the known precursor of methionine in *E. coli* (Lampen *et al.*, 1947b; Simmonds, 1948) as well as in *Neurospora* (Horowitz, 1947). This response led to the testing of a number of previously isolated methionine auxotrophs for their response to B<sub>12</sub>.

The results are presented in table 1. The mutants blocked before homocysteine did not respond to B<sub>12</sub>, whereas, with one exception, those blocked between homocysteine and methionine did respond to B<sub>12</sub>. The exception, 137-113, showed no perceptible growth on B<sub>12</sub> alone, even after 3 days of incubation on solid medium, but its growth on a limited amount of methionine was definitely increased by B<sub>12</sub>, suggesting a very limited ability to use B<sub>12</sub>.

<sup>1</sup> The terms "auxotrophic" (Lat. *auxilium* = "aid"; Gr. *troph* = "food") and the corresponding noun "auxotroph" are suggested for convenience in denoting biochemical mutants with increased nutritional requirements.

<sup>2</sup> Commercial agar contains traces of a factor, presumably B<sub>12</sub>, which supports slight growth of the B<sub>12</sub>/methionine, but not the homocystine/methionine, auxotrophs. When necessary for the purposes of the experiment, this impurity was removed by successive washing with 50 and 95 per cent ethanol.