

**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) (ім'я та прізвище)

«До захисту допущено»  
Завідувач кафедри  
Віктор СТАБНІКОВ  
(підпис) (ім'я та прізвище)

«\_\_» червня 2022 р.

«\_\_» червня 2022 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: Одержання метіоніну культивуванням  
*Corynebacterium glutamicum*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

ФІЛЬ Ірина Андріївна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище) (підпис)

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище) (підпис)

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Олена СЕМЕНОВА  
(ім'я та прізвище) (підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) незарядженої допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ - 2022 р.

# 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 СТАБНІКОВ  
“ 04 ” квітня 20 22 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ФІЛЬ Ірини Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання метіоніну культивуванням  
*Corynebacterium glutamicum*

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Corynebacterium glutamicum*,  
цільовий продукт: метіонін,  
концентрація цільового продукту: 96 г/л

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування  
вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-  
економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору допоміжних  
стадій. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної  
схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу  
Технологічна схема виробництва метіоніну – 1 аркуш (А2)  
Апаратурна схема виробництва метіоніну – 1 аркуш формату (А2)

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_ 04 квітня 2022 року \_\_\_\_\_

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика метіоніну	05.04 – 13.04	
2	Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	14.04 – 24.04	
3	Техніко-економічне обґрунтування	25.04 – 04.05	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	05.05 – 15.05	
5	Специфікація обладнання	16.05 – 22.05	
6	Контроль виробництва	23.05 – 01.06	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**ФІЛЬ Ірина** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

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

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

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	6
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА .....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування .....	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента .....	18
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	19
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	21
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера .....	23
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу .....	24
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ.....	29
4.1. Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу .....	29
4.1.1. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій.....	31
4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря.....	33
4.1.3. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень та вибору мийних та дезінфікуючих засобів.....	35
4.1.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища .....	40

					НУХТ БТЕК 04.01.23 КР ПЗ			
					ЗМІСТ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Філь І.А.</i>					4	89
<i>Керівник</i>		<i>Сулейко Т.Л.</i>						
<i>Рецензент</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
<b>Кафедра БТМ<sub>4</sub></b>								

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	44
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	48
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА .....	69
7.1. Мікробіологічний контроль .....	69
7.2. Ідентифікація та визначення концентрації цільового продукту .....	70
7.2.1. Ідентифікація метіоніну.. .....	71
7.2.2. Визначення кількості метіоніну.....	72
7.2.3. Визначення амінного азоту мідним способом.. .....	73
7.2.4. Визначення джерела вуглецю .....	76
7.2.5. Визначення концентрації азоту.....	75
7.3. Карта постадійного контролю біосинтезу метіоніну .....	77
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ .....	86

## РЕФЕРАТ

Даний дипломний проект присвячений розробці біотехнологічного виробництва метіоніну у вигляді порошку культивуванням бактерії *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, який на середовищі з глюкозою та додатковому підживленні глюкозою і сульфатом амонію продукує 96 г/л цільового продукту.

Метіонін це незамінна амінокислота яка має важливу роль для обміну речовин та синтезі біологічно активних речовин. В дипломному проекті описано використання метіоніну, як діючої речовини в таблетках препарату “Метіонін”.

Технологія виробництва цільового продукту складається з допоміжних робіт (підготовка персоналу, приготуванні мийно-дезинфікуючих розчинів, підготовці аераційного повітря, перевірці обладнання, приготуванні та стерилізації поживного середовища та допоміжних розчинів) та технологічних процесів (виращуванні інокуляту/посівного матеріалу в колбах на качалках та інокуляторах, виробничому біосинтезі та виділенні і очистці метіоніну, що складається з нагрівання, центрифугування, кристалізації, іонообмінної хроматографії, другої кристалізації та сушці) дані процеси наведені в апаратурних та технологічних схемах.

Дипломний проект викладений на 89 сторінках друкованого тексту, містить 12 таблиць, 5 рисунків і складається з вступу, 7 розділів, графічної частини (2 креслень формату А2) та списку використаної літератури (32 джерел).

**Ключові слова:** метіонін, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, виробничій біосинтез, виділення, таблетки, амінокислота.

					НУХТ БТЕК 04.01.23 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Філь І.А.				Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Сулейко Т.Л.					6	89
Рецензент					Кафедра БТМ <sub>6</sub>		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

## ВСТУП

Біотехнологія (від грецької. *bios* - життя, *techne* - мистецтво, майстерність і *logos* - слово, навчання), використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві. Біотехнологія - міждисциплінарна галузь, що виникла на стику біологічних, хімічних і технічних наук. С розвитком біотехнології пов'язують вирішення глобальних проблем людства – ліквідацію недостачі продовольства, енергії, мінеральних ресурсів, поліпшення стану охорони здоров'я і якості навколишнього середовища.

Біотехнологія – це комплекс фундаментальних і прикладних наук, технічних засобів, спрямованих на одержання і використання клітин мікроорганізмів, тварин і рослин, а також продуктів їх життєдіяльності: ферментів, амінокислот, вітамінів, антибіотиків та ін.

Біотехнологія, яка включає промислову мікробіологію, базується на використанні знань і методів біохімії, мікробіології, генетики і хімічної технології, що дає змогу діставати користь у технологічних процесах із властивостей мікроорганізмів та клітинних культур. Що стосується більш сучасних біотехнологічних процесів, то вони базуються на методах рекомбінантних ДНК, а також на використанні іммобілізованих ферментів, клітин і клітинних органел [1].

Лідером у застосуванні біотехнології та проведенні біотехнологічних наукових досліджень є США. Так, за даними маркетингової фірми *Burgill & Company*, у 2008 році фармацевтичними та біотехнологічними компаніями Сполучених Штатів на наукові дослідження загалом спрямовано рекордну суму коштів – 65,2 млрд. дол. (на 2 млрд. дол. більше, ніж у 2007 році), з яких 50,3 млрд. дол. (77,1%) - фармацевтичними, 14,9 млрд. дол. (22,9%) – біотехнологічними компаніями.

					НУХТ БТЕК 04.01.23 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	ВСТУП	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Філь І.А.</i>					7	89
<i>Керівник</i>		<i>Сулейко Т.Л.</i>						
<i>Рецензент</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>			Кафедра БТМ <sub>7</sub>			

Потужними виробниками біотехнологічних продуктів є також Японія (7 млрд. дол. США), Канада (3 млрд. дол. США), Європейський Союз (15 млрд. дол. США). На сьогодні біотехнологія з рядової галузі стала системотворчим фактором розвитку економіки окремих держав і світової економіки в цілому. З'явився спеціальний термін, що визначає цей феномен – біоекономіка та сфера біоекономіки, заснована на відповідних знаннях.

В Україні, як свідчить вітчизняний досвід, рівень розвитку біотехнології порівняно зі світовим, є невисоким. За оцінками експертів, обсяг виробництва українського сектору біотехнології на сьогодні не перевищує 20 млн. дол. США. Так, у фармацевтичній промисловості частка вітчизняного виробництва на ринку імунобіотехнологічних препаратів становить лише 9%, а сектор промислової біотехнології розвинутий ще менше. На українському ринку лікарських засобів сьогодні переважають імпорتنі пробіотики, і частка продукції зарубіжних фірм становить понад 70%. Водночас в Україні функціонують підприємства, які на сьогодні є успішними та перспективними у виробництві біофармацевтичних препаратів, зокрема, ПАТ НВЦ "Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод" (м. Київ), ТОВ "Біофарма" (м. Київ), ПАТ "Фармак" (м. Київ), ПАТ "Біолік" (м. Харків), ПАТ "Лекхім" (м. Харків), ВАТ "Дніпрофарм" (м. Дніпропетровськ), ТОВ "Біостимулятор" (м. Одеса) [2].

Метою даної роботи є проектування ділянки виробництва амінокислоти метіоніну мікроорганізмом *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 у вигляді порошку та його пакуванні у профольговані пакети.

**Актуальність теми:** станом на сьогоднішній день в Україні велика кількість хворих на різні захворювання печінки, які потребують "Метіонін" для профілактики таких захворювань як токсичний гепатит, алкогольна гепатопатія, цироз печінки та ін. Також маючи на увазі те що більшість амінокислот в Україні купують з за кордону буде актуальним створити підприємство по біосинтезу не тільки метіоніну, а й ряд інших амінокислот.



**Новизна:** використання біосинтезу для отримання амінокислот буде досить доцільним враховуючи, що більшість амінокислот добувають шляхом хімічного синтезу, що ускладнює очистку цільового продукту. Також під час хімічного синтезу використовуються токсичні речовини, що ускладнює процес роботи з ними. Запропонований процес отримання амінокислоти, а саме метіоніну шляхом біосинтезом є відносно простим процесом, як і очищення культуральної рідини для отримання цільового продукту.

## РОЗДІЛ 1.

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Метіонін - аліфатична сірковмісна  $\alpha$ -амінокислота, безбарвні кристали зі специфічним неприємним запахом, розчинні у воді, входить в число незамінних амінокислот. Міститься в багатьох білках і пептидах (метіонін-енкефалінів, метіонін-окситоцин). Значна кількість метіоніну міститься в казеїні.

Метіонін також служить в організмі донором метильних груп (в складі S-аденозил-метіоніну) при біосинтезі холіну, адреналіну і ін., А також джерелом сірки при біосинтезі цистеїну [3].

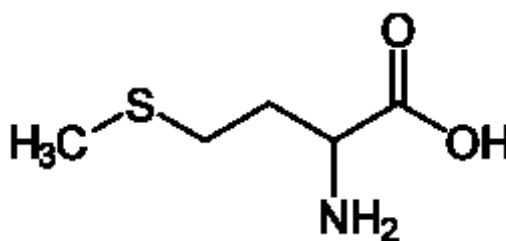


Рис.1.1 Структурна формула метіоніну

#### Хімічні властивості

Метіонін за своїми властивостями є типовою аліфатичною амінокислотою, метилсульфідний фрагмент при відновленні червоним фосфором в йодистоводородній кислоті деметилується з утворенням гомоцистеїну; в м'яких умовах окислюється до метіонінсульфоксида, під дією перекису водню, хлорної кислоти і інших сильних окислювачів - до відповідного сульфону [4].

					НУХТ БТЕК 04.01.23 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акруїв
Розробив	Філь І.А.						10	89
Керівник	Сулейко Т.Л.					Кафедра БТМ		
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.				10			

## **Метіонін і його дія на організм**

Фармакологічний препарат метіоніну спричинює ліпотропну дію, підвищує синтез холіну, лецитину та інших фосфоліпідів, в деякій мірі сприяє зниженню вмісту холестерину в крові і поліпшенню співвідношення фосфоліпідів/холестерину, зменшує відкладення нейтрального жиру в печінці і поліпшує функції печінки, може надавати помірне антидепресивну дію ( мабуть, за рахунок впливу на біосинтез адреналіну) [4].

### **Фізичні властивості**

Метіонін являє собою білі листоподібні кристали з неприємним запахом, легко розчинні в холодній воді, в гарячому розбавленому етиловому спирті; нерозчинні в спирті, діетиловому ефірі, петролейному ефірі, бензолі, ацетоні. Плавиться з розкладанням при температурі 280 - 282 ° С.

### **Біологічна роль**

Особлива біологічна роль амінокислоти метіоніну в обміні речовин пов'язана з тим, що вона містить рухливу метильну (-CH<sub>3</sub>) групу, яка передається на інші сполуки.

Метіонін відіграє винятково важливу роль в обміні речовин і в процесах метилювання і трансметилювання.

Для нормального функціонування систем організму досить вживання в їжу продуктів багатих вітаміном В<sub>12</sub>, вітаміном В<sub>6</sub>, фолієву кислоту, тому що вони необхідні для перетворення гомоцистеїну в метіонін.

Також метіонін відіграє важливу роль у функції надниркових залоз, він необхідний для синтезу адреналіну [4].

**РОЗДІЛ 2.**  
**ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА**  
**БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА**

**2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища**  
**для його культивування**

Серед представників бактерій відомі такі продуценти метіоніну:  
*Brevibacterium heali*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*.

Для порівняння візьмемо штами *Brevibacterium heali* LT 27,  
*Escherichia coli* 218 (ВКПМ В-8125), *Corynebacterium glutamicum* ATCC  
13032 (табл.2.1).

НУХТ БТЕК 04.01.23 КР ПЗ

Зм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Філь І.А.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Сулейко Т.Л.					12	89
Рецензент						12		
Н. Контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 2.1. Порівняльна характеристика продуцентів метіоніну

Продуцент	Склад поживного середовища г/л	Умови культивування	Конц. кінцевого продукту г/л	Література
<i>Escherichia coli</i> 218 (ВКПМ В-8125)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 170 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 30 NaCl - 5 NH <sub>4</sub> Cl - 10 MgSO <sub>4</sub> - 0,1 CaCl <sub>2</sub> - 0,01 Глюкоза - 40 Тіамін - 0,1	Температура 30-37°C Час культивування 50 год рН 7	7,2	[5,6,7]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 2 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 10 Глюкоза - 100 Дріжджовий екстракт - 5 Канаміцин - 20 мг/л MnSO <sub>4</sub> ·4-6·H <sub>2</sub> O - 0,01 г/л ZnSO <sub>4</sub> - 0,002 г/л FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O - 0,01 г/л MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O - 0,25 г/л Біотин - 0,000001 г/л Тіамін - 0,000001 г/л CaCl <sub>2</sub> - 0,000005 г/л	Температура 36 - 38°C Час культивування 160 год рН 7	96	[8,9]
<i>Brevibacterium heali</i> LT 27	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 2 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 10	Температура 30°C Час культивування 72 год	25,5	[9,10]

	Глюкоза - 100	pH 7		
	Дріжджовий екстракт - 5			
	Канаміцин - 20 мг/л			
	MnSO <sub>4</sub> ·6·H <sub>2</sub> O - 0,01 г/л			
	ZnSO <sub>4</sub> - 0,002 г/л			
	FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O - 0,01 г/л			
	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O - 0,25 г/л			
	Біотин - 0,000001 г/л			
	Тіамін - 0,000001 г/л			
	CaCl <sub>2</sub> - 0,000005 г/л			

Проаналізувавши данні види мікроорганізмів можна зробити висновок, що продуцент метіоніну *Corinebacterium glutamicum* ATCC 13032 є кращим у використанні за інші штами бактерій оскільки він продукує більше метіоніну над інші мікроорганізми, навіть маючи найбільший час культивування 160 год.

Для точного порівняння собівартості середовищ культивування продуцентів метіоніну зіставляється таблиця вартості компонентів середовища в розрахунку на 1 літр рідкого середовищ (табл.2.2)

Таблиця 2.2. Порівняння вартості середовищ для культивування продуцентів метіоніну

Біологічний агент	Компонент середовища г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Література
<i>Escherichia coli</i> 218 (ВКПМ В-8125)	Триптон - 10	104.57	10.475	[1,3,4]
	Дріжджовий екстракт - 5	84	0.42	
	20%-й розчин глюкози - 10	19.80	0.198	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 6	45	0.27	
	NH <sub>4</sub> Cl - 1	113.40	0.1134	
	NaCl - 0,5	0.75	0.000375	
	MgSO <sub>4</sub> - 2	8.08	0.01616	
	1М CaCl <sub>2</sub> - 0,1	11.90	0.00119	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 3	41.44	0.12432	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Глюкоза - 100	19.80	1.98	[1,2,3,4,]
	Дріжджовий екстракт - 5	84	0.42	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 2	41.44	0.082	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 2	16.8	0.0336	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 10	3.64	0.0364	
	Канаміцин-0,02	12.90 за 1г	0.258	
	MnSO <sub>4</sub> ·6·H <sub>2</sub> O - 0,01	209.68	2.0968	
	ZnSO <sub>4</sub> - 0,002	30	0.06	
	FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O - 0,01	1.9	0.019	
	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O - 0,25	9.53	2.3825	

	Біотин - 0,000001	792.3	0.0007923	
	Тіамін - 0,000001	428.2	0.0004282	
	CaCl <sub>2</sub> -0,000005	11,90	0.0000595	
<i>Brevibacterium heali LT 27</i>	Глюкоза - 100	19.80	1.98	[1,2,3,4,]
	Дріжджовий екстракт - 5	84	0.42	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 2	41.44	0.082	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 2	16.8	0.0336	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 10	3.64	0.0364	
	Канаміцин-0,02	12.90 за 1г	0.258	
	MnSO <sub>4</sub> ·6·H <sub>2</sub> O - 0,01	209.68	2.0968	
	ZnSO <sub>4</sub> - 0,002	30	0.06	
	FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O - 0,01	1.9	0.019	
	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O - 0,25	9.53	2.3825	
	Біотин - 0,000001	792.3	0.0007923	
	Тіамін - 0,000001	428.2	0.0004282	
	CaCl <sub>2</sub> -0,000005	11,90	0.0000595	

*Примітка 2.1* Ціни наведено станом на 2019 рік станом на 14 травня.  
Ціни переведені з долара в гривню до відповідного курсу станом на 2019 рік.

1. [www.systopt.com.ua](http://www.systopt.com.ua)
2. <http://tabletki.ua>
3. <http://russian.alibaba.com>
4. <http://prom.ua>



Таблиця 2.3 Умовна вартість 1 г цільового продукту метіоніну при культивуванні *E. coli* 218 (ВКПМ В-8125), *C. glutamicum* ATCC 13032, *B. heali* LT 27.

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація метіоніна, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год
<i>Escherichia coli</i> 218 (ВКПМ В-8125)	11.600445	7,2	1.6111	50
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	7,4267	96	0.07736	160
<i>Brevibacterium heali</i> LT 27	7,4267	25.5	0.2912431	72

*E. coli* 218 (ВКПМ В-8125) цей штам бактерій має найкоротший час культивування, що здешевлює вартість енергоносіїв на підтримання режиму культивування. Середовище напівсинтетичного складу, є досить простим, але в порівнянні з іншими продуцентами концентрація вихідного продукту є низькою 7,2 г/л, що робить цю бактерію не конкурентоспроможною в порівнянні з іншими бактеріями.

*B. heali* LT 27 даний штам використовує досить просте напівсинтетичне середовище яке має недорогу ціну, також із всіх представлених штамів має середній час культивування та середню концентрацію вихідного продукту.

*C. glutamicum* ATCC 13032 використовує напівсинтетичне середовище, яке є досить простим та дешевим, маючи найдовший час культивування та найбільшу концентрацію метіоніну при цьому використовуючи однакове ПС як для *B. heali* LT 2, використання даного штаму є економічно вигідним.

Отже, порівнявши три штами продуцента метіоніну можна зробити висновок, що використання *C. glutamicum* ATCC 13032 є найбільш економічно вигідним, оскільки він має найвигідніше співвідношення вартість

поживного середовища/вартість кількості метіоніну, та найбільший вихід метіоніну.

## 2.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Корінебактерії широко поширені в природі, в мікробіоті тварин (включаючи мікробіоту людини) і в основному є нешкідливими, найчастіше існують у співвідношенні зі своїми господарями. Деякі з них корисні в промислових умовах, таких як *C. glutamicum*. Інші можуть викликати захворювання людини, в тому числі особливо дифтерію, що викликається *C. diphtheriae*. *C. glutamicum* синтезує метіонін, що входить до складу білків, грає велику роль в процесах обміну речовин, відноситься до групи незамінних амінокислот [11].

Основні особливості роду *Corynebacterium* були описані в 1986 році. Вони є грампозитивними, неспороутворюючими, стрижневими бактеріями, які є прямими або злегка вигнутими. Їх розмір становить від 2 до 6 мкм в довжину і 0,5 мкм в діаметрі (рис 2.1). Бактерії групуються в “V” подібну форму. Вони також можуть виглядати еліптично. Вони аеробні або факультативно анаеробні, хемоорганотрофи. Вони є плеоморфними, зустрічаються в різній довжині, і часто мають потовщення в обох кінцях, залежно від оточуючих умов (рис 2.2) [11].

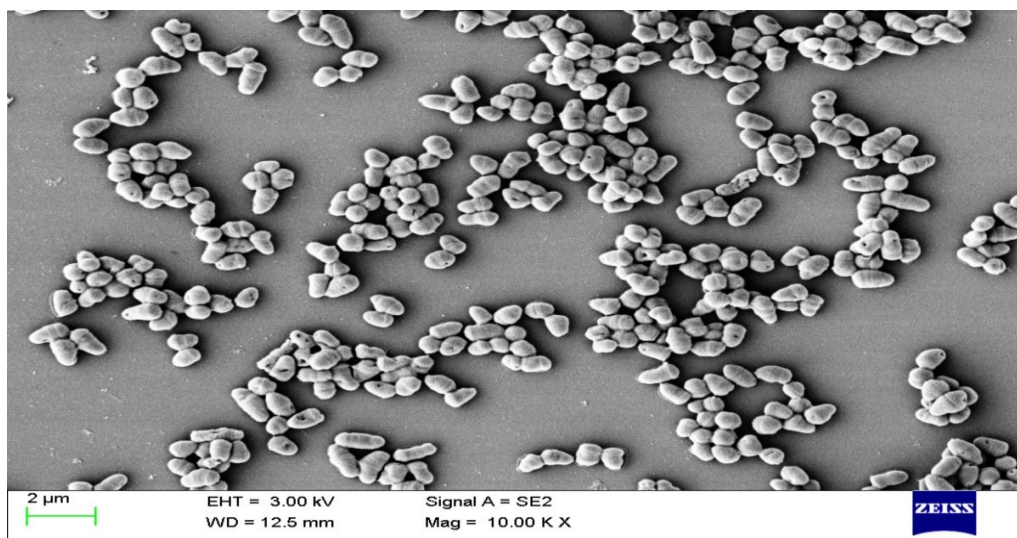


Рис.2.1. *C. glutamicum* під електронним мікроскопом [12].



Рис.2.2. *C. glutamicum* під мікроскопом [13].

Коринебактерії ростуть повільно, навіть на збагачених середовищах. З точки зору поживних потреб, всім потрібно біотин для росту. Деякі штами також потребують тіаміну. Бактерії ростуть у середовищі Loeffler, кров'яному агарі і триптиказному соєвому агарі (TSA). Вони утворюють дрібні, сіруваті колонії з зернистим виглядом, в основному напівпрозорими, але з непрозорими центрами, опуклими, з безперервними межами. Колір має тенденцію бути жовтувато-білим у середовищі Loeffler. У TSA вони можуть утворювати сірі колонії з чорними центрами і зубчастими межами, які схожі на квіти. Бактерії стійкі до низьких температур, однак чутливі до нагрівання. Зберігають чутливість до дезинфікуючих розчинів, (перекису водню, хлорвмісних сполук, карболової кислоти).

При кип'ятінні бактерії гинуть протягом 1 хвилини, в 10% розчині перекису водню - через 3 хвилини. [14]

### 2.3. Таксономічний статус біологічного агента

За класифікацією Бергі є представником відділу *Firmicutes*, *Corynebacterium* є грам позитивними, за несприятливих умов, клітини не утворюють спори. Рід *Corynebacterium* включає як патогенні, так і не патогенні види. [15],[16].

Розглянемо таксономічний статус *C. glutamicum* згідно з IX виданням Керівництва Бергі (фенотипова класифікація) та X виданням Керівництва Бергі (філогенетична класифікація):

Таксономічне положення бактерії згідно з IX виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій

Царство	<i>Procaryotae</i>
Відділ	<i>Firmicutes</i>
Королівство	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Actinobacteria</i>
Порядок	<i>Actinomycetales</i>
Підряд	<i>Corynebacterineae</i>
Сім'я	<i>Corynebacteriaceae</i>

Розглянемо таксономічний статус *C. glutamicum* згідно з X виданням Керівництва Бергі (філогенетична класифікація):

Відділ	<i>Firmicutes</i>
Королівство	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Actinobacteria</i>
Порядок	<i>Actinomycetales</i>
Підряд	<i>Corynebacterineae</i>
Сім'я	<i>Corynebacteriaceae</i>
Рід	<i>Corynebacterium</i>

Розглянувши дані таблиці, можна сказати, що особливого розмежування згідно з IX виданням Керівництва Бергі та X виданням Керівництва Бергі не виявлено. [15, 16].

## РОЗДІЛ 3.

### ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

#### 3.1. Потреба у цільовому продукті

Метіонін – важливе харчове з'єднання, що не синтезується в організмі, відноситься до групи незамінних амінокислот. Метіонін входить до складу білків, грає велику роль в процесах обміну речовин. Служить донором метильних груп при синтезі різноманітних біологічно активних речовин, прискорює загоєння ран. Метіонін є попередником цистеїну і таурину, так як має важливе значення при синтезі цих речовин. Крім того, відомий своїми антиоксидантними властивостями, що робить його відмінним захисником від вільних радикалів і токсинів. Амінокислота вступає в реакції з шкідливими речовинами, захищаючи клітини від руйнування, сприяє очищенню організму від токсинів і важких металів. При дефіциті цієї корисної речовини організм втрачає здатність до самоочищення, з'являються набряки, викликані зайвою рідиною в тканинах. Також часто програми лікування депресивних станів і хвороби Паркінсона містять рекомендації в прийомі більш високих доз метіоніну, який бере участь в метаболічних процесах в головному мозку. Сприяючи виробленню «гормону щастя» серотоніну, покращує настрій у хворих і робить їх більш активними. Підтримка адекватного рівня амінокислоти допомагає позбутися від перепадів настрою, тремтіння, неспокійного сну. Препарати на основі метіоніну використовують для лікування дегенеративних неврологічних захворювань.

					НУХТ БТЕК 04.01.23 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Філь І.А.</i>			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Сулейко Т.Л.</i>					21	89
<i>Рецензент</i>						<b>Кафедра БТМ</b> 21		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

### **Застосування:**

- захищає печінку від токсинів;
- підвищує кислотність сечі;
- позитивно впливає на імунітет;
- уповільнює накопичення зайвого жиру;
- сприяє загоєнню ран, запобігає хворобам шкіри і нігтів;
- ефективний в лікуванні депресії, алкоголізму, алергії, астми, хвороби

Паркінсона;

- полегшує детоксикацію при отруєннях міддю;
- сприяє виведенню наркотиків з організму;
- зменшує побічні ефекти від радіаційного опромінення;
- запобігає неправильному формуванню нервової системи у плода.

Метіонін так само широко застосовується в якості кормової добавки для худоби, так як є важливим харчовим з'єднанням, яке не синтезується в організмі. Метіонін виступає незамінною амінокислотою та грає важливу роль у процесах обміну речовин.[17]

### **3.2. Розрахунок потужності виробництва**

Станом на сьогоднішній день в Україні існує щонайменше один завод, який виготовляє “Метіонін” – ПАТ «Київський вітамінний завод», тобто для розрахунку потужності виробництва ми не будемо враховувати конкурента оскільки метіонін використовується як профілактичний засіб при лікуванні не тільки хвороб печінки, а й проблем з нервовою системою та імунітетом, також виключаємо імпорт, так як препарат не вивозиться за межі України.

Дана амінокислота виробляється за допомогою культивування бактерій роду *Corynebacterium*, то знаючи продукувальну здатність продуцента, можемо розрахувати кількість культуральної рідини, яку необхідно одержати, щоб забезпечити річну потребу для профілактики захворювань [6].

Оскільки метіонін використовується для профілактики таких захворювань як: токсичний гепатит, алкогольна гепатопатія, цироз печінки,

ми підраховали людей хворих на данні захворювання за станом на 2021 рік і ця цифра складає приблизно 1 291 430 чоловік. За інформацією в інструкції препарату Метіонін вказано курс лікування 28 днів по 4 таблетки в день з концентрацією метіоніну в одній таблетці 0,50 мг, ми можемо підраховати кількість метіоніну необхідну для курсу профілактики одного хворого:

$1\,291\,430 \times 0,1 = 129\,143$  – кількість людей потреби яких теоретично зможемо задовільнити.

Звідси ми можемо порахувати приблизну потребу в метіоніні для профілактики захворювань населенням України [7].

$129\,143 \times 4 \times 0,5 \times 28 = 7\,176\,000$  г (7 176 кг) – середній курс лікування та профілактики метіоніном на рік (з врахуванням втрат при виділенні).

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

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ( $T_{рд}$ ) 8, тоді кількість продукту на добу ( $V_d$ ) становитиме:

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 7176 / 8 = 897 \text{ л.}$$

Кількість продукту за цикл:

$$V_{ц} = (V_d \times T_{цф}) / 24 = (897 \times 184) / 24 = 6\,877 \text{ л/цикл,}$$

де  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (160 год) та час підготовки ферментера до роботи (24 год).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (5 год), перевірка на герметичність (10 год), стерилізація (2 год), охолодження (2 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (2 год).

Кількість циклів становить:

$$N_{\text{ц}} = 7\,176 / 897 \approx 8 \text{ цикл.}$$

Кількість культуральної рідини що зливається за ферментаційний цикл:

$$V_{\text{кр}} = K_1 \cdot G_{\text{цк}} \cdot \text{CP}_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} \cdot (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 897 \cdot 0,95 / 96 \cdot (1 - 0,15) = 11,49 \text{ м}^3 \text{ для полегшення розрахунків приймаємо } (11,5 \text{ м}^3)$$

Такий об'єм культуральної рідини можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 11\,500 / 0,6 = 19\,167 \text{ л} \approx 20 \text{ м}^3,$$

де  $K_{\text{зап}}$  — коефіцієнт заповнення ферментера.

У додатку 4 знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер  $V_{\text{гф}} = 20 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення  $K_{\text{зап}} = V_{\text{ф}} / V_{\text{гф}} = 11\,500 / 20\,000 = 0,57$ , що не перевищує заданого значення (0,5 – 0,75).

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують  $V_{\text{кр}} = 11\,500$  л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Надалі для розрахунків будемо брати 10% втрат.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 11\,500 / (1 - 0,1) = 12\,778 \text{ л,}$$

де  $E_{\text{ф}}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{\text{роб.1}} = 12\,778$  л.

Розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{\text{ф}}$ ), що становить:



$$V_{\phi 1} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 12\,778 / 0,7 = 18\,255 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 20 \text{ м}^3$  (див. додаток 4), уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення  $K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 12\,778 / 20\,000 = 0,63$ .

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,5 – 0,75.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\phi}) = 12\,778 / (1 + 0,1) = 11\,617 \text{ л,}$$

де  $X_{\phi} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 12\,778 - 11\,617 = 1\,161 \text{ л.}$$

Для одержання 1 161 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 1\,161 / (1 - 0,1) = 1\,290 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 1\,290 / (1 + 0,1) = 1\,173 \text{ л,}$$

де  $X_{\text{па}} = 0,1$  – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 1\,290 - 1\,173 = 117 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{роб.2} = 1290$  л можна одержати під час культивування продуцента у посівному апараті об'ємом:

$$V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 1290 / 0,7 = 1843 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 2 \text{ м}^3$  (див. додаток 4), уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення

$$K_{32} = V_{роб.2} / V_{сф} = 1290 / 2000 = 0,64.$$

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,5 – 0,75.

Для одержання 117 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 117 / (1 - 0,1) = 130 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить 10% від об'єму поживного середовища в інокуляторі. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 130 / (1 + 0,1) = 119 \text{ л,}$$

де  $X_{ін} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 130 - 119 = 12 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту можна одержати під час культивування продуцента в інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 130 / 0,7 = 186 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 0,25 \text{ м}^3$  (див. додаток 4), уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення

$$K_{33} = V_{роб.3} / V_{сф} = 130 / 250 = 0,52.$$

Для одержання 11 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{м.ін}}) = 12 / (1 - 0,1) = 13,3 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу для малого інокулятора становить 10% від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі. Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{м.ін}}) = 13,3 / (1 + 0,1) = 12 \text{ л,}$$

де  $X_{\text{м.ін}} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для малого інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 13,3 - 12 = 1,3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{\text{роб.4}} = 13$  можна одержати під час культивування продуцента в малому інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{\text{ін4}} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап}} = 13 / 0,7 = 19 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 20$  л (див. додаток 4), уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{з4}} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{сф}} = 13 / 20 = 0,65.$$

Отриманий коефіцієнт заповнення входить у задані межі 0,5 – 0,75

Для засіву інокулятора на 20 л необхідно приготувати 1 л посівного матеріалу. Його ми будемо готувати в колбах 0,750 мл на качалках з  $K_{\text{зп}} = 0,2-0,3$ .

$$V_{\text{роб.5}} = 0,750 \times 0,2 = 150 \text{ мл}$$

Підраховуємо кількість колб:

$$1\ 300 / 150 = 8,6 \approx 9 - \text{колб.}$$

Таким чином для приготування посівного матеріалу нам необхідно 9 колб-качалок.

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу метіоніну *S. glutamicum* ATCC 13032 приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 20 м<sup>3</sup> (і один запасний), один посівний апарат об'ємом 2 м<sup>3</sup> (і один запасний), один інокулятор об'ємом 160 л (і одний запасний) та один малий інокулятор об'ємом 20 л (і один запасний).

*Весь процес буде поділений на п'ять етапів:*

**1 етап.** Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках: 1,3 л у 9-ти колбах.

**2 етап.** Вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі: 13 л у 20 л інокуляторі.

**3 етап.** Вирощування посівного матеріалу в середньому інокуляторі: 130 л у 250 л інокуляторі

**4 етап.** Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі: 1 300 л у 2 м<sup>3</sup> інокуляторі.

**5 етап.** Виробничий біосинтез у ферментері: 12 778 л у 20 м<sup>3</sup> ферментері.

## РОЗДІЛ 4

### ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ

#### 4.1. Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Глибинне культивування має ряд переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно зменшити виробничі площі, виключити тяжку ручну працю (високий рівень автоматизації), покращити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, робить можливий перехід на безперервний спосіб культивування. При глибинному способі культивування більш раціонально використовуються поживні середовища, що дає можливість зменшити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів та отримувати більш активні вторинні метаболіти [18].

Раніше продуцент вирощували на поверхні живильного середовища в плоских бутлях (матрацах). Щоб отримати помітні кількості антибіотика, були потрібні тисячі матраців, кожен з яких після зливу культуральної рідини необхідно було мити, стерилізувати, заповнювати свіжим середовищем, засівати продуцентом і інкубувати в термостатах. Малопродуктивний спосіб поверхневої ферментації (поверхневого біосинтезу) не міг задовольнити потреб. У зв'язку з цим був розроблений новий високопродуктивний метод глибинного культивування (глибинної ферментації) мікроорганізмів.

Метод глибинного культивування відрізняється від попереднього тим, що мікроорганізми-продуценти вирощують не на поверхні живильного середовища, а у всій її товщі. Вирощування продуцентів ведуть у спеціальних апаратах (ферментерах), ємність яких може перевищувати 50 м<sup>3</sup>. Ферментери забезпечені пристосуваннями для продування повітря через живильне середовище і мішалками.

НУХТ БТЕК 04.01.23 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
					РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ		
Розробив		Філь І.А.			Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Сулейко Т.Л.				29	89
Рецензент					Кафедра БТМ <sub>29</sub>		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Розвиток мікроорганізмів-продуцентів в ферментаторах відбувається при безперервному перемішуванні поживного середовища та подачі кисню (повітря). При глибинному вирощуванні у багато разів у порівнянні з вирощуванням продуцента на поверхні середовища збільшується накопичення біомаси (з розрахунку на одиницю об'єму живильного середовища), а значить, і зростає вміст амінокислоти в кожному мілілітрі культуральної рідини [19].

У клітинах бактерій амінокислота метіонін синтезується з пірувату через ряд проміжних етапів, пов'язаних з утворенням напівальдегіду аспарагінової кислоти, дигідропіколинової кислоти, напівальдегід аспарагінової кислоти є також одним з попередників в синтезі амінокислот – треоніну, метіоніну і ізолейцину. Процес синтезу амінокислот (лізину, треоніну, метіоніну і ізолейцину) починається фосфорилуванням аспарагінової кислоти за участю аллостеричного ферменту аспартаткінази, активність якого інгибується спільною дією двох амінокислот – лізину і треоніну, якщо вони накопичуються в клітках бактерій в надлишковій концентрації. Якщо знизити концентрацію однієї з цих амінокислот, то синтез інший здійснюватиметься навіть за умови, коли вона накопичується в досить високій концентрації [20].

Для зняття регуляції синтезу метіоніну необхідно припинити утворення треоніна на стадії перетворення напівальдегіду аспарагінової кислоти в гомосерин, що каталізує ферментом гомосериндегідрогеназою. Останнє досягається за допомогою мутагенезу. Досліди показують, що клітини мутантів, не створюючі гомосериндегідрогенази, при їх культивуванні на штучному живильному середовищі забезпечують високий вихід метіоніну. Дефіцитні амінокислоти, які не синтезуються клітинами (гомсерин, треонин, метіонін) мутантів, вводяться до складу живильного середовища в такій кількості, аби вони не були регулювальниками синтезу метіоніну. Окрім дефіцитних амінокислот, які не синтезуються клітинами мутантів, в живильне середовище також додають необхідні для

життєдіяльності мікроорганізмів макро- і мікроелементи і вітаміни. В процесі культивування мікроорганізмів забезпечується подача стерильного повітря за допомогою спеціальних турбінних мішалок, для запобігання спінюванню субстрата і клітинної суспензії в середу культивування додають піногасник. Посівний матеріал, призначений для виробничої ферментації, спочатку вирощують в посівних апаратах при 28 – 32°C, рН 7 – 7,2 протягом 18 – 24 ч, а потім отримана суспензія кліток подається у виробничі ферментери ємністю 50 – 100 м<sup>3</sup>, в яких підтримується постійний режим аерації, необхідний тиск, контроль за всіма компонентами і параметрами середовища. Час ферментації 55 – 72 год. Накопичення в культуральній рідині метіоніну починається після 25 – 30 год вирощування промислової культури і до кінця ферментації досягає 40 – 50 г/л. Культуральну рідину відділяють від культури кліток продуцента фільтруванням і використовують для здобуття препаратів метіоніну [21].

#### **4.1.1. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій**

Із всіх відомих способів мийки обираємо СІР-мийку – це метод очищення внутрішніх поверхонь труб, ємностей, технологічного обладнання, фільтрів і пов'язаної з ним арматурою, без розбирання .

Виконувані операції:

1. ополіскування холодною водою,
2. ополіскування теплою водою,
3. циркуляційна мийка лужним миючим розчином,
4. ополіскування гарячою водою,
5. стерилізація гарячою водою чи дезінфікуючим розчином
6. ручний і автоматичний режим роботи.

Переваги:

- ✓ можливість багаторазового використання миючих розчинів,
- ✓ можливість збору ополіскуючої води,
- ✓ автоматичне підтримання температури і концентрації мийних розчинів,

- ✓ нагрів води в малому контурі економить час, воду та енергію,
- ✓ економічність: низька витрата води, електроенергії, пари при високій якості мийки,
- ✓ простота використання.

### **Стадія технічного огляду**

Після миття та ополіскування ємнісного обладнання проводять його технічний огляд з метою виявлення нещільностей в комунікаціях та з'єднаннях. У разі їх знаходження проводять підтягнення різьбових з'єднань.

### **Перевірка на герметичність**

Наступна стадія підготовки обладнання до стерилізації полягає в перевірці його на герметичність. Для цього на апараті закривають усі люки та вентиля і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску  $P = 0,1-0,2$  МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30–60 хв.) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук нещільностей на апараті та у місцях з'єднання з комунікаціями за допомогою галогенових течіешукачів.

Сучасний метод перевірки на герметичність базується на використанні галогенових течіешукачів. Прилад укомплектований тонким щупом та вимірювачем вмісту галогену. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогеновмісної речовини, зазвичай шестифтористий сульфур -  $SF_6$ , закривають усі з'єднання та вентиля, апарат нагрівають до температури  $80^{\circ}C$  і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогеновмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течіешукача до них. Тривалість перевірки одного апарату цим методом становить близько 10 год.

Якщо метод з використанням галогену для перевірки на герметичність не є можливим, то можна використати мильний розчин будь якого миючого засобу. При цьому робиться розчин який складається з води та миючої



речовин концентрацією приблизно 1:1 або 1:2. Перевірка на герметичність в такому випадку проводиться в ручну нанесенням мильного розчину на з'єднання (апарат повинен бути знаходитись під тиском 0,2 МПа). Поява піни буде свідчити про негерметичність з'єднання, в разі знаходження такого потрібно провести підтягування з'єднань після чого ще раз перевірити герметичність мильним розчином.

### **Стадія стерилізації обладнання та комунікацій**

Процес біосинтезу метіоніну проходить в стерильних умовах, тому необхідно проводити стерилізацію обладнання. Для цього використовують стерилізацію насиченою водяною парою, яку подають під тиском  $P = 0,28 - 0,3$  МПа. Процес умовно поділяють на три етапи:

1. Нагрів апарата. Під час стерилізації апарата попередньо в сорочку подають глуху пару і прогрівають апарат до температури  $80 - 90$  °С.

2. Стерилізація. Відкривають усі вентиля на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації  $t_{ст} = 130 - 135$  °С закривають усі вентиля на апараті, крім парового, і витримують заданий час стерилізації. При стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

3. Охолодження. Закривається уся запірна арматура подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Для компенсації падіння тиску (утворення вакууму при конденсації пари в апараті) в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури до  $30-40$  °С і надлишкового тиску  $P = 0,003-0,005$  МПа.

#### **4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря**

Для синтезу метіоніну необхідна аерація оскільки *Corinebacterium glutamicum* є аеробом, тому підготовка стерильного аераційного повітря при культивуванні є однією з важливих задач на біотехнологічному підприємстві.

Для стерилізації повітря в боксах та лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-ламп [22]

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів різних класів очистки.

Пористі матеріали для фільтрів грубої та тонкої очистки відрізняються великим різноманіттям. Їх можна розділити на чотири групи: волокнисті з нетканого матеріалу, мікроструктура яких нагадує багаточарові, частково перекриваючі сітки, папири та картони, що мають більш щільну структуру, спечені керамічні та порошкові зернисті матеріали, що мають звивисті канали з періодичним звуженням та розширенням по всій товщі матеріалу і пористі мембрани-плівки, маючий ситовий механізм фільтрації, розмір пор котрих визначає розмір фільтруючих частинок. Перші три групи мають неситовий тип фільтрації, а четверта ситовий [9].

В фільтрах грубої бактеріальної очистки застосовують першу групу матеріалів, частіше за все зустрічаються скловолокнисті матеріали з діаметром пор 7 - 21 мкм. Їх основним недоліком є слабка стійкість до стерилізації гострою парою.

Матеріали з базальтового волокна з середнім діаметром пор 26 мкм являються більш стійкими але вони менш поширені в виробництві.

Неткані матеріали з антимікробних целюлозних волокон не потребують стерилізації гострим паром, можуть бути використані для стерилізуючого фільтрування.

Основним недоліком волокнистих фільтрів є зміна розміра пор в процесі експлуатації, а також через потрапляння вологи на сам фільтр, що може призвести до небажаних проскоків по сторонніх матеріалів.

Спечені зернисті матеріали, як кераміка, скловолокно або металокераміка мають контролюєму структуру, хімічно інертні, легко піддаються методам стерилізації, мають високу міцність, дешеві та прості в виготовленні. Їх головний недолік це невисокий ступінь очистки повітря який варіюється в межах від 65% до 95% [23].

Проаналізувавши ці данні можна підібрати фільтруючі матеріали для різних етапів очистки повітря.

Для грубої очистки повітря на головних фільтрах, прийнято рішення використовувати рулонні повітряні фільтроматеріали класу очистки G4 які виробляються з висококласної фільтрувальної сировини, що представляє собою неткане полотно, а саме синтетичні волокна 100% поліестру, вироблене методом термічного скріплення при температурі понад 100°C. Завдяки спеціальній прогресивній структурі, фільтрувальний матеріал G4 гарантує високу пилоємність і результативність очищення повітря до 95% [24].

Для фільтрів тонкої (HEPA) та індивідуальної (ULPA) очистки прийнято взяти фільтроматеріал високої очистки класу H14 та H16. Дані фільтри заповнені тканиною Петрянова, що представляє собою надтонкі, хаосно сплетені в вигляді полотна на марлевій чи іншій пористій основі волокна товщиною 1,5 та 2,5 мкм виготовлені з перхлорвініла (ФПП-15 та ФПП-25), ацетат целюлози (ФПА-15), полістирола (ФПС-15), поліфторстирола (ФПФС). Вище перелічені фільтруючі метеріали призначені для надтонкого очищення повітря від радіоактивних, отруйних, бактеріальних та інших високодисперсних аерозолів. Індивідуальні фільтри встановлюються безпосередньо перед кожним ферментером або інокулятором. Використання індивідуальних фільтрів, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, дають змогу отримати повітря зі ступенем очистки 99,99995% [23].

#### **4.1.3. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень та вибору мийних та дезінфікуючих засобів**

Оскільки культивування *C.glutamicum* ATCC 13032 здійснюється у 20 м<sup>3</sup> ферментері, то приймаємо рішення, що проведення виробничого культивування та контроль виробництва буде здійснюватись у двох приміщеннях. Загальна площа приміщення в якому буде проводитись виробниче культивування з урахуванням УБС буде становить 72 м<sup>2</sup> (6 × 12).

Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено посівний апарат ( $2 \text{ м}^3$ ), та інокулятори (250 л та 20 л), приблизно дорівнюватиме:  $30 \text{ м}^2 (6 \times 5)$ .

Обладнання слід розташувати так, щоб до нього був забезпечений вільний доступ як для прибирання так і для технічного обслуговування. Відстань між окремими апаратами має становити 1,5 м один від одного, а відстань від апарата до стіни 1 м. Висота стін для першого і для другого приміщення становить 8 м.

Загальна площа стін для першого (виробничого) приміщення становить  $((8 \times 6) + (8 \times 12)) \times 2 = 240 \text{ м}^2$ , а для другого –  $((8 + 6) + (8 + 5)) \times 2 = 176 \text{ м}^2$ .

Загальна площа підлоги двох приміщень –  $102 \text{ м}^2$ .

Площа приміщення, у якому будуть знаходитись реактори-змішувачі ( $10 \text{ м}^3$ ;  $1,25 \text{ м}^3$ ;  $1 \text{ м}^3$ ; 400 л; 400 л; 160 л; 100 л; 60 л; 20 л; 10 л) приблизно дорівнює  $88 \text{ м}^2 (8 \times 11)$ .

Загальна площа стін становить  $((8 + 8) + (8 + 11)) \times 2 = 304 \text{ м}^2$ .

Необхідно розрахувати витрати дезінфікуючих засобів. Приблизно на  $1 \text{ м}^2$  витрачається 100 мл робочого розчину. Приймаємо, що обладнання потрібно мити перед кожним виробничим циклом - 33 разів, підлога миється кожного робочого дня, загалом 270 разів, а стіни, вікна та двері раз на місяць, загалом 9 разів на рік. Визначимо площі поверхонь, які необхідно мити або дезінфікувати для всіх приміщень (табл. 4.1)

**Загальна площа миття та дезінфекції робочих приміщень на  
виробництві**

Об'єкт миття або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту (м <sup>2</sup> , м <sup>3</sup> )	Кількість миттів або дезінфекцій за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> , м <sup>3</sup>
Обладнання, інвентар, комунікації	46 м <sup>3</sup>	36	*1656 м <sup>3</sup>
Підлога	190	270	51300
Стіни, двері, вікна	720	9	6480

\* – Миття обладнання проводиться методами циркуляції робочого розчину в системі СІР – мийка. Заповнення резервуара ферментера або інокулятора робочим розчином складатиме близько 20% від свого максимального об'єму кожного обладнання відповідно.

У табл. 4.2. розраховано дані щодо вартості миючих та дезінфікуючих засобів на весь період виробництва.

Рекомендується чергувати дезінфекційні та антисептичні засоби кожні 1–3 місяці з метою запобігання появі стійких штамів мікроорганізмів.

Миючі та дезінфікуючі засоби слід контролювати на мікробіологічну чистоту. Їх розчини потрібно зберігати у попередньо очищеній тарі та суворо дотримуватись строків придатності.

## Узагальнена характеристика витрат миючих та дезінфікуючих засобів для всього виробничого процесу

Назва дезінфікуючого засобу	Основні діючі речовини	Об'єкт миття та дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, (м <sup>2</sup> , м <sup>3</sup> )	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л миючого або дезінфікуючого засобу, грн	Загальна вартість миття та дезінфекції за весь період виробництва, грн
Еко Хлор	Натрій гідроксид, Натрій гіпохлорид	Обладнання, інвентар, комунікації	1,0	1 656 м <sup>3</sup>	331,2	25	82,8
СефДез инстру	Алкілдиметилбензиламонію хлорид, N-(3-амінопропіл)-N-додецил-1,3-діаміну, 5,0% спирт ізопропіловий	Обладнання, інвентар, комунікації	5,0	1 656 м <sup>3</sup>	331,2	369	1 222,13
Септофан	Полігексаметиленгуанідин хлорид, четвертинні амонієві сполуки	Обладнання, інвентар, комунікації	1,0	1 656 м <sup>3</sup>	331,2	160	529,92
Біопагdez	Полігексаметиленгуанідін гідро хлорид, алкілдиметилбензиламоній хлорид	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	57 780	5 778	240	1 386,72

Закінчення таблиці 4.2

Сурфаноіс Преміум	N-(3-амінопропіл)-N- додецилпропан-1,3-діамін - 4,59, дидецилдиметиламоній хлорид - 2,25	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,25	57 780	5 778	559	8 089,2
Сан-Септ	Дидецилдиметиламоній хлорид, алкіл, диметилбензиламоній хлорид	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	5,0	57 780	5 778	244	70 491,6
Дівосан Форте	Надоцтова кислота - 15 %	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,1	57 780	5 778	75	433,35

Отже, проаналізувавши таблицю 4.2. можна зробити висновок, що для миття обладнання, інвентарю та комунікацій обираємо «Еко-хлор», так як він є досить сильною лужною речовиною (рН = 12,5) і є універсальним миючим засобом. Також «Еко-хлор» екологічно безпечний на відміну від звичних миючих засобів, які містять фосфати. Ще однією перевагою є те, що натрій гідроксид є найдешевшим миючим засобом і це допоможе значно зменшити витрати виробництва.

Для миття стін, підлоги, вікон та дверей обираємо «Дівосан Форте» та «Біопагdez». Зокрема останній миючо-дезінфікуючий засіб володіє досить широким спектром антимікробної дії, не псує обробляючі об'єкти, засіб не зумовлює подразнюючу дію при контакті зі шкірою та при взаємодії із слизовими оболонками очей. Також має пролонговану дію та є економічно доцільним. Дані миючо-дезінфікуючі засоби використовують з інтервалом в 3 місяці, що дозволяє запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

#### **4.1.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища**

Максимальний синтез метіоніну 96 г/л за 160 год досягається за умов росту штаму *Corinebacterium glutamicum* АТСС 13032 на середовищі наступного складу (г/л):

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2,

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 2,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 10,

Глюкоза – 60 + 40 = 100 (дробне внесення),

Дріжджовий екстракт - 5,

Канаміцин - 0,02,

$\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 0,01,

$\text{ZnSO}_4$  - 0,002,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  - 0,01,

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  - 0,25,

Біотин - 0,000001,



Тіамін - 0,000001,

CaCl<sub>2</sub> - 0,000005.

При чому біотин, тіамін та кальцій хлор готують окремо як протекатеховий розчин і додають у концентрації 1 мл/л.

Згідно з розрахунками, які наведені у розділі 1, виробничий біосинтез метіоніну здійснюється у ферментері об'ємом 20 м<sup>3</sup>, який містить 14 м<sup>3</sup> середовища.

#### **Середовище для вирощування посівного матеріалу у колбах.**

Насамперед для вирощування посівного матеріалу в колбах потрібно 1,3 л поживного середовища.

Враховуючи невеликий об'єм середовища потрібного для вирощування інокуляту в колбах, його стерилізація проводиться в автоклаві. Проаналізувавши склад поживного середовища для культивування *S. glutamicum* ATCC 13032 можна поділити його на такі композиції залежно від температури стерилізації та взаємодії певних компонентів:

**Композиція А:** глюкоза і дріжджовий екстракт (112 °С, 30хв.)

**Композиція Б:** КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>.(131 °С, 40хв)

**Композиція В:** Канаміцин

**Композиція Г:** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>·6·H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O.

**Композиція Д:** Біотин, тіамін, CaCl<sub>2</sub>.

**Середовище для вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі.** Потрібно приготувати і простерилізувати 13 л поживного середовища. Компоненти поживного середовища для культивування *S. glutamicum* ATCC 13032 можна поділити його на такі композиції залежно від температури стерилізації та взаємодії певних компонентів:

**Композиція А:** глюкоза і дріжджовий екстракт (112 °С,30хв.)

**Композиція Б:** КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>.(131 °С, 40хв)

**Композиція В:** Канаміцин

**Композиція Г:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

**Композиція Д:** Біотин, тіамін,  $\text{CaCl}_2$ .

**Середовище для вирощування посівного матеріалу в середньому інокуляторі.** Необхідно приготувати і простерилізувати 131 л поживного середовища. Компоненти поживного середовища можна поділити на такі ж композиції, як і для малого інокулятора.

**Композиція А:** глюкоза і дріжджовий екстракт (112 °С, 30хв.)

**Композиція Б:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . (131 °С, 40хв)

**Композиція В:** Канаміцин

**Композиція Г:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

**Композиція Д:** Біотин, тіамін,  $\text{CaCl}_2$ .

**Середовище для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті.** Потрібно приготувати і простерилізувати 1300 л поживного середовища. Компоненти поживного середовища можна поділити на такі ж композиції, як і для великого інокулятора.

**Композиція А:** глюкоза і дріжджовий екстракт (112 °С, 30хв.)

**Композиція Б:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . (131 °С, 40хв)

**Композиція В:** Канаміцин

**Композиція Г:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

**Композиція Д:** Біотин, тіамін,  $\text{CaCl}_2$

**Середовище для виробничого біосинтезу в ферментері.** Об'єм середовища, яке необхідно простерилізувати становить 12,7 м<sup>3</sup>.

**Композиція А:** глюкоза і дріжджовий екстракт (112 °С, 30хв.)

**Композиція Б:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . (131 °С, 40хв)

**Композиція В:** Канаміцин

**Композиція Г:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

**Композиція Д:** Біотин, тіамін,  $\text{CaCl}_2$

З економічної точки зору доцільніше для стерилізації такої кількості поживного середовища застосовувати установку безперервної стерилізації. Її використання дозволяє зменшити витрати води, пари, теплової енергії і скоротити час обробки поживного середовища. Таку кількість поживного середовища можна простерилізувати в УБС-20, потужністю  $20 \text{ м}^3/\text{год}$ . Загальний час стерилізації поживного середовища становить  $\tau = 12,7 / 20 = 0,63 \text{ год} = 38 \text{ хв}$ .

**Піногасник.** До складу поживного середовища входять компоненти, які при перемішуванні у ферментері та інокуляторах буде утворювати піну. Для зменшення рівня піни використовуємо механічний піногасник та датчик рівня піни. Використання механічного піногасника зменшить економічні витрати ніж при використанні органічного чи хімічного піногасника.

**РОЗДІЛ 5.  
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ**

*Таблиця 5.1.*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
Р-2 Р-4	Реактор-змішувач для еко-хлор	2	Реактор об'ємом 10 м <sup>3</sup> , 0,1 м <sup>3</sup> , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв.
Д-1 Д-3 Д-5 Д-14 Д-16 Д-18 Д-20 Д-22 Д-24 Д-26 Д-28 Д-47	Ваговий дозатор	12	Дозатор виробництва НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1% [1]
ПЗ-7	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник з металевою сіткою для видалення механічних забруднень
ФГ-8	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр касетного типу фірми "VENTS", фільтруючий матеріал: синтетичні волокна – поліестер. E= 80-90% [2]
К-9	Компресор	1	Компресор гвинтовий фірми "OZEN" СК-400, тиск 12 бар, продуктивність 550 [3]

НУХТ БТЕК 04.01.23 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розробив		Філь І.А.		
Керівник		Сулейко Т.Л.		
Рецензент				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
		Літ.	Арк.	Акрушів
			44	89
		44		
<b>Кафедра БТМ</b>				

Продовження таблиці 5.1

ТО-10	Теплообмінник охолоджувач	1	Фреоновий охолоджувач повітря фірми "VENTS" ОКФ потужністю до 300м <sup>3</sup> /год [4]
P-11	Ресивер	1	Ресивер ARIACOM SV 200-1 IP Об'єм – 200 л Робочий тиск – 11 атм Виробник – "ARIACOM" (Італія) [5]
ТН-12	Теплообмінник-нагрівач	1	Канальний теплообмінник-нагрівач С-EVN-K-250-3,0, потужністю 3 кВт та мінімальною продуктивністю 270 м <sup>3</sup> /год. [6]
ФІ-13	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр HEPA, фільтруючий матеріал: мікроскловолокно. E= 99,995% [7]
ФІ-38 ФІ-40 ФІ-42 ФІ-44	Фільтри індивідуальної очистки	4	Фільтри індивідуальної очистки ULPA фірми "Alhstrom", фільтруючий матеріал – скловолокно. E= 99,999 95% [8]
P-15 P-17 P-19 P-21 P-23 P-25 P-27 P-29 P-31 P-46	Реактор-змішувач	10	Реактор-змішувач для приготування композицій. Оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм окремих реакторів: 20л, 1,25 м <sup>3</sup> , 1 м <sup>3</sup> , 400 л, 400 л, 160 л, 100 л, 60 л, 10 л [9]
НВ-32 НВ-48	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий фірми "Агромаш" ОНЦ продуктивністю 26 м <sup>3</sup> /год, потужність насосів 3 кВт. [10]

Продовження таблиці 5.1

К-33	Колонка для нагрівання	1	Колонка для нагрівання ПС
ТВ-34	Теплообмінник витримувач	1	Витримувач поживного середовища при температурі 140° С протягом 2 хв.
Т-35	Теплообмінник рекуператор	1	Пластинчастий теплообмінник фірми “ОПЕКС” THERMAKS PTA(GL)-13, потужністю до 20м <sup>3</sup> [11]
УБС-36	Установка безперервної стерилізації	1	Продуктивність 5 м <sup>3</sup> /год. Установка складається із приймальної ємності, відцентрового насоса, нагрівач-стерилізатор, трьох витримувачів, пробовідбірник, теплообмінник-рекуператор, теплообмінник-охолоджувач, насос для подачі стерильного поживного середовища в посівний апарат
ЗП-37	Засівний пристрій	1	Засівний бачок для внесення посівного матеріалу в інокулятор в стерильних умовах Матеріал- нержавіюча сталь
ФР-39 ФР-41	Інокулятор	2	Два інокулятори фірми “Агромаш” для вирощування інокулята оснащений паровою сорочкою, барботером, мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискування, автоматичним датчиком рівня піни рН метром,, манометром та термометром. Кількість обертів мішалки 180 об/хв. Робочим об’ємом 20 л, 250 л [12]

Закінчення таблиці 5.1

ФР-43	Посівний апарат	1	Посівний апарат фірми «Біотехно» для вирощування інокулята оснащений паровою сорочкою, барботером, мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискування, автоматичним датчиком рівня піни рН метром, манометром та термометром. Кількість обертів мішалки 20-400 об/хв. Робочим об'ємом 2000 л [13]
ФР-45	Ферментер	1	Ферментер фірми «Біотехно» об'ємом 20 м <sup>3</sup> оснащений турбінною мішалкою закритого типу із нержавіючої сталі. Оснащений паровою сорочкою, барботером, пробовідбірником, автоматичним датчиком рівня піни, рН метром, манометром та термометром. Кількість обертів мішалки 180 об/хв. [13]

\*1 - <https://technowagy.com.ua/ru/products/dozatory-mnogokomponentnye/>; 2 - <https://vents-shop.com.ua/prinadlezhnosti/filtry/kruglye-kassetnye/>; 3 - [http://championairtech.com.ua/produkcija/vintovye-kompressory/?gclid=Cj0KCQiAwqCOBhCdARIsAEPyW9mIDSmjjghU34eDVqlywq8rliN\\_QUz5SNr\\_AubL\\_4u-hFljfxYEjDMaAorseALw\\_wcB](http://championairtech.com.ua/produkcija/vintovye-kompressory/?gclid=Cj0KCQiAwqCOBhCdARIsAEPyW9mIDSmjjghU34eDVqlywq8rliN_QUz5SNr_AubL_4u-hFljfxYEjDMaAorseALw_wcB); 4 - <https://vencon.ua/ua/catalog/bytovye-ventilyacionnye-ustanovki/vents>; 5-<https://astar-compressors.ru/catalog/resivery-200-litrov/sv-200-11p/> 6 - <https://ccktm.ibud.ua/ru/company-prais/kanalnyy-nagrevatel-vozdukha-elektricheskiy-c-evn-k-250-3-0-ccktm-2121037>; 7 - <https://air-klimat.prom.ua/p207006229-filtry-vysokoeffektivnoj-ochistki.html>; 7 - <https://air-klimat.prom.ua/p207006229-filtry-vysokoeffektivnoj-ochistki.html>; 9 - <https://prom.ua/Reaktory-s-meshalkami.html>; 10 - <https://agroservers.ru/b/nasos-pishhevoy-samovsasyvayushhiy-onts-6-3-30k5-2-2-2-s-kozhukhom-1120262.htm>; 11 - <https://opeks.energy/plastinchatye-teploobmenniki/>; 12 - <https://www.agro-mash.ru/AGROMASH/FERMENTER/index.html>; 13- <https://biotechno.ru/catalog/promyshlennyye-fermentery/promyshlennyy-fermenter-biotechno-obemom-1000-2000-l/>;

## РОЗДІЛ 6.

### ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу метіоніну включає в себе: допоміжні роботи, підготовку персоналу, приготування миючих та дезінфікуючих розчинів, підготовку виробничих приміщень, обладнання та комунікацій, стерильного аераційного повітря, підготовку і стерилізацію поживних середовищ та технологічний процес, що включає в себе підготовка посівного матеріалу і біосинтез амінокислоти метіоніну *C. glutamicum ATCC 13032*.

Технологічну схему біосинтезу метіоніну наведено у графічній частині проекту.

#### **ДР 1. Санітарна підготовка виробництва**

Санітарна підготовка виробництва забезпечує якість виробництва та його асептичні умови, безпеку праці та охорону здоров'я персоналу. Ця стадія виконується за вимогами нормативних документів, в яких описуються правила виробництва та контроль якості технологічного процесу.

*ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікувальних розчинів.*

*ДР 1.1.1. Приготування розчину "Еко-хлор".*

Розчин еко-хлору обираємо для миття обладнання, інвентарю та комунікацій. Для приготування 1 % розчину еко-хлору, у реактор-змішувач (Р-2), через об'ємно-ваговий дозатор (Д-1) подаються 92 кг еко-хлору та доливають 9 180 л питної води та розчиняють. Отриманий розчин подається СІР-мийкою до реакторів змішувачів, інокуляторів, посівного апарата та ферментера.

					НУХТ БТЕК 04.01.23 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		
Розробив		Філь І.А.			Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Сулейко Т.Л.				48	89
Рецензент					48		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.					



### *ДР 1.1.2. Приготування розчину “Біопагdez”*

На один виробничий цикл необхідно приготувати 91 л миючо-дезинфікувального розчину. Для того щоб приготувати 0,1 % робочого розчину “Біопагdez”, на одне генеральне прибирання, у реактор-змішувач (P-4) об’ємом 100 л додаємо 91 мл концентрату “Біопагdez” та 91 л питної води при постійному перемішуванні. Зберігають робочий розчин не більше 3-х діб у закритій ємності.

### *ДР 1.1.3. Приготування розчину “Біопагdez” для генерального прибирання*

Для генерального прибирання необхідно приготувати 1% робочий розчин “Біопагdez”, для цього у реактор-змішувач (P-4) об’ємом 100 л додають 910 мл концентрату “Біопагdez” та 90 л питної води при постійному перемішуванні. Зберігають робочий розчин не більше 3-х діб у закритій ємності

### *ДР. 1.2. Підготовка виробничих приміщень*

#### *ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень*

Включає в себе миття підлоги та за необхідності стін. Щоденне прибирання здійснюється за допомогою 0,1% розчину “Біопагdez” ( від ДР 1.2.2) . Прибирання проводиться 1 раз на день після кожної зміни.

Відпрацьована вода направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

#### *ДР 1.2.2. Генеральне прибирання приміщень*

Проводять 1 раз на місяць. Генеральне прибирання здійснюють за допомогою 1% розчину “Біопагdez” ( від ДР 1.2.3). При генеральному прибиранні обробляється підлога, вікна, двері, стіни, за необхідністю стеля.

Для знезараження повітря після генерального прибирання вмикають бактерицидні лампи

Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

### *ДР 1.3. Підготовка технічного обладнання*

#### *ДР 1.3.1. Миття технічного обладнання*

Перед та після початку циклу ферментації проводиться миття технологічного обладнання, що включає в себе реактори-змішувачі, інокулятори, посівний апарат, ферментер, збірники та комунікації. Для цього використовують робочий розчин 1% “Еко-хлор” ( від ДР 1.2.1 ). Миття відбувається за допомогою СІР-мийки при температурі 40-50 °С упродовж 30-40 хв. Відпрацьований розчин подається до збірника ( ЗІ ) після чого ним можна провести ще один цикл миття. Надалі відпрацьований розчин подається ( до ЗВ 7.2 ).

#### *ДР 1.3.2. Ополіскування технічного обладнання*

Здійснюється ополіскування обладнання та комунікацій питною водою при температурі 20 °С протягом 13 хв для відмивання від решток забруднення та залишків миючого засобу. Відпрацьований розчин зливається і направляється на знешкодження відходів.

#### *ДР 1.3.3. Технічний огляд*

Технічний огляд обладнання проводять візуально, для виявлення видимих пошкоджень чи несправностей обладнання. У разі їх знаходження проводять підтягнення різьбових з'єднань і виправляють несправності. В разі знаходження критичних пошкоджень обладнання його ставлять на ремонт і замінюють на аналогічне запасне.

#### *ДР 1.3.4. Перевірка обладнання на герметичність*

Сучасний метод перевірки на герметичність базується на використанні галогенових течіешукачів. Прилад укомплектований тонким щупом та вимірювачем вмісту галогену. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини, зазвичай шестифтористий сульфур - SF<sub>6</sub>, закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80° С подаючи глуху пару і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через

неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієшукача до них. Тривалість перевірки одного апарату цим методом становить близько 10 год.

Знайдені неущільнення усувають і проводять повторну перевірку. Обов'язково раз у тиждень на герметичність перевіряють всю лінію.

#### *ДР 1.3.5. Стерилізація технічного обладнання*

Стерилізацію ферментера, посівного апарату та інокуляторів проводять гострою парою при температурі 130 °С, тиску 0,15 МПа, протягом 40 хвилин. По закінченні стерилізації зупиняють подачу гострої пари, ставлять всі вузли під паровий захист та знижують тиск. При зниженні тиску проводять охолодження до температури 90 °С. Після стерилізації конденсат, що утворився подається на знешкодження.

#### *ДР 2. Підготовка аераційного повітря.*

##### *ДР 2.1. Забір атмосферного повітря.*

Забір повітря здійснюється повітрязабірником (ПЗ-4) на висоті близько 20 м від рівня землі.

Повітрязабірник представляє собою металеву трубу діаметром 200 мм.

##### *ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря.*

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром до 150, 300 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення (ФГ-8) використовують фільтр касетного типу. Як фільтруючий матеріал обираємо синтетичне волокно - поліестер. Ступінь очищення становить  $E = 80-90 \%$ .

##### *ДР 2.3. Компресування повітря.*

Компресування повітря здійснюється у компресорі (К-9) при тиску 12 бар, при цьому повітря нагрівається до температури 120 - 200 °С.

##### *ДР 2.4. Нормалізація повітря*

Повітря охолоджують до температури 25°С в теплообміннику-охолоджувачі (ТО-10). При охолодженні стисненого повітря виділяється 60 – 70 % вологи, яка відділяється краплевловлювачем.

#### *ДР 2.5. Нагрівання повітря.*

Для аерації поживного середовища під час культивування необхідно подавати повітря приблизної температури, що і культуральна рідина, тому повітря нагрівають до температури 35 °С в теплообміннику-нагрівачі (ТН-12).

Повітря подається в ресивер (Р-11) для акумуляції та стабілізації термодинамічних показників. В ресивері вирівнюється тиск та пульсації потоку повітря. Також ресивер має конденсато-відвідний канал.

#### *ДР 2.6. Очищення на головному фільтрі*

В якості фільтра для тонкого очищення (ФІ-13) використовується фільтр типу НЕРА, фільтруючий матеріал якого представлений тканиною Петрянова.

Повітря, проходячи крізь фільтр, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить  $E=99,995\%$ .

#### *ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Для очищення повітря використовується індивідуальний мембранний фільтр (ФІ-38, 40, 42, 44) які заповнені надтонкими мембранами. Фільтр виготовляються в вигляді фільтропатронів чи капсул.

Фільтр встановлюють перед кожним інокулятором, посівним апаратом, реактором-змішувачем де проводиться стерилізація та ферментером і забезпечує очистку повітря від часток діаметром 0,2 мкм. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення  $E=99,999\ 95\%$

Стерилізація фільтра проводиться гострою парою разом з інокуляторами, посівним апаратом та ферментером без вилучення фільтруючих елементів з корпусу фільтра.

### ***ДР 3. Підготовка та стерилізація допоміжних розчинів***

#### ***ДР 3.1. Підготовка і стерилізація протокатехового розчину***

Для культивування мікроорганізмів в інокуляторах, посівному апараті та ферментері необхідно приготувати протокатеховий розчин, який додають після початку культивування у співвідношенні 1 мл/л. Протокатеховий розчин представляє собою біотин, тіамін та  $\text{CaCl}_2$ . Для приготування розчину у реактор-змішувач (P-15) на 20 л додають 0,0142 г біотину, стільки ж тіаміну і 0,0711 г  $\text{CaCl}_2$ , після чого наливають 14,2 л питної води. Стерилізують 30 хв при температурі 112 °С.

#### ***ДР 3.2. Підготовка і стерилізація глюкози для дробного живлення***

Для виробничого біосинтезу у ферментері необхідно приготувати розчин глюкози для дробного живлення. Об'єм глюкози на весь біосинтез у ферментері складає 1 278 л, після підрахунку було прийняте рішення взяти 511 л глюкози для дробного живлення. Для цього в реактор-змішувач (P-17) об'ємом 1,25 м<sup>3</sup> наливають 511 л глюкози і додають 767 л водопровідної води. Стерилізують 30 хв при температурі 112 °С.

### ***ДР 4. Приготування титрувальних розчинів***

#### ***ДР 4.1. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для інокулятора об'ємом 20 л***

2 мл розчину 6% NaOH вноситься на 1 л середовища для доведення рН до 7,0. Для середовища об'ємом 13,3 л необхідно приготувати 26,6 мл 6% NaOH. Зі складу беруть сухий NaOH, який являє собою білі, непрозорі кристали.

Маса розчину:  $26,6 \times 2,13 = 56,7$  г

Оскільки в 100 г розчину міститься 6 г NaOH, то в 56,7 г розчину міститься  $56,7 \times 6 / 100 = 3,4$  г NaOH. Отже, для приготування 26,6 мл 6% розчину NaOH потрібно 3,4 г NaOH.

В колбу об'ємом 100 мл вносимо 3,4 г сухого NaOH та додаємо 23,2 мл питної води. Розчин лугу об'ємом 26,6 мл стерилізують в автоклаві при

температурі 131 °С упродовж 40 хв.

***ДР 4.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для інокулятора об'ємом 250 л***

2 мл розчину 6% NaOH вноситься на 1 л середовища для доведення рН до 7,0. Для середовища об'ємом 130 л необхідно приготувати 260 мл 6% NaOH. Зі складу беруть сухий NaOH, який являє собою білі, непрозорі кристали.

Маса розчину:  $260 \times 2,13 = 553,8$  г

Оскільки в 100 г розчину міститься 6 г NaOH, то в 553,8 г розчину міститиметься  $553,8 \times 6 / 100 = 33,2$  г NaOH. Отже, для приготування 260 мл 6% розчину NaOH потрібно 33,2 г NaOH.

В колбу об'ємом 500 мл вносимо 33,2 г сухого NaOH та додаємо 226,8 мл питної води. Розчин лугу об'ємом 260 мл стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

***ДР 4.3. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для посівного апарата об'ємом 2000 л***

2 мл розчину 6% NaOH вноситься на 1 л середовища для доведення рН до 7,0. Для середовища об'ємом 1290 л необхідно приготувати 2580 мл 6% NaOH. Зі складу беруть сухий NaOH, який являє собою білі, непрозорі кристали.

Маса розчину:  $2580 \times 2,13 = 5\,495,4$  г

Оскільки в 100 г розчину міститься 6 г NaOH, то в 5 495,4 г розчину міститиметься  $5\,495,4 \times 6 / 100 = 329,7$  г NaOH. Отже, для приготування 2 580 мл 6% розчину NaOH потрібно 329,7 г NaOH.

В колбу об'ємом 5 л вносимо 329,7 г сухого NaOH та додаємо 2250,3 мл питної води. Розчин лугу об'ємом 2 580 мл стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

***ДР 4.4. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для виробничого ферментера об'ємом 20 м<sup>3</sup>***

2 мл розчину 6% NaOH вноситься на 1 л середовища для доведення рН до 7,0. Для середовища об'ємом 12 778 л необхідно приготувати 25 556 мл 6% NaOH. Зі складу беруть сухий NaOH, який являє собою білі, непрозорі кристали.

Маса розчину:  $25\,556 \times 2,13 = 54\,434,3$  г

Оскільки в 100 г розчину міститься 6 г NaOH, то в 54 434,3 г розчину міститиметься  $54\,434,3 \times 6 / 100 = 3\,266,1$  г NaOH. Отже, для приготування 25 556 мл 6% розчину NaOH потрібно 3 266,1 г NaOH.

На технічних вагах зважують 3 266,1 г сухого NaOH, поміщають в реактор об'ємом 30 л (P-6) та додають 22 289,9 мл питної води; стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

***ДР 4.5 Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівних апаратах об'ємом 20 л, 250 л, 2000 л і 20 м<sup>3</sup>***

Для приготування 26 л 6% хлоридної кислоти, в збірник (P-46) об'ємом 40 л через ваговий дозатор (Д-47) вносять 18,6 л питної води і додають при постійному перемішуванні (50 об/хв) 3,9 л 36% HCl. Подають до посівного апарата та ферментера за допомогою насоса продуктивністю 2 000 л/год (НВ-48).

***ДР 5. Приготування та стерилізація поживного середовища.***

***ДР. 5.1. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.***

Необхідно приготувати 1,3 л поживного середовища. Джерелом вуглецю в середовищі є глюкоза, джерелом азоту – дріжджовий екстракт та сіль сульфату амонію, склад компонентів. наведено у табл 6.1.

Таблиця 6.1.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,3 л середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1300 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	40	52	А	1 144,5
Дріжджовий екстракт	5	6,5		
Вода		1 086		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	2,6	Б	43,2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2	2,6		
Вода		38		
Канаміцин	0,02	0,026	В	0,226
Вода		0,2		
$\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01	0,013	Г	112,15
$\text{ZnSO}_4$	0,002	0,0026		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01	0,013		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25	0,32		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	13		
Вода		98,8		
Всього		1 300		1 300

*ДР 5.1.1. Підготовка і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 52 г глюкози і 6,5 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 1 086 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.



### *ДР 5.1.2. Підготовка і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 2,6 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,6 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Наважки поміщають у колбу об'ємом 75 мл, додають 38 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

### *ДР 5.1.3 Підготовка і стерилізація композиції В*

На аналітичних вагах зважують 0,026 г канаміцину. Наважку поміщають у колбу об'ємом 25 мл, додають 10 мл дистильованої води, перемішують і пропускають через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

### *ДР 5.1.4 Підготовка і стерилізація композиції Г*

На технічних вагах та аналітичних зважують 13 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,013 г  $\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,013 г  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,0026 г  $\text{ZnSO}_4$ , 0,32 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 150 мл, додають 98,8 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

### ***ДР. 5.2. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в малому інокуляторі об'ємом 20 л.***

Для вирощування посівного матеріалу необхідно приготувати 13 л поживного середовища. Розрахунок вмісту компонентів наведено у табл. 6.2.

*Таблиця 6.2.*

### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 13 л середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 13000 мл середовища, мг (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	40	503	А	11 440
Дріжджовий екстракт	5	63		
Конденсат		1 012		

Вода		9862		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	25	Б	430
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2	25		
Вода		380		
Канаміцин	0,02	0,25	В	4,25
Вода		4		
$\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01	0,13	Г	1 125,5
$\text{ZnSO}_4$	0,002	0,025		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01	0,13		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25	3,15		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	126		
Вода		996		
Всього		13 000		

Примітка – композиції Б, Г готуються в колбах і стерилізуються в автоклаві.

#### *ДР 5.2.1. Підготовка і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 503 г глюкози та 63 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у реактор-змішувач (P-19) і додають 9 862 г водопровідної води при постійному перемішуванні. Перемішування зупиняють, реактор-змішувач закривають і стерилізують 30 хв, при тиску 0,5 атм. і при температурі 112°C.

#### *ДР 5.2.2. Підготовка і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 25 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Наважки поміщають у колбу об'ємом 750 мл, додають 380 л дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C упродовж 40 хв.

### *ДР 5.2.3 Підготовка і стерилізація композиції В*

На аналітичних зважують 0,25 г канаміцину. Наважку поміщають у колбу об'ємом 75 мл, додають 10 мл дистильованої води, перемішують і пропускають через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

### *ДР 5.2.4 Підготовка і стерилізація композиції Г*

На технічних та аналітичних вагах зважують 10 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,13 г  $\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,13 г  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,025 г  $\text{ZnSO}_4$ , 3,15 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л, додають 996 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

### ***ДР. 5.3. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 250 л.***

Для вирощування посівного матеріалу необхідно приготувати 131 л поживного середовища. Розрахунок вмісту компонентів наведено у табл. 6.3.

*Таблиця 6.3.*

### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 131 л середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 131 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	40	5,2	А	115,7
Дріжджовий екстракт	5	0,7		
Вода		100		
Конденсат		10		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	0,26	Б	4,52
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2	0,26		
Вода		3,5		
Конденсат		0,5		
Канаміцин	0,02	0,0026	В	0,0226

Вода		0,02		
MnSO <sub>4</sub> ·6·H <sub>2</sub> O	0,01	0,0013	Г	10,6
ZnSO <sub>4</sub>	0,002	0,0003		
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,01	0,0013		
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,25	0,03		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	1,3		
Вода		8,244		
Конденсат		1		
Всього		131		

*ДР 5.3.1. Підготовка і стерилізація композиції А*

На об'ємно ваговому дозаторі (Д-20) зважують 5,2 кг глюкози і 700 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у реактор-змішувач (Р-21), додають 100 л водопровідної води при постійному перемішуванні. Перемішування зупиняють, реактор-змішувач закривають і стерилізують 30 хв, при тиску 0,5 атм. і при температурі 112°C.

*ДР 5.3.2. Підготовка і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 260 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 260 г К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>. Наважки поміщають у три колби об'ємом 3 л кожна, додають 3,5 л дистильованої води, перемішують. Закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

*ДР 5.3.3 Підготовка і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 0,0026 кг канаміцину. Наважку поміщають у колбу об'ємом 75 мл, додають 0,02 л дистильованої води, перемішують і пропускають через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

#### *ДР 5.3.4 Підготовка і стерилізація композиції Г*

На технічних вагах та аналітичних зважують 1,3 кг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,0013 кг  $\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,0013 кг  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,0003 кг  $\text{ZnSO}_4$ , 0,03 кг  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Наважку поміщають у реактор-змішувач (P-23), додають 8,25 л водопровідної води, при постійному перемішування. Перемішування зупиняють, реактор-змішувач закривають і стерилізують 40 хв, при тиску 0,5 атм. і при температурі 131°C.

#### ***ДР. 5.4. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2 000 л.***

Для вирощування посівного матеріалу необхідно приготувати 1 300 л поживного середовища. Розрахунок вмісту компонентів наведено у табл. 6.4.

*Таблиця 6.4.*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1300 л середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1,3 м <sup>3</sup> середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	40	52	А	1 145,5
Дріжджовий екстракт	5	6,5		
Вода		987		
Конденсат		100		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	2,6	Б	43,2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2	2,6		
Вода		34		
Конденсат		4		
Канаміцин	0,02	0,026	В	0,226
Вода		0,2		

MnSO <sub>4</sub> ·6·H <sub>2</sub> O	0,01	0,013	Закінчення таблиці 6.4.  Г	112
ZnSO <sub>4</sub>	0,002	0,0026		
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,01	0,013		
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,25	0,32		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	13		
Вода		88,6		
Конденсат		10		
Всього		1 300		

#### *ДР 5.4.1. Підготовка і стерилізація композиції А*

На об'ємно ваговому дозаторі (Д-24) зважують 52 кг глюкози і 6,5 кг дріжджового екстракту. Наважки поміщають у реактор-змішувач (Р-25), додають 987 л водопровідної води при постійному перемішуванні. Перемішування зупиняють, реактор-змішувач закривають і стерилізують 30 хв, при тиску 0,5 атм. і при температурі 112°C.

#### *ДР 5.4.2. Підготовка і стерилізація композиції Б*

На об'ємно ваговому дозаторі (Д-26) зважують 2,6 кг КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 2,6 кг К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>. Наважки поміщають у реактор-змішувач (Р-27), додають 34 л водопровідної води, перемішують. Перемішування зупиняють, реактор-змішувач закривають і стерилізують 40 хв, при тиску 0,5 атм. і при температурі 131°C.

#### *ДР 5.4.3 Підготовка і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 0,026 кг канаміцину. Наважку поміщають у колбу об'ємом 750 мл, додають 0,2 л дистильованої води, перемішують і пропускають через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм.

#### *ДР 5.4.4 Підготовка і стерилізація композиції Г*

На об'ємно ваговому дозаторі (Д-28) та аналітичних зважують 13 кг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,013 кг  $\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,013 кг  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,0026 кг  $\text{ZnSO}_4$ , 0,32 кг  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Наважку поміщають у реактор-змішувач (Р-29), додають 88,6 л водопровідної води, при постійному перемішування. Перемішування зупиняють, реактор-змішувач закривають і стерилізують 40 хв, при тиску 0,5 атм. і при температурі 131°C.

**ДР 5.5 Підготовка та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 20 м<sup>3</sup>**

Для культивування в ферментері об'ємом 20 м<sup>3</sup> необхідно приготувати 12 778 л поживного середовища. Вміст компонентів наведено у табл. 6.5.

Таблиця 6.5.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 12,778 м<sup>3</sup> середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 12 778 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	200 (дробне живлення)	511	А	11 247
Дріжджовий екстракт	5	64		
Вода		10 672		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	25,5	Б	429
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2	25,5		
Вода		378		
Канаміцин	0,02	0,25	В	2,15
Вода		1,9		
$\text{MnSO}_4 \cdot 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01	0,13	Г	1 100,5
$\text{ZnSO}_4$	0,002	0,025		

FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,01	0,13	<i>Закінчення таблиці 6.5.</i>	
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,25	3		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	128		
Вода		969,2		
Всього		12 778		12 778

*ДР 5.5.1. Підготовка композицій А, Б та Г для виробничого культивування.*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-30) зважують 511 кг глюкози, 64 кг дріжджового екстракту, 25,5 кг КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 25,5кг К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>, 128 кг (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,13 кг MnSO<sub>4</sub>·4-6·H<sub>2</sub>O, 0,13 FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0,025 кг ZnSO<sub>4</sub>, 3 кг MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O і поміщають у реактор-змішувач (Р-31) перед УБС, після чого додають 12 020 л водопровідної води, перемішують й надалі подають на стерилізацію до УБС.

*ДР 5.5.2. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 0,25 кг канаміцину і переносять у колбу об'ємом 4 л, після чого доливають 1,9 л дистильованої води, перемішують і пропускають через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Надалі композиція окремо подається у ферментер.

*ДР 5.5.3. Стерилізація композицій А, Б та Г в УБС-20*

Нестерильне поживне середовище із збірника перед УБС-20 перекачується за допомогою відцентрового насосу (НВ-32) у колонку швидкісного нагріву (К-33), де нагрівається парою до температури стерилізації. Далі поступає у теплообмінник-витримувач (ТВ-34), де витримується за температури 131 °С упродовж 10 хв. Далі поживне середовище поступає у теплообмінник-рекуператор (Т-35). Свіжі порції нестерильного поживного середовища поступають у теплообмінник-рекуператор, завдяки цьому відбувається нагрівання нестерильного поживного середовища та охолодження стерильного. Для кінцевого охолодження



поживне середовище надходить у теплообмінник, де охолоджується до температури культивування  $30 \pm 1$  °С, після цього стерильне та охолоджене середовище за допомогою відцентрового насоса подається у ферментер. Час стерилізації становить 38 хв.

### ***ТП 6. Підготовка посівного матеріалу***

#### *ТП.6.1. Підтримання колекційної культури*

Колекційну культуру *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 зберігають на скошеному МСА в холодильній камері при температурі 4°С, пересів здійснюють кожні 3 місяці. До початку біосинтезу культуру реанімують висівом у пробірку на скошеному МПА. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

#### *ТП 6.2. Одержання робочої культури з колекційної*

Колекційну культуру *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 відновлюють, в пробірках з МПА, розсівають мікробіологічною петлею на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 28–30 °С упродовж 72 годин.

#### *ТП 6.3. Одержання культури у колбах на качалках*

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 2 л додають весь об'єм розчину композиції А (від ДР 5.1.1), весь об'єм розчину композиції Б (від ДР 5.1.2), весь об'єм розчину композиції В (від ДР 5.1.3) і весь об'єм розчину композиції Г (від ДР 5.1.4) та протокатеховий розчин (від ДР 3.1). Загалом виходить 1 300 мл. Перемішують і розливають по 150 мл в вісім стерильних качальні колби об'ємом 750 мл. Параметри культивування: рН 7, температура  $30 \pm 2$  °С, тривалість 72 год. Через кожні 4 години проводиться відбір проб для контролю концентрації глюкози та сульфату азоту, а також мікробіологічного контролю.

#### *ТП 6.4. Одержання посівного матеріалу у інокуляторі на 20 л.*

В малий інокулятор (*ФР-39*) об'ємом 16 л, додають зі збірника весь об'єм приготованої композиції А (від *ДР 5.2.1*) де вона буде стерилізуватися, в асептичних умовах вносять весь об'єм приготованої та простерилізованої композиції Б (від *ДР 5.2.2.*), композиції В (від *ДР 5.2.3*), композиції Г (від *ДР 5.2.4*) та протокатеховий розчин (від *ДР 3.1*). Після цього додають посівний матеріал (від *ТП 6.3.*) через засівний пристрій відкривши вентиль і вмикають перемішуючий пристрій. В процесі культивування додають 6% NaOH для підтримання оптимального рН 7,0 (від *ДР 4.1*). Інокулятор обладнаний механічною системою піногасіння. Також подається стерильне повітря (від *ДР 2.7.*).

Параметри культивування : рН 7, температура  $30 \pm 2$  °С, тривалість 48 год. Через кожні 8 години проводиться відбір проб для контролю концентрації глюкози (вуглецю) та сульфату азоту (азоту), а також мікробіологічного контролю. Швидкість перемішування становить 180 об/хв.

В апараті створюється надлишковий тиск ( $P = 0,02 - 0,05$ ) подачею стерильного стисненого повітря.

Процес закінчують по досягненні 48 годин культивування. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 250 л.

#### *ТП 6.5. Одержання посівного матеріалу у інокуляторі на 250 л.*

В інокулятор (*ФР-41*) об'ємом 250 л, додають зі збірника весь об'єм приготованої композиції А (від *ДР 5.3.1*) де вона буде стерилізуватися, в асептичних умовах вносять весь об'єм приготованої та простерилізованої композиції Б (від *ДР 5.3.2.*), композиції В (від *ДР 5.3.3*), композиції Г (від *ДР 5.3.4*) та протокатеховий розчин (від *ДР 3.1*). Після цього перекачують за допомогою труби перетискування посівний матеріал (від *ТП 6.4.*). В процесі культивування додають 6% NaOH для підтримання оптимального рН 7,0 (від *ДР 4.2*). Інокулятор обладнаний механічною системою піногасіння. Також подається стерильне повітря (від *ДР 2.7.*).

Параметри культивування : рН 7, температура  $30 \pm 2$  °С, тривалість 48 год. Через кожні 8 години проводиться відбір проб для контролю концентрації глюкози (вуглецю) та сульфату азоту (азоту), а також мікробіологічного контролю. Швидкість перемішування становить 180 об/хв.

В апараті створюється надлишковий тиск ( $P = 0,02 - 0,05$ ) подачею стерильного стисненого повітря.

Процес закінчують по досягненні 48 годин культивування. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в середній інокулятор об'ємом  $2 \text{ м}^3$ .

*ТП 6.6. Одержання посівного матеріалу у інокуляторі на 2 000 л.*

В середній інокулятор (*ФР-43*) об'ємом  $2 \text{ м}^3$ , додають зі збірника весь об'єм приготованої композиції А (від *ДР 5.4.1*) де вона буде стерилізуватися, в асептичних умовах вносять весь об'єм приготованої та простерилізованої композиції Б (від *ДР 5.4.2.*), композиції В (від *ДР 5.4.3*), композиції Г (від *ДР 5.4.4*) та протокатеховий розчин (від *ДР 3.1*). Після цього перекачують за допомогою труби перетискування посівний матеріал (від *ТП 6.5.*). В процесі культивування додають 6% NaOH для підтримання оптимального рН 7,0 (від *ДР 4.3*). Інокулятор обладнаний механічною системою піногасіння. Також подається стерильне повітря (від *ДР 2.7.*).

Параметри культивування : рН 7, температура  $30 \pm 2$  °С, тривалість 48 год. Через кожні 8 години проводиться відбір проб для контролю концентрації глюкози (вуглецю) та сульфату азоту (азоту), а також мікробіологічного контролю. Швидкість перемішування становить 180 об/хв.

В апараті створюється надлишковий тиск ( $P = 0,02 - 0,05$ ) подачею стерильного стисненого повітря.

Процес закінчують по досягненні 48 годин культивування. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в ферментер об'ємом  $20 \text{ м}^3$ .

## **ТП 7. Виробничий біосинтез**

### *ТП 7.1. Виробниче культивування продуцента у ферментері на 20 м<sup>3</sup>.*

Виробниче культивування здійснюють у ферментері (ФР-45) з робочим об'ємом 20 м<sup>3</sup>. У попередньо простерилізований ферментер в асептичних умовах за допомогою відцентрового насоса вносять стерильне поживне середовище, що складається з композицій А, Б та Г (від ДР 5.5.3.), стерильну композицію В (від ДР 5.5.1) та протокатеховий розчин (від ДР 3.1) за допомогою спеціальних вентилів на гребінці. Через вентиль подають посівний матеріал (від ТП 6.6) і вмикають перемішуючий пристрій. В процесі культивування додають 6% NaOH та 6% HCl для підтримання оптимального рН 7,0 (від ДР 4.4; ДР 4.5). Перемішуючим пристроєм слугує лопатева мішалка закритого типу, якою обладнаний ферментер. Ферментер обладнаний механічною системою піногасіння. Також подається стерильне повітря (від ДР 2.7.). Тривалість виробничого культивування становить 160 годин. рН 7, температура  $30 \pm 2$  °С. Через кожні 8 години проводиться відбір проб для контролю концентрації глюкози (вуглецю) та сульфату азоту (азоту), а також мікробіологічного контролю. Швидкість перемішування становить 180 об/хв.

В апараті створюється надлишковий тиск ( $P = 0,02 - 0,05$ ) подачею стерильного стисненого повітря.

Процес біосинтезу завершують, коли концентрація амінокислоти досягає 96 г/л при кінцевій концентрації глюкози 200 г/л. Кінець технологічного процесу біосинтезу вважається передача культуральної рідини на стадію виділення.

## РОЗДІЛ 7.

### КОНТОРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

#### 7.1. Мікробіологічний контроль

Упродовж культивування періодично (кожні 4 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси і цільового продукту, а також вмісту джерела вуглецю (глюкози) і азоту (сульфат амонію) та стерильність ПС.

**Мікробіологічний контроль** здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами (МПА) і мікроскопіюванням. Мікроскопіювання проводиться для контролю МАФAM та БГКП, тобто перевірки культуральної рідини на контамінацію. Нижче наведено фотографії *C. glutamicum* ATCC 13032 під мікроскопом (рис. 7.1).



Рис. 7.1. *Corynebacterium glutamicum* під мікроскопом.

НУХТ БТЕК 04.01.23 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. КОНТОРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
								69
Розробив		Філь І.А.			Кафедра БТМ <sup>69</sup>			
Керівник		Сулейко Т.Л.						
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Культуральну рідину розсівають петлею на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для виявлення дріжджів і грибів.

Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, покривають накривним скельцем і розглядають під об'єктивом 40x, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою [25].

## **7.2. Ідентифікація та визначення концентрації цільового продукту**

**Концентрація біомаси.** Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка [26].

**Відділення біомаси.** Після закінчення індукції синтезу амінокислоти метіоніну культуральну рідину бактерій *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 біомасу розводять дистильованою водою у мірній колбі для подальших етапів.

**Дезінтеграція клітин.** Лабораторний клітинний дезінтегратор типу преса Френч

**Призначення.** Лабораторний екструзійний клітинний дезінтегратор призначений для дезінтеграції як бактеріальних, так і деяких еукаріотичних клітин (наприклад, клітин рослин), методом швидкої декомпресії при продавлюванні клітинної суспензії через вузьку щілину. Застосовуваний метод дезінтеграції клітин забезпечує швидку, ефективну, відтворену і порівняно м'яку дезінтеграцію в масштабах, необхідних для вирішення широкого кола науково-дослідних і прикладних задач. Руйнування клітинної стінки і плазматичної мембрани дозволяє витягувати необхідні субклітинні компоненти: білки (зокрема, ферменти), нуклеїнові кислоти, мембрани, органели. У науковій практиці дезінтегратор затребуваний при проведенні

досліджень в галузі молекулярної біології, біохімії, біофізики, імунології, генетики, мікробіології, цитології, а також в суміжних областях.

**Принцип функціонування.** Суспензія клітин в одноразовому або циклічному режимі автоматично засмоктується плунжером через вхідний клапан в робочий циліндр дезінтеграційних головки, звідки видавлюється пресом через вузьку щілину. Поперечні сили, що виникають при падінні тиску до атмосферного при проходженні клітинами щілини, призводять до руйнування клітинної стінки і мембрани [26].

**Центрифугування.** Одержаний дезінтеграції центрифугують 10 хв при 10 000 об/хв для відділення уламків клітин.

### 7.2.1. Ідентифікація метіоніну

Одним із способів ідентифікації амінокислот є використання спеціальних приладів – аналізаторів. Для ідентифікації метіоніну буде використаний амінокислотний аналізатор “AAA-400” в основі роботи якого закладений принцип рідинної іонообмінної хроматографії. Даний прилад дає змогу ідентифікувати до 200 амінокислот, як вільних так і зв’язаних, в тому ж числі і сірковмісних, а отже він ідеально підходить для визначення, оскільки метіонін це сірковмісна амінокислота. Для початку аналізу необхідно внести досліджуваний зразок в спеціальну лунку, після чого прилад почне автоматично аналізувати й видасть графік (рис.5.2.), вже по якому можна буде визначити амінокислоти [27].

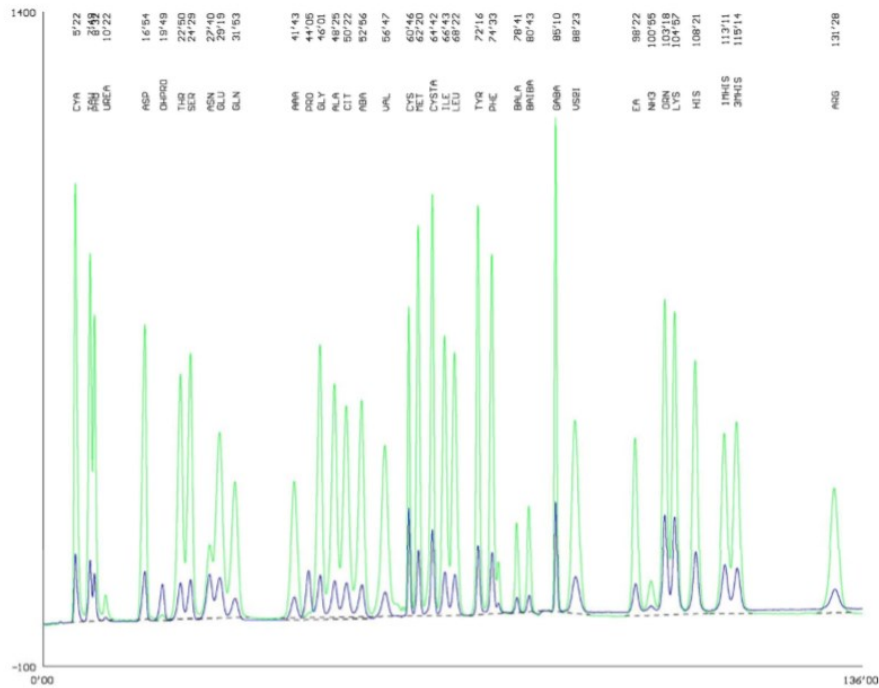


Рис.7.2. Графік аналізатора амінокислот

## 7.2.2. Визначення кількості метіоніну

### Метод формольного титрування

Карбоксильні групи амінокислот можна визначити титруванням їх у спиртовому середовищі, оскільки в цих умовах дисоціація аміногруп зведена до мінімуму. Мінімальної дисоціації за аміногрупами можна досягнути додаванням формальдегіду у водному середовищі. N-диоксиметиламінокислоти, що утворюються, дисоціюють і титруються, як звичайні карбонові кислоти [28].

**Хід визначення.** 2см<sup>3</sup> досліджуваної витяжки амінокислот змішують з 18 см<sup>3</sup> води і 5 краплями 0,04%-го розчину бромтимолу синього. Суміш нейтралізують до рН 7,0, додаючи по краплинах 0,05 н розчин НС1, якщо суміш синя, або 0,05 н розчин NaOH, якщо вона жовтого кольору. Після доведення кислотності дослідного розчину до рН 7,0 (забарвлення розчину слабо-зелене) із мірного циліндра додають 2 см<sup>3</sup> формольної суміші і титрують з мікробюретки 0,05 н розчином NaOH до добре вираженого синьо-



фіолетового кольору розчину. Для введення поправки паралельно титрують дистильовану воду (контрольний дослід) [29].

Для збільшення надійності визначення, колір дослідного розчину при рН 7,0 та рН 9,2 порівнюють з еталонними розчинами буферних сумішей вказаних значень рН.

Різниця між кількістю луку, що пішов на титрування дослідного та контрольного розчинів, помножена на 0,7, відповідає кількості міліграмів азоту амінокислот у 2 см<sup>3</sup> досліджуваної рідини (вважають, що кількість титрованих карбоксильних груп еквівалентна кількості зв'язаних формальдегідом змінних груп) [29].

### **7.2.3.Визначення амінного азоту мідним способом**

Хімізм процесу при визначенні амінного азоту мідним способом полягає в тому, що при взаємодії амінокислот з суспензією фосфату міді утворюються забарвлені в синій колір добре розчинні комплексні мідні солі амінокислот.

У фільтраті після відділення надлишку фосфату міді залишаються мідні солі амінокислот, а отже, за кількістю міді, що перейшла в фільтрат, можна визначити вміст амінокислот.

При додаванні до фільтрату концентрованої оцтової кислоти остання витісняє з мідної солі більш слабку амінокислоту:

Концентрацію йоду, що виділився, еквівалентну кількості мідних солей амінокислот, визначають титруванням розчином гіпосульфїту:

**Хід роботи.** У мірну колбу на 25 см<sup>3</sup> беруть 2 см<sup>3</sup> досліджуваного розчину (наприклад 1% -го розчину гліцину), додають 2 краплі тимолфталеїну і по краплях 0,5 н розчин гідроксиду натрію доводять до слабо-блакитного кольору (рН розчину 10,2). Після цього додають 10 см<sup>3</sup> суспензії фосфату міді і добре перемішують. Після зникнення осаду слід додати ще 5 см<sup>3</sup> суспензії. Розчин у колбі доводять водою до позначки, добре перемішують багаторазовим перевертанням колби і осад відфільтровують

крізь щільний фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим, цього досягають багаторазовим фільтруванням. З фільтрату беруть дві проби по 10 см<sup>3</sup> у конічні колби для титрування, підкислюють 0,4 см<sup>3</sup> концентрованої оцтової кислоти, додають 6...8 см<sup>3</sup> 10 %-го розчину йодиду калію; йод, що виділився, титрують 0,01 н розчином гіпосульфїту; 1 см<sup>3</sup> крохмалю додають тоді, коли розчин, що титрують, стане солом'яно-жовтим. Паралельно готують контроль, в який замість досліджуваного розчину додають 2 см<sup>3</sup> води.

Відповідно до наведених рівнянь реакції 0,5 моля йоду що виділився, відповідає 1 молю міді, який еквівалентний 28 г амінного азоту; 0,5 моля йоду реагує з 1 – грам – еквівалентом гіпосульфїту.

Таким чином, 1 см<sup>3</sup> 0,01 н розчину гіпосульфїту відповідає 0,28 мг амінного азоту.

Множенням 0,28 мг на витрачений об'єм 0,01 н розчину гіпосульфату (мінус контроль) отримують кількість міліграмів амінного азоту у взятому об'ємі (10 см<sup>3</sup>) досліджуваного розчину. Якщо на титрування був взятий розчин відомої амінокислоти, порівнюють отриманий результат з теоретичним вмістом азоту в даній амінокислоті [29-30]

#### **7.2.4. Визначення джерела вуглецю.**

Відбирають пробу культуральної рідини й фільтрують, щоб відділити біомасу для проведення глюкозооксидазного методу [30].

**Глюкозооксидазний метод визначення глюкози** ґрунтується на реакції глюкози в присутності ферменту глюкозооксидази яка окислюється киснем з утворенням в ході реакції перекису водню. Перекис водню в присутності ферменту пероксидази окисляє ортотолуїдин з утворенням забарвленого з'єднання, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту глюкози.

**Необхідні реактиви для визначення глюкози глюкозооксидазним методом:**

1. Натрію хлориду 9 г / л (ізотонічний розчин): готують, розчиняючи 0,9 г NaCl в 100 мл води.
2. Цинку сульфат, 50 г / л: 5 г сульфату цинку (ZnSO<sub>4</sub>) розчиняють у воді, об'єм доводять до 100 мл.
3. Натр їдкий, 0,3 моль / л: готують, розчиняючи 1,2 г NaOH в 100 мл води, концентрацію перевіряють титруванням (вона повинна бути 0,3 н).
4. Ортолуїдин, 1% -ний розчин: 1 г препарату розчиняють в 100 мл абсолютного спирту. Розчин можна зберігати в холодильнику в склянці з притертою пробкою кілька місяців. Наявний у продажу препарат можна очистити перекристалізацію, для чого його розчиняють в абсолютному спирті, додають воду і кристали що випали фільтрують, потім сушать над хлоридом кальцію.
5. Ацетатний буферний розчин рН 4,8: змішують 4 частини 0,25 н оцтової кислоти (перевірити титруванням) і 6 частин 0,25 н ацетату натрію (містить 34 г CH<sub>3</sub>COONa X 3H<sub>2</sub>O в 1 літрі).
6. Глюкозооксидаза — сухий препарат активністю 3000 од / мг або більше.
7. Пероксидаза з хрому. 1 мг розчиняють в 5 мл ацетатного буфера, в холодильнику можна зберігати кілька днів.
8. Робочий реактив: в 80 мл ацетатного буфера розчиняють 2 мг глюкозооксидази і 1 мг пероксидази, додають 1 мл 1% -ного розчину ортолуїдина, перемішують і доводять обсяг буферним розчином до 100 мл. Робочий реактив повинен бути прозорим, безбарвним або мати слабо-зелений відтінок, в цьому випадку він стійкий при зберіганні на холоді. Якщо ж забарвлення інтенсивна або через кілька годин після приготування починає випадати осад, це означає, що ортолуїдин недостатньо чистий і його треба перекристалізувати [30].

**Хід визначення глюкози глюкозооксидазним методом:** У центрифужні пробірки вносять 1,1 мл розчину хлориду натрію, 0,4 мл розчину сульфату цинку і 0,4 мл 0,3 н розчину NaOH, перемішують, при цьому утворюється дуже тонкий гель гідрату окису цинку, в нього випускають 0,1 мл фільтрату, знову перемішують і через 10 хвилин центрифугують при швидкості 3000 об. / хв протягом 10 хвилин. До 1 мл надосадової рідини додають 3 мл робочого реактиву і обережно перемішують.

Поступово починає з'являтися забарвлення, яке при звичайній кімнатній температурі досягає максимуму через 13-15 хвилин, а потім поступово зменшується. Фотометрують завжди через один і той же проміжок часу після додавання робочого реактиву в кюветах з довжиною оптичного шляху 1 сантиметр з червоним світлофільтром (довжина хвилі 625 нм) проти контролю, який ставлять одночасно з робочими пробами [30].

#### **7.2.5. Визначення концентрації азоту.**

Відбирають пробу культуральної рідини й фільтрують, щоб відділити біомасу для проведення методу Несслера [31].

Джерелом азоту в середовищі для культивування *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 є сульфат амонію.

**Метод Несслера** базується на утворенні забарвленої важкорозчинної сполуки при взаємодії реактиву Несслера ( $K_2HgI_4$ ) з аміаком в нейтральних або лужних розчинах:  $2HgI_4 + NH_3 + OH = NH_2Hg_2I_3 + 5I + H_2O$ .

Великого надлишку луку слід уникати, оскільки може відбутися розкладання  $NH_2Hg_2I_3$  з утворенням оксиду ртуті. Забарвлена сполука  $NH_2Hg_2I_3$  схильна до утворення негативно заряджених колоїдних частинок. Для отримання рівномірної і стійкої суспензії в розчин вводять захисний колоїд – желатин, полівініловий спирт. При малих концентраціях аміаку колоїдні розчини мають жовте забарвлення, при збільшенні концентрації з'являється бурий відтінок. Отримання в ході аналізу колоїдних розчинів,

здатних до коагуляції, знижує відтворюваність результатів аналізу, одержуваних методом Несслера [31-32].

Для визначення аміаку до 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 1 мл реактиву Несслера. Коефіцієнт екстинції вимірюють при довжині хвилі 400–425 нм. Концентрацію аміаку визначають за калібрувальним графіком. Фотометричному визначенню азоту методом Несслера заважають іони, що випадають в осад у лужному середовищі і утворюють нерозчинні сполуки з йодид - іонами та іонами ртуті (магній, марганець, залізо, титан, сульфід-іони та ін.) [32].

## 7.3. Карта постадійного контролю біосинтезу метіоніну

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх. 1.2.1. Приготування робочого розчину «Еко-хлор»	Концентрація розчину «Еко-хлор»	Контроль хімічний	Після приготування розчину	C = 1%.
Кх. 1.2.2. Приготування робочого розчину «Біопагdez»	Концентрація розчину «Біопагdez»	Контроль хімічний	Після приготування розчину	C = 0,1%
Кт. 1.4.1. Миття обладнання розчином еко-хлору	Мийний розчин, обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції	t = 50 °C, τ = 30 хв
Кт.1.4.2. Ополіскування обладнання	Обладнання, температура води для ополіскування	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції	t = 20°C, τ = 10 хв

Кт.1.4.4. Перевірка обладнання на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск та температура визначається безперервно під час перевірки на герметичність	$P = 0,2 \text{ МПа}$ , $\tau = 1,5 - 2 \text{ год}$ , $t = 80^\circ\text{C}$
Кт.1.4.5. Стерилізація обладнання та комунікацій	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск та температура визначається безперервно під час стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$ , $t = 130^\circ\text{C}$ , $\tau = 40 \text{ хв}$
Кт 2.2. Очищення повітря від пилу та механічних домішок	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 90 \%$ , тиск згідно паспорту
Кт 2.3. Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр технічний	Після компресування повітря	$P = 0,35 - 0,5 \text{ МПа}$ $t = 120 - 200^\circ\text{C}$
Кт 2.4. Охолодження стиснутого повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, температура, повітря після видалення зайвої вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря, після видалення зайвої вологи	$t = 25^\circ\text{C}$ , $W = 60 \%$

Кт 2.5. Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура, вологість повітря	Термометр технічний, психрометричний метод	Після нагрівання повітря	$t = 35^{\circ}\text{C}$ $W = 30\text{--}60\%$
Кт 2.6. Очищення повітря на фільтрах тонкого очищення	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	$E = 99,995\%$ , тиск згідно паспорту
Кт 2.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	$E = 99,99995\%$ , тиск згідно паспорту
Кт,Км 3.1. Стерилізація протокатехового розчину	Протокатеховий розчин, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , $P = 0,05\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти
Кт,Км 3.2. Стерилізація глюкози для дробного живлення	Розчин глюкози, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , $P = 0,05\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1. Стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , $P = 0,05\text{ МПа}$ , відсутність мікробіоти



Кт, Км 4.1.2. Стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність, тиск	Манометр, технічний годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3. Стерилізація композиції В	Композиція В, стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль визначають після стерилізації	відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.4. Стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, технічний годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв, $P = 0,05$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, технічний годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв, $P = 0,05$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2. Стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, технічний годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.3. Стерилізація композиції В	Композиція В, стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль визначають після стерилізації	відсутність мікробіоти

Кт, Км 4.2.4. Стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, технічний годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, технічний годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв, $P = 0,05$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2. Стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, тиск, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.3. Стерилізація композиції В	Композиція В, стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль визначають після стерилізації	відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.4. Стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, технічний годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1 Стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, технічний годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв, $P = 0,05$ МПа, відсутність мікробіоти

т, Км 4.4.2. Стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, тиск, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.3. Стерилізація композиції В	Композиція В, стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль визначають після стерилізації	відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.4. Стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, технічний годинник, термометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, $P = 0,15$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт 4.5.1. Приготування композицій А,Б,Г для виробничого культивування	Компоненти композицій А,Б,Г, температура, час	Годинник	Час визначається моменту початку перемішування і до його закінчення	$\tau = 15$ хв
Кт, Км 4.5.2. Стерилізація композиції В	Композиція В, стерильність	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль визначають після стерилізації	відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.3 Стерилізація поживного середовища в УБС-20	Компоненти композицій А,Б,Г, час, температура, стерильність	Манометр технічний, мікробіологічний контроль, об'ємно ваговий дозатор	Визначають час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 39$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1. Підтримання колекційної культури	Температура, час, асептичність	Термометр технічний, мікробіологічний контроль	Температура, час та зовнішній вигляд визначається безперервно під час підтримання культури	$t = 3-4^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 3$ місяці., відсутність сторонньої мікробіоти

Км, Кт 5.2. Одержання робочої культури з колекційної	Температура, час, асептичність	Термомотр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і зовнішній вигляд визначається під час виробничого процесу. Мікробіологічний контроль по закінченню процесу	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 48$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 48$ год, $w = 240$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 5.4 Вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 48$ год, $w = 180$ об/хв., $P = 0,05$ МПа, $\text{pH} = 7$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу	$t = 30^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 48$ год, $w = 180$ об/хв., $P = 0,05$ МПа, $\text{pH} = 7$ відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Км 5.6. Вирощування посівного матеріалу в середньому інокуляторі</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу</p>	<p><math>t = 30^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 48</math> год, <math>w = 180</math> об/хв., <math>P = 0,05</math> МПа, <math>\text{pH} = 7</math> відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 6.1. Виробниче культивування</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість культивування швидкість перемішування, активність ксиланази, <math>\text{pH}</math>, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, <math>\text{pH}</math> метр, колориметричний метод</p>	<p>Під час вирощування культури у ферментері. Відбір проби культуральної рідини відбувається кожні 8 год</p>	<p><math>t = 30^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 160</math> год, <math>w = 180</math> об/хв., <math>P = 0,05</math> МПа, <math>\text{pH} = 7</math>, <math>A = 96</math> мл/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Кваша Т.К., Паладченко О.Ф.* Розвиток біотехнології як пріоритетного напрямку розвитку української економіки. [Електронний ресурс]: - Режим доступу: [http://www.uintai.kiev.ua/viewpage.php?page\\_id=300](http://www.uintai.kiev.ua/viewpage.php?page_id=300)
2. Біотехнологія як наука. [Електронний ресурс]: - Режим доступу: [http://ua-referat.com/Біотехнологія\\_як\\_наука](http://ua-referat.com/Біотехнологія_як_наука)
3. Роль метіоніна. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <http://biokhimija.ru/narushenie-aminokislot/rol-metionina.html>
4. Метіонін біологічна роль. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <http://www.plasma.com.ua/ua/chemistry/chemistry/methionin.html>
5. Гельфанд Михаил Сергеевич, Ковалева Галина Юрьевна. Способ исследования и прогнозирования пути биосинтеза метионина в родственных геномах коринебактерий.[Електронний ресурс]- Режим доступу: <http://www.findpatent.ru/patent/230/2307169.html>
6. Среды и добавки. [Електронний ресурс]- Режим доступу: [http://molbiol.edu.ru/solution/03\\_05.html](http://molbiol.edu.ru/solution/03_05.html)
7. Ekaterina A. Kutukova, Vitaliy A. Livshits, Irina P. Altman, Leonid R. Ptitsyn, Michael H. Ziyatdinov, Irina L. Tokmakova, Natalia P. Zakataeva. FEBS Letters // The *yeaS (leuE)* gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression, 1 August 2005, Volume 579, Issue 21, p. 4629–4634
8. ЦЕЛЬДЕР Оскар (DE), КЛОППРОГГЕ Корінна (DE), Хефнер Штефан (DE), Херольду Андреа (DE), Йокум Роджерс Р. (US), ПЕРО Дженіс Г. (US), Шродер Хартвиг (DE), УІЛЬЯМС Марк К. (US), Паттерсон Томас А. (US), Херманом Терон (US). Рекомбинантные микроорганизмы,

- продуцируючі метіонін. [Електронний ресурс]- Режим доступу: <http://www.findpatent.ru/patent/244/2447146.html>
9. Matthias Boy, Daniela Klein, Hartwig Schröder. Пат. №US7785846 B2, Method for the production of methionine- опублік. 31 сер. 2010
10. S.Mondal, Y. B. Das, S.P.Chatterjee. L-Methionine production by double auxotrophic mutants of a methionine resistant strain of *Brevibacterium heali*. [Електронний ресурс]- Режим доступу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/abio.370140111/full>
11. Learn more about Corynebacterium. [Електронний ресурс]- Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/corynebacterium>
12. Corynebacterium glutamicum під мікроскопом. [Електронний ресурс]- Режим доступу: <https://www.flickr.com/photos/adonofrio/6269417254>
13. Corynebacterium glutamicum під електронним мікроскопом. [Електронний ресурс]- Режим доступу: [https://www.researchgate.net/figure/Raster-electron-micrograph-of-Corynebacterium-glutamicum-ATCC-13032-cultivated-on-minimal\\_fig1\\_226733562](https://www.researchgate.net/figure/Raster-electron-micrograph-of-Corynebacterium-glutamicum-ATCC-13032-cultivated-on-minimal_fig1_226733562)
14. Коринебактерии классификация. [Електронний ресурс]- Режим доступу: <https://studfiles.net/preview/6878370/page:66/>
15. Определитель бактерий Берги. – 10-е изд. / Пер. под. ред. Г.А. Заварзина. – М.: Мир. – 2005. – Т. 2. – 580 с.
16. Определитель бактерий Берги. – 9-е изд. / Пер. под. ред. Г.А. Заварзина. – М.: Мир. – 1997. – Т. 2. – 800 с.
17. Метіонін. Функції в організмі. [Електронний ресурс]: - Режим доступу: <https://foodandhealth.ru/komponenty-pitaniya/metionin/>
18. Технологія біосинтезу амінокислот. [Електронний ресурс]- Режим доступу: [http://ua-referat.com/Технологія\\_біосинтезу\\_амінокислот](http://ua-referat.com/Технологія_біосинтезу_амінокислот)

19. Алкоголізм в Україні. Статистика і цифри. [Електронний ресурс]: - Режим доступу: <https://moi-vybor.com.ua/uk/article/alkogolizm-v-ukrayini-statystyka-i-cyfrы>
20. Підручник: Біосинтез амінокислот мікроорганізмами. *Рубан Е.Л.* і ін. М.: Наука, 1968
21. Підручник: *Калуняц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е.* Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с.
22. *Карлаш Ю.В.* Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш - К: НУХТ, 2013 – 143 с.
23. Фільтруючий матеріал G4 від New Filter. [Електронний ресурс]: - Режим доступу: <http://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html>
24. Класифікація повітряних фільтрів. [Електронний ресурс]: - Режим доступу: <http://tehnofilter.com.ua/filtry-vozdushnyye>
25. *Пирог Т.П.* Загальна мікробіологія. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
26. Лабораторний клітинний дезінтегратор типу преса Френча. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: [http://www.ibp-ran.ru/pribory\\_i\\_prinadlejnosti\\_dlya\\_issledovaniya\\_kletki/kletochniy\\_dezintegrator/laboratorniy\\_kletochniy\\_dezintegrator\\_tipa\\_pressa\\_frencha/](http://www.ibp-ran.ru/pribory_i_prinadlejnosti_dlya_issledovaniya_kletki/kletochniy_dezintegrator/laboratorniy_kletochniy_dezintegrator_tipa_pressa_frencha/)
27. Анализатор аминокислот “AAA-400”. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: [http://www.analytica.com.ua/AAA\\_400.htm](http://www.analytica.com.ua/AAA_400.htm)
28. Метіонін основна інформація. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <https://wirud.ru/wp-content/uploads/2017/03/methionine.pdf>
29. Лікарські речовини. Виготовлення амінокислот аліфатичного ряду. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <http://pharmchem.nuph.edu.ua>



- 30.** \_Метод формольного титрування. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <http://um.co.ua/9/9-9/9-9324.html>
- 31.** \_Глюкозооксидазний метод визначення глюкози. [Електронний ресурс]: – Режим доступу: <http://meduk.net.ua/archives/23315>
- 32.** \_Підручник: *Юрченко О.І., Дрозд А.В., Бугаєвський О.А.* Аналітична хімія. Загальні положення. Якісний аналіз. – Харків: ХНУ, 2002. – 123 с.