

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему:
«Технологія біосинтезу метіоніну»

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія

Виконав: студент групи ББТ-21

Бруслік Д. Д.

Науковий керівник:

к.т.н., доц. Охмат О. А.

Рецензент:

к.т.н., доц. Волошина І. М.

Київ 2025

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА

«__» _____ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ**

Брусліку Данілі Денисовичу

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

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	20.05.2025	
2	Розділ 1 Техніко-економічне обґрунтування	30.03.2025	
3	Розділ 2 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	30.04.2025	
4	Розділ 3 Характеристика біологічного агента	30.04.2025	
5	Розділ 4 Опис технологічної схеми	15.05.2025	
6	Розділ 5 Контроль якості	20.05.2025	
7	Висновки	22.05.2025	
8	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)	09.06.2025	
9	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку	10.06.2025	
10	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 14 днів дозахисту)	11.06.2025	
11	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		Коефіцієнт подібності ____% Коефіцієнт цитування ____%
12	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Даніла БРУСЛІК

Науковий керівник _____ Олена ОХМАТ

АНОТАЦІЯ

Бруслік Д. Д. Технологія біосинтезу метіоніну – Рукопис.

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

У кваліфікаційній роботі представлена технологія біосинтезу метіоніну шляхом культивування штаму *продуценту Corynebacterium glutamicum* MB001. У роботі розрахована потужність виробництва, обґрунтовано вибір біологічного агенту, визначено оптимальний склад поживного середовища та наведені умови культивування, обрано технологічне обладнання для реалізації стадії біосинтезу. основні етапи технологічної схеми біосинтезу метіоніну налічують стадію допоміжних робіт, стадію здійснення технологічного процесу, стадію контролю.

Ключові слова: метіонін, амінокислота, Corynebacterium glutamicum MB001, біосинтез.

ABSTRACT

Bruslik D. D. Technology of Methionine Biosynthesis – Manuscript.

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

This manuscript presents the technology of methionine biosynthesis through the cultivation of the *Corynebacterium glutamicum* MB001 strain. It calculates the production capacity, substantiates the choice of biological agent, determines the optimal composition of the culture medium, and presents the cultivation conditions. It also selects the technological equipment necessary for implementing the biosynthesis stage.

The main stages of the methionine biosynthesis technological scheme include the auxiliary work stage, the technological process implementation stage, and the control stage.

Keywords: methionine, amino acid, Corynebacterium glutamicum MB001, *biosynthesis*.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1	8
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	8
1.1 Загальна характеристика метіоніну	8
1.2 Потреба у цільовому продукті.....	9
1.3 Розрахунок потужності виробництва	9
1.3.1 Розрахунок кількості метіоніну для забезпечення харчування великої рогатої худоби	9
1.3.2 Розрахунок кількості метіоніну для забезпечення харчування великої рогатої худоби	9
1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання необхідного об'єму культуральної рідини для забезпечення річної потреби в цільовому продукті та розрахунок об'єму ферментера.....	10
РОЗДІЛ 2	11
ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА.....	11
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища	11
2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу.....	14
2.2.1 Обґрунтування вибору ферментера	14
2.2.2 Обґрунтування вибору миючих та дезінфікуючих засобів	15
2.2.3 Обґрунтування стадій підготовки повітря	17
2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу, підготовка поживного середовища та параметри стерилізації.....	18
2.3.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	18
2.3.2 Вирощування посівного матеріалу в колбах.....	19

2.3.3 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л	19
2.3.4 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л	20
2.3.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 500 л	20
2.3.6 Вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 5 м ³	20
РОЗДІЛ 3	22
ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	22
3.1 Таксономічний статус	22
3.2 Морфолого-культуральні властивості	22
3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки	23
РОЗДІЛ 4	24
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	24
РОЗДІЛ 5	38
КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ	38
5.1 Мікробіологічний контроль	38
5.2 Визначення концентрації біомаси у культуральній рідині	38
5.2.1 Ідентифікація метіоніну	39
5.2.2 Визначення кількості метіоніну	40
5.3 Визначення концентрації азоту	40
ВИСНОВКИ	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	43

ВСТУП

Метіонін – незамінна амінокислота, яка відіграє дуже важливу роль у функціонуванні організму людини. Завдяки своїм властивостям метіонін широко застосовується в медицині для регулювання діяльності печінки, так як він спричиняє зниження токсичного впливу важких металів і стимулює синтез глутатіону – важливого для організму антиоксиданту, який захищає клітину від пошкоджень. Крім того, метіонін застосовується для корекції дефіциту амінокислот, зокрема для лікування захворювань, які супроводжуються білковою недостатністю. Метіонін застосовують як харчову добавку для тварин, що викликає їхній розвиток та ріст.

Сучасні методи синтезу метіоніну, такі як хімічні та біотехнологічні, відіграють важливу роль у забезпеченні потреб харчової та фармацевтичної галузей, адже попит на метіонін з кожним роком зростає. Виробництво організовують в умовах, які мінімізують мікробіологічне забруднення, забезпечуючи високу якість препарату для медичних та харчових цілей.

Застосування метіоніну дозволяє створювати препарати, які вдосконалюють функції організму завдяки його унікальним властивостям. Метіонін має ряд переваг: бере участь у синтезі антиоксидантів, сприяє детоксикації організму, зменшуючи вплив токсичних речовин і важких металів; підтримує та покращує роботу печінки, особливо при отруєнні; сприяє підвищенню якості життя тварин агропромислового комплексу.

Актуальність теми: На сьогоднішній день в Україні функціонують два підприємства, які виробляють метіонін для потреб фармацевтичної галузі, і відсутні підприємства, які б виробляли метіонін для агропромислового комплексу. Більшість амінокислот імпортується в Україну. А отже, впровадження на вітчизняних біотехнологічних підприємствах ресурсоощадної технології біосинтезу метіоніну є досить актуальним.

Метою роботи є розробка технології біосинтезу метіоніну за допомогою генетично модифікованого штаму *Corynebacterium glutamicum* MB001.

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати наукову літературу для вдосконалення технології біосинтезу метіоніну;
2. Провести порівняння штамів продуцентів для реалізації біосинтезу метіоніну;
3. Обрати оптимальний склад поживного середовища для забезпечення найбільшого виходу метіоніну;
4. Обґрунтувати стадії технологічного процесу біосинтезу метіоніну;
5. Обрати методи контроль якості.

Об'єкт дослідження – закономірності біосинтезу метіоніну при культивуванні штаму *Corynebacterium glutamicum* MB001.

Предмет дослідження – реалізація технології біосинтезу метіоніну за умови культивування штаму *Corynebacterium glutamicum* MB001.

Методи дослідження. В роботі використані методи опису, порівняння та узагальнення науково-технічних даних.

Практичне значення роботи обумовлене імпортозалежністю вітчизняного ринку метіоніну.

Наукова новизна полягає у використанні генно-модифікованого штаму *Corynebacterium glutamicum* MB001 для біосинтезу метіоніну.

Апробація результатів. Участь в роботі наукової конференції міжнародного рівня (ДБУ, Харків, 14–15 травня 2025 р.).

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

Структура і обсяг роботи. Обсяг основної частини кваліфікаційної роботи складає 4 аркушах, що містять вступ, 5 розділів, висновки, список використаних джерел та додаток. Графічна частина (технологічна схема) роботи розміщена на аркуші формату А1.

РОЗДІЛ 1

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

1.1 Загальна характеристика метіоніну

Метіонін є незамінною амінокислотою (α -амінокислота, сірковмісна амінокислота). Органами людини метіонін не синтезується. Потреби організму людини в метіоніні забезпечуються через вживання риби, м'яса, молочних продуктів, бобових, горіхів та інших продуктів або спеціальних харчових добавок [1–3]. При застосуванні метіоніну при відгодівлі тварин, птахів сприяє покращенню обміну речовин, росту та збільшенню продуктивності та покращенню здоров'я тварин.

Хімічна формула метіоніну: $C_5H_{11}NO_2S$. Структурна формула метіоніну зображена на рис 1.1

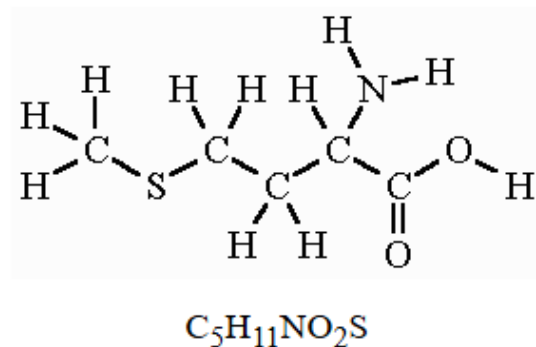


Рисунок 1.1 – Структурна формула Метіоніну

Хімічні та фізичні властивості метіоніну:

1. Зовнішній вигляд: білий або світло-бежевий кристалічний порошок.
2. Молекулярна маса: 149,21 г/моль.
3. Температура плавлення: 281 °C.
4. Розчинний у воді, але розчинність залежить від рівня рН (наприклад, помірно розчинний у воді при нейтральному значення рН).
5. Метіонін неполярна (гідрофобна) амінокислота.
6. Метіонін існує у вигляді L- та D-ізомерів. L-ізомер є біологічно-активною формою, використовуваною для біосинтезу білків.

1.2 Потреба у цільовому продукті

Метіонін є незамінною амінокислотою, яка є важливою для нормального росту, розвитку та продуктивності сільськогосподарських тварин, оскільки організм тварини не в змозі синтезувати її самостійно. У відгодівлі птиці та великої рогатої худоби метіонін допомагає забезпечити оптимальний баланс амінокислот, який необхідний для синтезу білка, нормалізації метаболізму та покращення загального стану здоров'я птахів та тварин. Метіонін підтримує процеси росту, зменшує витрати на корм та підвищує ефективність виробництва, що є важливим для забезпечення економічної вигоди у сільському господарстві [4].

1.3 Розрахунок потужності виробництва

1.3.1 Розрахунок кількості метіоніну для забезпечення харчування великої рогатої худоби

Вважаймо, що добова доза метіоніну для харчування однієї корови становить 3,73 г.

Вважаємо, що в Україні поголів'я великої рогатої худоби, що споживає кормові добавки, складає приблизно 580000 голів. Враховуючи конкуренцію на ринку метіоніну, розрахунок у роботі ведемо для 1 агропромислового підприємства, яке налічує 1500 голів великої рогатої худоби.

Оскільки одна тварина в середньому на добу споживає 3,73 г метіоніну, то 1500 корів – 5,595 кг. Забезпечення усіх голів метіоніном на добу за рік становитиме 2042,175 тонн.

1.3.2 Розрахунок кількості метіоніну для забезпечення харчування великої рогатої худоби

За 72 години продуцент *C.glutamicum* MB001 синтезує 5 г/л метіоніну. Розрахуємо річний вихід метіоніну.

$$V_{\text{кр0}} = 2042175 \text{ г} / 5 \text{ г/л} = 408435 \text{ л}$$

Необхідна кількість культуральної рідини (враховуючи витрати у розмірі 20 %) складає :

$$V_{кр} = 408435 \text{ л} / (1-0,2) = 510543,75 \text{ л}$$

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

Необхідна кількість культуральної рідини за умови кількості робочих днів у році ($T_{рд}$) = 365:

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 510543,75 / 365 \approx 1400 \text{ л}$$

Визначаємо кількість виробничих циклів ферментації на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_d \times T_{цф}) / 24) = 510543,75 / ((1400 \times 52) / 24) = 168,3 = 169 \text{ циклів.}$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{крц}$):

$$V_{крц} = K_1 \times V_d \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 1400 \times 52 / 24 \approx 3337 \text{ л}$$

Геометричний об'єм ферментера для отримання 3337 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,8 має становити:

$$V_{Г} = V_{крц} / K_{зап} = 3337 / 0,8 \approx 4171,25 \text{ л} = 4,2 \text{ м}^3$$

Оскільки ферментерів з таким об'ємом немає, ми обираємо ферментер на 5 м^3 та надлишок виробленого метіоніну будемо реалізовувати на інші підприємства, або на експорт.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища

Для промислового виробництва метіоніну шляхом ферментації використовують штами продуценти *Corynebacterium glutamicum*.

Використовуючи різні генно-інженерні методики, можна отримати штами, які збільшують вихід цільового продукту і/або пришвидшують процес його біосинтезу. Слід враховувати, що вибираючи штам продуцента для отримання продукту, необхідно звернути увагу не тільки на кількість вихідного продукту, а ще й на вартість поживного середовища і додаткові витрати.

В роботі запропоноване використання високопродуктивного генно-модифікованого штаму *Corynebacterium glutamicum* MB001, який є вдосконаленою модифікацією штаму *C. glutamicum* ATCC 13032. *C. glutamicum* ATCC 13032 відомий своєю здатністю ефективно продукувати амінокислоти. При модифікації зі штаму *C. glutamicum* ATCC 13032 успішно вилучили всі три профаги, які інтегровані вірусним ДНК, присутні у геномі штаму. Штам *C. glutamicum* ATCC 13032 мав нестабільний геном, що є небажаним при застосуванні у промисловому виробництві, але штам *C. glutamicum* MB001 позбавлений цієї проблеми і має вищу ефективність до трансформації, що робить його легшим до генетичних модифікацій і виходу кінцевого продукту.

У табл. 2.1 ми порівняли 3 штами з найбільшою кількістю цільового продукту. А саме: *Corynebacterium glutamicum* MB001, *Corynebacterium glutamicum*-1, *E.coli* 218 [5-10].

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів метіоніну

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Вихід продукту, г/л	Умови культивування	Джерело
<i>Corynebacterium glutamicum</i> MB001	М'яса – 40 CaCO ₃ – 25 MgSO ₄ – 0,2 FeSO ₄ – 0,02 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 12 Біотин – 0,0002	5	Температура 30 ⁰ С Час культивування 72 год рН – 7.3	5,6
<i>Corynebacterium glutamicum-1</i>	KH ₂ PO ₄ – 2 K ₂ HPO ₄ – 2 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 10 Глюкоза – 100 Дріжджовий екстракт – 5 Канаміцин – 20 мг	8	Температура 25 ⁰ С Час культивування 160 год рН – 7	6,10
<i>E.coli</i> 218	Na ₂ HPO ₄ – 17 KH ₂ PO ₄ – 3 NaCl – 5 NH ₄ Cl – 5 MgSO ₄ – 0,1 CaCl ₂ – 0.01 Глюкоза – 40 Тіамін – 0,1	0,5	Температура 37 ⁰ С Час культивування 50 год рН – 7	10

Об'єктом дослідження є штам *C. glutamicum* MB001, який був отриманий шляхом генних модифікацій більш розповсюдженого штаму *C. glutamicum* ATCC 13032. Даний штам здатний культивувати більше 5 г/л метіоніну при культивуванні упродовж 72 годин, що робить його більш ефективним у порівнянні з іншими штамми. Штам швидко адаптується до різних середовищ, які включають у себе різні компоненти [6].

Штам *C.glutamicum-1* здатний накопичувати до 8 г/л метіоніну за 160 годин культивування. Даний штам хоч і накопичує більшу кількість метіоніну, але потребує більш економічно вибагливого середовища і тривалішого часу культивування [10].

Штам *E.coli* 218 показав найгірший вихід метіоніну, який становить 0,5 г/л, але має менший час культивування, який складає 50 годин [10].

Для порівняння вартості досліджуваних поживних середовищ розрахуємо вартість компонентів (Табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Порівняльна характеристика вартості поживного середовища для культивування досліджуваних штамів

Продуцент	Компонент середовища, г/л	Ціна компонента*, грн/кг	Вартість компонента, грн./1 л пс	Джерело
<i>Corynebacterium glutamicum</i> MB001	М'яса – 40 CaCO ₃ – 25 MgSO ₄ – 0,2 FeSO ₄ – 0,02 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 12 Біотин – 0,0002	165 120 75 70 31,80 800	9,99	11-16
<i>Corynebacterium glutamicum</i> -1	KH ₂ PO ₄ – 2 K ₂ HPO ₄ – 2 (NH ₄) ₂ SO ₄ – 10 Глюкоза – 100 Дріжджовий екстракт – 5 Канаміцин – 20 мг	145 195 31,80 90 703 7800	169,51	15,17-20,
<i>E.coli</i> 218	Na ₂ HPO ₄ – 17 KH ₂ PO ₄ – 3 NaCl – 5 NH ₄ Cl – 10 MgSO ₄ – 0,1 CaCl ₂ – 0,01 Глюкоза – 40 Тіамін – 0,1	490 195 60 77,28 75 18 90 1028	116,40	15,17,19,21-25

* Ціни наведено станом на 2025 рік.

У табл. 2.3 наведено порівняння доцільності культивування обраних біологічних агентів у виробництві метіоніну.

**Порівняння доцільності культивування біологічних агентів для
біосинтезу метіоніну**

Біологічний агент	Вартість 1 л поживного середовища, грн	Вихід продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Вихід продукту, г/1 год
<i>Corynebacterium glutamicum</i> MB001	9,99	5,0	72	0,07
<i>Corynebacterium glutamicum-1</i>	169,51	8,0	160	0,05
<i>E.coli</i> 218	116,40	0,5	50	0,01

Провівши порівняння трьох штамів продуцентів метіоніну можна зробити висновок, що штам *C. glutamicum* MB001 є найбільш ефективним та економічно вигідним, оскільки має відносно інших штамів найдешевше середовище з найбільшим виходом метіоніну за одиницю часу [32].

2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

2.2.1 Обґрунтування вибору ферментера

Основним етапом промислового виробництва метіоніну є процес ферментації. Для правильного проведення ферментації необхідно ретельно обирати тип ферментера, адже це забезпечує ефективність біосинтезу.

Штам *C. glutamicum* MB001 є штамом, який культивують при значенні рН = 7,3 - 7,5 за температури до 30°C, упродовж 72 годин.

Для контролю на стадії біосинтезу та підтримання технологічних параметрів необхідно обрати ферментер, оснащення якого здатне забезпечити повну стерильність здійснення технологічного процесу, постійний контроль на стадії біосинтезу, рівномірний розподіл кисню та стабільність культурального середовища.

Щоб задовольнити потребу у цільовому продукті, необхідно використовувати ферментер об'ємом 5 м³. Для цього використовуємо

ферментер, який призначений для культивування мікроорганізмів в аеробних умовах, а саме ферментер марки «BLBIO-SJA» від виробника Shanghai Bailun Biotechnology (рис. 2.1) [27].



Рисунок 2.1 – Біореактор BLBIO-SJA, Shanghai Bailun Biotechnology

Ферментер BLBIO-SJA оснащений комп'ютеризованою системою управління, інтелектуальним керуванням клапанами, забезпечує швидкість перемішування 50–1000 об/хв., сертифікований (CE, GMP, ISO) [27].

Обраний ферментер містить: стерильний барботер з очисним фільтром 0,2 мкм на вході, термодатчики для контролю рівня температури, датчик рівня pH, сорочку для теплообміну; люки, клапани, форсунки, дозатор для введення розчинів стерильно [27].

2.2.2 Обґрунтування вибору миючих та дезінфікуючих засобів

Після кожного культивування необхідно проводити очищення обладнання від залишків попереднього культивування та мікроорганізмів за допомогою миючих та дезінфікуючих засобів, для уникнення контамінації культуральної рідини.

Для того щоб обрати миючий або дезінфікуючий засіб необхідно провести порівняння ціни, ефективності очищення, витрат на оброблення поверхні та складу засобів. Стандартно, витрати миючого або

дезінфікуючого засобу становлять 100 мл на 1 м² площі. Щоденне прибирання включає у себе миття тільки поверхні підлоги, натомість генеральне прибирання охоплює всі поверхні та апарати.

У табл. 2.4 наведено порівняльні характеристики миючих та дезінфікуючих засобів.

Таблиця 2.4

Характеристика мийних та дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Об'єкт миття чи дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л/кг засобу, грн	Тривалість обробки, хв.
Біомой [28]	Обладнання Комунікації Інвентар Тара	0,3	390	20 – 30
Кальцинова сода [29]	Обладнання Інвентар Комунікації	2,0	75	30 – 45
Новохлор Екстра [30]	Приміщення Обладнання Інвентар Поверхні	0,5	120	20 – 30
Вапно хлорне [31]	Приміщення Комунікації	2,0	167	30

Порівнявши всі параметри та дані, можемо зробити висновок, що:

- Для миття обладнання, інвентарю, тари та комунікацій доцільно використовувати розчин кальцинованої соди [29],
- Для дезінфекції приміщень та робочих поверхонь слід використовувати засіб НОВОХЛОР ЕКСТРА, так як його можна застосовувати під час перебування людей у приміщенні, він є більш безпечним ніж хлорне вапно [30, 31].

Розчин кальцинованої соди 2 % концентрації готується в полімерних або нержавіючих ємностях. Щоб отримали 1 літр розчину, необхідно взяти 20 грамів сухої кальцинової соди та додати близько 980 мл води, забезпечивши повне розчинення соди активний перемішуванням. Тривалість

обробки обладнання та інвентарю складає 30 хв. Зберігання готового розчину відбувається в герметичній скляній ємності в умовах низької температури.

Для дезінфекції приміщень та поверхонь використовується НОВОХЛОР ЕКСТРА. Розчин застосовують у концентрації від 0,01 % до 0,5 % по активному хлору і розводять 75-100 мл/м² водою для щоденного прибирання. Даний розчин може застосовуватися під час перебування персоналу в приміщенні під час дезінфекційних робіт. Тривалість обробки складає 20 – 30 хв. Під час генерального прибирання концентрацію розчину НОВОХЛОР ЕКСТРА збільшують у 2 рази для більш ефективної очистки від забруднень.

Засіб НОВОХЛОР ЕКСТРА необхідно замінити через 1 місяць використання на подібний за властивостями, наприклад на хлорне вапно для запобігання адаптації мікроорганізмів та різних спектрів дії [30, 31].

2.2.3 Обґрунтування стадій підготовки повітря

Обраний нами біологічний агент є аеробом, а отже необхідно забезпечити високу концентрацію кисню у культуральній рідині для синтезу цільового продукту.

Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою повітрозабірника, який встановлений у найвищій точці виробництва на висоті близько 34 метрів, де розміщено обладнання для очищення та стиснення повітря.

Першим етапом очищення повітря від великих часточок бруду та пилу є проходження через фільтр грубої фільтрації. Найчастіше використовують коміркові фільтри, які складаються з вінілопластикової сітки, розмір отворів якої становить 5 мкм. Ефективність видалення забруднень такими фільтрами становить 80 %.

Далі повітря подається у компресор, де відбувається його стиснення при 0,2 – 0,3 МПа за температури 175 °С. Стиснене повітря охолоджують до

температури $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ у теплообміннику. Далі повітря подається до ресивера, для видалення зайвої вологи до вологовмісту 60 %.

Після етапу видалення вологи стиснене повітря нагрівають у теплообміннику до температури $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ і вмісту вологи 50 %.

Після нагрівання повітря потрапляє до головного фільтру, і проходить через опірну решітку, на яку встановлюють фільтрувальний матеріал, виготовлений з поліамідних волокон. Ефективність очищення в такому фільтрі сягає 98 %.

Кінцевим етапом підготовки повітря є проходження його через індивідуальні фільтри на основі тонких волокон. Ефективність очищення в індивідуальних фільтрах сягає 99,99 %. Після фільтрації аераційне повітря подається на етап підготовки посівного матеріалу.

2.3 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу, підготовка поживного середовища та параметри стерилізації

2.3.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

3337 л культуральної рідини отримують за один повний цикл. [5]

Втрати середовища сягають близько 5 %. Виходячи з цього розрахуємо кількість посівного матеріалу:

$$V_1 = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 3337 / (1 - 0,05) = 3500 \text{ л},$$

де $V_{\text{кр}}$ – об'єм культуральної рідини;

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

Робочий об'єм ферментера у якому відбувається біосинтез становить 3500 л.

Вибраний коефіцієнт заповнення 0,8, приблизний об'єм ферментера становитиме:

$$V_1 = 3500 / 0,8 = 4375 \text{ л}.$$

Об'єм посівного матеріалу становить 10 % від усього об'єму поживного середовища. Виходячи з цього розрахуємо об'єм поживного середовища:

$$V_2 = V_1 / (1 + X_{п.м.}) = 3181 \text{ л},$$

де V_1 – кількість посівного матеріалу з внесеним поживним середовищем з урахуванням втрат 10%

$X_{п.м.}$ – частка посівного матеріалу.

Виходячи з розрахунків, кількість посівного матеріалу становить: [9]

$$V_{3 \text{ к.п.м.}} = V_1 - V_2 = 3500 - 3181 = 319 \text{ л.}$$

2.3.2 Вирощування посівного матеріалу в колбах

Виходячи з умов стерилізації та концентрації компонентів, розбиваємо поживне середовище на певні композиції:

Композиція А: Меляса – 16 г, CaCO_3 – 10 г,

умови стерилізації: 112°C, тиск 0,1 МПа, 25 – 30 хв.

Композиція Б: MgSO_4 – 0,08 г, FeSO_4 – 0,008 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,8 г

умови стерилізації: 131°C, тиск 0,15 МПа, 30 – 40 хв

Композицію А і Б зливають в одну колбу об'ємом 500 мл, перемішують і розливають у дві стерильні колби об'ємом 200 мл. Після процесу культивування клітини переносять з пробірок до колб фізіологічним розчином і вирощують у термостаті за температури 30 °C упродовж 48 годин.

2.3.3 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л

Композиція А: Меляса – 126 г, CaCO_3 – 78,8 г,

умови стерилізації: 112°C, тиск 0,1 МПа, 25 – 30 хв

Композиція Б: MgSO_4 – 0,63 г, FeSO_4 – 0,063 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 37,8 г

умови стерилізації: 131°C, тиск 0,15 МПа, 30 – 40 хв.

Для вирощування посівного матеріалу у ємність об'ємом 5 л в асептичних умовах вносимо 2 л охолодженої композиції А і 1,15 л охолодженої композиції Б. Культивування проводять упродовж 48 годин за температури 30 °C.

2.3.4 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л

Композиція А: Меляса – 1260 г, CaCO_3 – 788 г,

умови стерилізації: 112°C, тиск 0,1 МПа, 25 – 30 хв

Композиція Б: MgSO_4 – 6,3 г, FeSO_4 – 0,63 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 378 г,

умови стерилізації: 131°C, тиск 0,15 МПа, 30 – 40 хв.

Для вирощування посівного матеріалу в інокулятор об'ємом 50 л разом з охолодженою композицією А вносимо 3 л охолодженої композиції Б. На даному етапі рівень рН складає 7,3 – 7,5. Культивування здійснюється упродовж 72 годин з частотою обертів 300 об/хвилину за температури 30°C. Рівень аерації повітря становить 40 – 60%.

2.3.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 500 л

Композиція А: Меляса – 12,6 кг, CaCO_3 – 7,88 кг,

умови стерилізації: 112°C, тиск 0,1 МПа, 25 – 30 хв.

Композиція Б: MgSO_4 – 63 г, FeSO_4 – 6,3 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,78 кг,

умови стерилізації: 131°C, тиск 0,15 МПа, 30 – 40 хв.

У інокулятор об'ємом 500 л до композиції А вносимо 50 л композиції Б. Рівень рН складає 7,3 – 7,5 і до готової суспензії додаємо посівний матеріал. Культивування здійснюється упродовж 72 годин з частотою обертання 300 об/хв за температури 30°C. Рівень аерації повітря становить 40 – 60%.

2.3.6 Вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 5 м³

Композиція А: Меляса – 126 кг, CaCO_3 – 78,8 кг,

умови стерилізації: 112°C, тиск 0,1 МПа, 25 – 30 хв

Композиція Б: MgSO_4 – 630 г, FeSO_4 – 63 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 37,8 г,

умови стерилізації: 131°C, тиск 0,15 МПа, 30 – 40 хв.

Композиція В: Біотин – 0,63 г/л, умови стерилізації: 131°C, тиск 0,15 МПа, 30 – 40 хв

У ферментер об'ємом 5 м³ разом з композицією А вносимо в асептичних умовах через трубу перетискання 500 л композиції Б. Композицію В вносимо через стерилізуючий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Тривалість культивування складає 72 години з частотою обертання 300 об/хв за температури 30°C.

Кожні 5 годин відбираються проби для контрольного аналізу процесу ферментації.

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

3.1 Таксономічний статус

Згідно з V виданням Керівництва Берджи по систематичній бактеріології розглянемо таксономічний статус *Corynebacterium glutamicum* MB001: [5]

Домен: *Bacteria*

Тип: *Actinomycetota*

Клас: *Actinomycetes*

Порядок: *Mycobacteriales*

Родина: *Corynebacteriaceae*

Рід: *Corynebacterium*

Вид: *Corynebacterium glutamicum*

Штам: *Corynebacterium glutamicum* MB001

3.2 Морфолого-культуральні властивості

Corynebacterium glutamicum – грам негативна бактерія, яка складається з паличкоподібних клітин, розміри яких складають від 2 до 6 мкм у довжину та 0,5 мкм у діаметрі (рис. 3.1) [5]

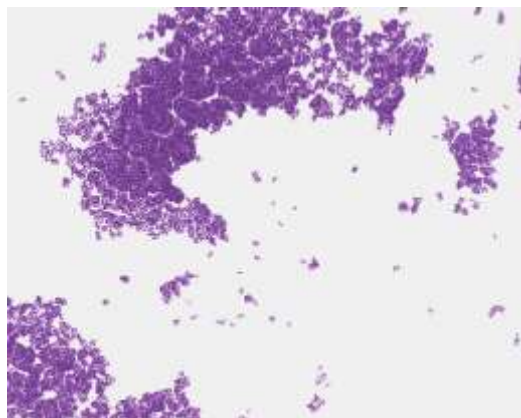


Рисунок 3.2 – Бактерія *Corynebacterium glutamicum* під мікроскопом [28]

Не дифтерійні представники роду *Corynebacterium glutamicum* зазвичай мешкають у мікрофлорі людини – на шкірі, у верхніх дихальних шляхах, а також в урогенітальному тракті. Інші види цього роду найчастіше зустрічаються в навколишньому середовищі, зокрема у ґрунті, воді, на рослинах та харчових продуктах.

Колонії бактерій *Corynebacterium* g. мають вигляд дрібних зерен, які є напівпрозорими за винятком непрозорого центру клітини, під мікроскопом виглядають як короткі ланцюги V або Y – подібні структури. Бактерії стійкі до низьких температур і є чутливими до нагрівання.

3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

Бактерія *Corynebacterium glutamicum* являє собою коротку, аеробну паличку, здатну до рівномірного поділу, а також адаптацією до різних середовищ завдяки системам регуляції обміну речовин і відповідей на стрес. Деякі види, такі як *Corynebacterium diphtheriae*, викликають захворювання дифтерії, що є небезпечною для здоров'я людини. *C. glutamicum* синтезує метіонін, який входить до складу білків, займає важливе місце у процесі обміну речовин і який є амінокислотою [5].

РОЗДІЛ 4

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу метіоніну зі штампом *Corynebacterium glutamicum* MB001 включає у себе санітарну підготовку виробництва, підготовку стерильного аераційного повітря, приготування та стерилізацію титрувальних розчинів, приготування та стерилізацію поживних середовищ, підготовку посівного матеріалу, виробничий біосинтез, стадію знешкодження різних за походженням відходів.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка кваліфікаційного персоналу

ДР 1.1.1 Навчання персоналу

При влаштуванні на роботу кожен співробітник обов'язково проходить початковий інструктаж з техніки безпеки. Крім того, залежно від посади, передбачається щорічне навчання. Для працівників, які працюють у стерильних зонах, проводиться додатковий інструктаж з асептики. Персонал, відповідальний за обслуговування обладнання, навчається з питань охорони праці, безпеки життєдіяльності, пожежної безпеки та правил експлуатації обладнання.

ДР 1.1.2 Медичний огляд персоналу

Усі працівники без виключення мають проходити медичний огляд на початку своєї праці на виробництві та поновлювати його щорічно. Мета даного медогляду – охорона власного здоров'я та безпека під час роботи на виробництві.

ДР 1.1.3 Підготовка спецодягу

Перед початком роботи роботодавець має закупити одяг та засоби індивідуального звхисту усім співробітникам. Важливо, щоб одяг відповідав гігієнічним нормам і стандартам безпеки.

Також необхідно додати, що спецодяг має бути зроблений з бавовни, а його довжина має бути достатньою, щоб повністю закрити тіло співробітника. Час від часу одяг може бути перевірений спеціальною особою, після чого він має бути випраним за допомогою прального порошку та води. Перуть його за температури 90°C упродовж 40 хв. Після цього відпрацьований розчин підлягає знешкодженню. Після цього випрасуваний одяг відправляється на сушіння за температури від 70 до 90 °C упродовж 40-50 хвилин. Кінцевим етапом є прасування та пакування одягу, після чого він має бути переданий персоналу.

ДР 1.2 Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

ДР 1.2.1 Підготовка мийних засобів

Процес миття передбачає використання 2 % розчину кальцинованої соди [31]. Приготування розчину здійснюється в полімерних або нержавіючих ємностях. Щоб отримали 1 літр розчину, необхідно взяти приблизно 20 грамів сухої кальцинованої соди та додати близько 980 мл води, забезпечивши повне розчинення соди активним перемішуванням. Зберігання готового розчину відбувається в герметичній скляній ємності в умовах низької температури. Після використання тара підлягає знешкодженню (до ЗВ 6.2).

ДР 1.2.2 Підготовка дезінфікуючих засобів для виробничих приміщень

Для дезінфекції приміщень використовують препарат «НОВОХЛОР ЕКСТРА». Розчин застосовується у концентрації від 0,01% (щоденне прибирання) до 0,5% (генеральне прибирання) по активному хлору. Даний розчин може застосовуватися у присутності осіб, які не є причетними до дезінфекційних робіт. Після використання тара підлягає знешкодженню (до ЗВ 6.2).

ДР 1.2.3 Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

Для дезінфекції рук персонал використовує 70 % етиловий спирт. Змішують 96 % з водою до досягнення концентрації 70 % (до ДР 1.1). Термін

зберігання розчину сягає 5-6 діб. Використана тара від розчину в подальшому підлягає знешкодженню (до ЗВ 6.2).

ДР 1.3 Підготовка ферментера

ДР 1.3.1 Миття та огляд ферментера

З метою попередження перехресної контамінації, перед проведенням стерилізації обладнання необхідно здійснити контроль його стану. Особливу увагу необхідно приділити наявності механічних пошкоджень, зокрема подряпин та заглиблень, які в подальшому можуть слугувати місцями накопичення забруднення. Усі несправності підлягають усуненню. Подальша процедура очищення полягає у промиванні ферментера водою з температурним режимом від 75-90 °С та під тиском у діапазоні від 0,6-1,0 МПа упродовж 5-10 хвилин. Наступним етапом є обробка ферментера розчином кальцинованої соди (від у ДР 1.2.1) за температури 20-25°С під тиском. Кінцевою стадією очищення є ополіскування ферментера водою температурою 20-30°С. Після використання мийні та ополіскувальні рідини підлягають знешкодженню (до ЗВ 6.1).

ДР 1.3.2 Перевірка ферментера на герметичність

Під час цього етапу потрібно впевнитись у герметичності усіх складових ферментера. Для цього закривають всю запірну арматуру і створюють у системі тиск силою 0,1–0,2 МПа. Фіксують показник встановленого тиску, який за 40–60 хвилин перевірки не має зменшитись більше ніж на 0,01 МПа. У випадку зниження тиску впродовж вказаного інтервалу часу, всі з'єднання ферментеру обробляють мильним розчином для виявлення точки розгерметизації. У разі її визначення, проводять запобіжні заходи: змінюють прокладку, затягують вузли комунікацій. Після чого перевірку на герметичність повторюють. Використане для перевірки повітря відправляється на знешкодження (до ЗВ 6.3).

ДР 1.3.3 Стерилізація ферментера

Процес стерилізації ферментера здійснюється в кілька етапів. Спочатку в «сорочку» апарата подається пара для нагрівання до 80-90°С. Наступним

кроком є відкриття всіх запірних елементів на трубних кінцях, які під'єднані до апарата, і подача гострої пари у його внутрішній простір через нижній спуск. Під час цього етапу обов'язково має працювати вентиль для відведення відпрацьованого повітря на знешкодження.

Після досягнення необхідної температури стерилізації вся запірна система, окрім парової закривається, і апарат витримується протягом години. Кінцевим етапом є припинення подачі пари, запуск стерильного повітря у середину ферментера та подача холодної води в його «сорочку», для охолодження його до температури 30-40°C при досягненні надлишкового тиску у межах 0,003-0,005 МПа. Використана пара направляється на стадію знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 6.3), конденсат – до ЗВ 6.1.

ДР 1.4. Підготовка приміщень

ДР 1.4.1 Щоденне прибирання

Після кожного робочого дня в приміщення виробництва проводять щоденне прибирання яке включає у себе миття підлоги та поверхонь. Для цього використовується розчин «НОВОХЛОР ЕКСТРА» (від ДР 1.2.2) з концентрацією 0,1%. Після використання розчин відправляється на етап знешкодження (до ЗВ 6.1).

ДР 1.4.2 Генеральне прибирання.

Генеральне прибирання проводять раз на місяць або по вимозі відповідного бактеріолога при виявленні порушень. Генеральне прибирання включає у себе миття всього обладнання, поверхонь, підлоги, стелі, вікон та дверей. Під час даного прибирання концентрацію розчину «НОВОХЛОР ЕКСТРА» збільшують до 0,5% (від ДР 1.2.2) для більш ефективної очистки від забруднень. Після використання розчин відправляється на етап знешкодження (до ЗВ 6.1).

ДР 2. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою труби з повітрозабірником, встановленої у найвищій точці на виробництві на висоті 38-40 метрів.

ДР 2.2 Очищення повітря від механічних домішок

Першим етапом очищення повітря є його проходження через фільтр грубої фільтрації, який призначений для затримання великих часток бруду та пилу. У цій ролі найчастіше використовуються коміркові фільтри, які складаються з вінілопластикової сітки, розмір отворів якої становить або перевищує 5 мікрометрів. Ефективність видалення забруднень таким фільтром складає 70-80%.

ДР 2.3 Стиснення повітря

Повітря подається в компресор, де відбувається стиснення повітря до тиску, який становить 0,2-0,3 МПа та температурою до 175°C.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря охолоджують до $30 \pm 1^\circ\text{C}$ у теплообміннику. Далі повітря направляють до ресивера, для видалення зайвої вологи до вмісту $W = 60\%$. Видалену вологу направляють на стадію ЗВ 6.1.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Повітря нагрівають у теплообміннику-нагрівачі до температури $50 \pm 1^\circ\text{C}$ з вологістю 50 %.

ДР 2.7. Очищення повітря в головному фільтрі

Основні фільтри, що забезпечують очищення повітря для кількох апаратів, мають вертикальну конструкцію. Всередині вони обладнані опорною решіткою, на яку укладається фільтрувальний матеріал, виготовлений з поліамідних волокон. Ефективність очищення в таких фільтрах сягає 98 %.

ДР 2.8 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

З метою забезпечення необхідного рівня стерильності повітря, що подається до посівних апаратів та ферментера, передбачене його проходження через індивідуальні фільтри. Дані фільтри забезпечують

ефективність очищення на 99,99%. Вони є аналогічними до головних фільтрів, проте мають менші розміри та використовують фільтрувальні матеріали на основі тонких волокон. Отримане аераційне повітря використовується на етапі підготовки посівного матеріалу (до ТП 4).

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах

Для приготування поживного середовища створюємо 2 композиції, які будуть стерилізуватися за різних параметрів. Вони наведені у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах об'ємом 500 мл

Компонент поживного середовища	Вміст, г\л	Кількість для приготування 400 мл середовища, г	Умови стерилізації	Композиція	Об'єм композиції, мл
Меляса	40	16	112°C, тиск 0,1 МПа упродовж 25-30 хв	А	200
CaCO ₃	25	10			
Вода		174			
MgSO ₄	0,2	0,08	131°C, тиск 0,15 МПа упродовж 25-40 хв	Б	200
FeSO ₄	0,02	0,008			
(NH ₄) ₂ SO ₄	12	4,8			
Вода		195			
Разом:					400

ДР 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На електронних вагах зважуємо 16 г меляси та 10 г кальцію карбонату, наважки переносять у колбу об'ємом 500 мл, додають 174 мл питної води, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в

автоклаві за температури за температури 112°C упродовж 25-30 хв. Після стерилізації охолоджують до температури 30 °C і передають до ТП 4.3.

ДР 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На електронних вагах зважуємо 0,08 г MgSO_4 , 0,008 г FeSO_4 та 4,8 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, наважки переносять у колбу об'ємом 500 мл і додають 195 мл питної води, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві за температури за температури 131°C упродовж 30-40 хв.

Після охолодження до 40°C передаємо колбу на етап технологічного процесу підготовки посівного матеріалу (до ТП 4.3).

ДР 3.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 5 л

Для приготування поживного середовища створюємо 2 композиції, які будуть стерилізуватися за різних параметрів. Вони наведені у табл.. 4.2.

Таблиця 4.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г\л	Кількість для приготування 3,15 л середовища, г	Умови стерилізації	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	40	126	112°C, тиск 0,1 МПа упродовж 25-30 хв	А	2,00
CaCO ₃	25	78,8			
Вода		1,89			
MgSO ₄	0,2	0,63	131°C, тиск 0,15 МПа упродовж 25-40 хв	Б	1,15
FeSO ₄	0,02	0,063			
(NH ₄) ₂ SO ₄	12	37,8			
Вода		0,450			
Разом:					3,15

ДР 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На електронних вагах зважуємо 126 г меляси та 78,8 г кальцію карбонату, наважки переносять у колбу об'ємом 5 л, додають 1,9 л питної води, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві за температури 112°C упродовж 25-30 хв. Після стерилізації охолоджують до температури 30 °C і передають до ТП 4.4.

ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На електронних вагах зважуємо 0,63 г MgSO_4 , 0,063 г FeSO_4 та 37,8 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, наважки переносять у колбу об'ємом 2 л і додають 0,45 л питної води, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві за температури 131°C упродовж 30-40 хв.

Після охолодження до 40°C передаємо колбу на етап технологічного процесу підготовки посівного матеріалу (до ТП 4.4).

ДР 3.3 Приготування та стерилізація посівного матеріалу для інокулятора об'ємом 50 л

Для приготування поживного середовища необхідно 2 композиції, які будуть різні у параметрах. Вони наведені у табл. 4.3.

Таблиця 4.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г\л	Кіл-сть для приготування 31,5 л середовища, г	Умови стерилізації	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	40	1260	112°C, тиск 0,21 МПа упродовж 25-30 хв	А	28,5
CaCO ₃	25	788			
Вода	11,5				
MgSO ₄	0,2	6,3	131°C, тиск 0,2 МПа упродовж 30-40 хв	Б	3,0
FeSO ₄	0,02	0,63			
(NH ₄) ₂ SO ₄	12	378			
Вода	1				
Разом:					31,5

ДР 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

У попередньо простерилізований та охолоджений інокулятор об'ємом 50 л вносять 28,5 л та включають перемішування. На електронних вагах зважуємо 1260 г меляси та 788 г кальцію карбонату, наважки переносять у інокулятор. Стерилізують в інокуляторі за температури 112°C упродовж 25-30 хв. Після стерилізації охолоджують.

ДР 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На електронних вагах зважуємо 6,3 г MgSO_4 , 0,63 г FeSO_4 та 378 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, наважки переносять у колбу об'ємом 5 л і додають 1 л питної води, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві за температури 131°C упродовж 30-40 хв.

Після охолодження до 40°C передають на етап технологічного процесу підготовки посівного матеріалу (до ТП 4.5).

ДР 3.4 Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 500 л.

Для приготування поживного середовища необхідно 2 композиції (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 500 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г\л	Кіл-сть для приготування 315 л середовища, кг	Умови стерилізації	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	40	12,6	112°C, тиск 0,21 МПа упродовж 25-30 хв	А	265
CaCO ₃	25	7,8			
Вода	100				
MgSO ₄	0,2	63	131°C, тиск 0,2 МПа упродовж 30-40 хв	Б	50
FeSO ₄	0,02	6,3			
(NH ₄) ₂ SO ₄	12	3,78			
Вода	30				
Разом:					315

ДР 3.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

На електронних вагах зважуємо 12,6 кг меляси та 7,8 кг кальцію карбонату, наважки переносять у інокулятор об'ємом 500 л, додають 100 л питної води, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві за температури 112°C упродовж 25-30 хв.

ДР 3.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На електронних вагах зважуємо 63 кг MgSO_4 , 6,3 кг FeSO_4 та 3,78 кг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, наважки переносять у інокулятор об'ємом 100 л і додають 30 л питної води, перемішують та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві за температури 131°C упродовж 30-40 хв.

Після охолодження до 40°C він переноситься на етап технологічного процесу підготовки посівного матеріалу (до ТП 4.6).

ДР 3.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 5м³

Для приготування поживного середовища необхідно 2 композиції (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу ферментері об'ємом 5000 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г\л	Кількість для приготування 315 л середовища, кг	Умови стерилізації	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	40	126	112°C, тиск 0,21 МПа упродовж 25-30 хв	А	2650
CaCO ₃	25	78			
Вода	1350				
MgSO ₄	0,2	630	121°C, тиск 0,2 МПа упродовж 30-40 хв	Б	500
FeSO ₄	0,02	63			
(NH ₄) ₂ SO ₄	12	37,8			
Вода	300				
Біотин	0,0002	0,63 г	131°C, тиск 0,15 МПа упродовж 30-40 хв	В	0,525 мл
Разом:					3150

ДР 3.5.1 Приготування і стерилізація композиції А

На ваговий дозатор вносимо 126 кг меляси та 78 кг кальцію карбонату, переносимо у ферментер об'ємом 5 м³, додаємо 1350 л питної води, перемішуємо та закриваємо. Стерилізуємо за температури 112°C упродовж 30 хв.

ДР 3.5.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговий дозатор вносимо 630 кг MgSO₄, 63 кг FeSO₄ та 37,8 кг (NH₄)₂SO₄, переносимо у ферментер об'ємом 1 м³ і додаємо 300 л питної води, перемішуємо і закриваємо. Стерилізуємо за температури 131°C упродовж 40 хв.

ДР 3.5.3 Додавання композиції В

Після стерилізації композицій А і Б до ферментера стерильно подається 0,63 г біотину.

Після охолодження до 40°C переноситься на етап технологічного процесу виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 5м³ (до ТП 5).

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання культури

Культуру *Corynebacterium glutamicum* MB001 зберігаємо у пробірках з агаризованим середовищем (LB або ВНІ) за температури до 4 °C в асептичних умовах. Для даної культури необхідно робити пересіви кожні 4-5 тижнів.

ТП 4.2 Отримання посівного матеріалу

Музейну культуру (від ТП 4.1) висівають у дві пробірки з агаризованим середовищем LB або ВНІ з розрахунку одну пробірку на одну засівну колбу. Культивують пробірки у термостаті упродовж 48 годин за температури 30°C. (до ТП 4.3).

ТП 4.3 Вирощування посівного матеріалу в колбах

Композицію А і Б після стерилізації (ДР 3.1.1, ДР 3.1.2) зливаємо у одну колбу об'ємом 500 мл, перемішуємо і розливаємо у 2 стерильні колби

по 200 мл. Після культивування клітини переносять з пробірок (від ТП 4.2) стерильним фізіологічним розчином (0,9 % NaCl) або стерильною дистильованою водою до колб з 200 мл поживного середовища, перемішуємо і вирощуємо за температури 30°C упродовж 48 год. Після культивування перевіряємо культуру на відсутність сторонньої мікрофлори і передаємо до ТП 4.4.

ТП 4.4 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л

Для вирощування посівного матеріалу у ємність об'ємом 5 л в асептичних умовах вносимо 2 л розчину стерильної та охолодженої композиції А (від ДР 3.2.1), 1,15 л розчину композиції Б (від ДР 3.2.2) та перемішуємо. В асептичних умовах одержаний посівний матеріал *C.glutamicum* MB001, що вирощений в колбах з рідким поживним середовищем (від ТП 4.3) змішують у засівній колбі (500 мл). Засіваємо інокулятор і культивуємо упродовж 48 год за температури 30°C, аерацією стисненим повітрям (від ДР 2.7) і перемішуванням 300 об/хв. Відпрацьоване повітря переходить на етап знешкодження (до ЗВ 6.3).

ТП 4.4 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л

У інокулятор об'ємом 50 л разом з композицією А (від ДР 3.3.1) вносимо 3 л композиції Б (від ДР 3.3.2). Рівень рН складає приблизно 7,3-7,5, і до готової суспензії вже подаємо посівний матеріал (від ТП 4.3). Культивування здійснюється протягом 72 годин з частотою обертання мішалки 300 об/хв за температури 30°C, рівень аерації повітря дорівнює 40-60 %. Стерильне повітря подається після підготовки аераційного повітря (від ДР 2.7), а відпрацьоване переходить на етап знешкодження (до ЗВ 6.3).

Під час процесу культивування кожні 5 годин беремо пробу для контролю та визначення концентрації біомаси, мікробіологічного контролю; контролюємо постійно рівень рН, температуру.

ТП 4.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 500 л

У інокулятор об'ємом 500 л разом з композицією А (від ДР 3.4.1) вносимо 50 л композиції Б (від ДР 3.4.2). Рівень рН складає приблизно 7,3-

7,5, і до готової суспензії вже подаємо посівний матеріал (від ТП 4.4). Культивування здійснюється упродовж 72 годин з частотою обертання мішалки 300 об/хв за температури 30°C, рівень аерації повітря дорівнює 40-60%. Стерильне повітря подається після підготовки стерильного аераційного повітря (від ДР 2.7), а відпрацьоване переходить на етап знешкодження (до ЗВ 6.3).

Під час процесу культивування кожні 5 годин беремо пробу для контролю та визначення концентрації біомаси, мікробіологічного контролю; контролюємо постійно рівень рН.

ТП 5. Виробничий біосинтез

У ферментер загальним об'ємом 5м³ стерильно вносимо композицію А (від ДР 3.5.1). В асептичних умовах через трубу перетискання передаємо стерильну та охолоджену композицію Б (від ДР 3.5.2). Розчин біотину для стадії біосинтезу готуємо у вигляді композиції В. Композицію В (від ДР 3.5.3.) вносимо через стерилізуючий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Після цього стерильно посівний матеріал (від ТП 4.6) із посівного апарату через трубку перетискування. Тривалість виробничого культивування становить 72 год за температури 30°C та рН 7,3-7,5. Швидкість перемішування – 300 об/хв. Стерильне повітря подається після підготовки стерильного аераційного повітря (від ДР 2.7), а відпрацьоване переходить на етап знешкодження (до ЗВ 6.3).

Під час процесу культивування кожні 5 годин беремо пробу для контролю та визначення концентрації біомаси, мікробіологічного контролю; контролюємо параметри здійснення біосинтезу. Кінцевий вихід метіоніну становитиме близько 5 г/л.

ЗВ 6. Знешкодження відходів

ЗВ 6.1 Знешкодження рідких відходів

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

ЗВ 6.2 Знешкодження твердих відходів

Такі відходи як пакувальна тара, відправляється до пунктів прийому та переробки втор. сировини.

ЗВ 6.3 Переробка газоподібних відходів

Газоподібні відходи переробляються за допомогою очисних установок, на яких встановлені біофільтри та переробні станції.

РОЗДІЛ 5

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

5.1 Мікробіологічний контроль

Упродовж культивування кожні 5 годин відбирають проби для мікробіологічного контролю, визначення джерела вуглецю та азоту, концентрації біомаси і цільового продукту.

Для проведення мікробіологічного контролю проводимо мікроскопію. Розсіваємо культуральну рідину на чашки Петрі з МПА.

Для мікроскопування використовуємо метод роздавленої краплі або фарбуємо за Грамом. Обидва методи підходять для проведення мікробіологічного контролю.

Для реалізації методу фарбування за Грамом необхідно мати наступні реактиви: барвник кристалічний фіолетовий, розчин Люголю, спирт та фуксин.

Предметне скло знежирюють і роблять мазок культури. Мазок необхідно робити тонким, щоб клітини рівномірно розподілились на поверхні предметного скла. Перед додаванням барвника кристалічного фіолетового скло висушують на повітрі або біля полум'я спиртівки запобігаючи перегріву. Після додавання барвника, скло витримують 1-2 хвилини і змивають барвник водою. Препарат досліджують під мікроскопом із застосуванням «сухого» та/або «мокрого» об'єктиву [33].

5.2 Визначення концентрації біомаси у культуральній рідині

Визначають біомасу за оптичною густиною клітинної суспензії.

Після завершення біосинтезу метіоніну культуральну рідину, у якій вирощували бактерії *C.glutamicum* MB001, розводять дистильованою водою у колбах.

Для руйнування клітин будемо використовувати лабораторні дезінтегратори типу Sonikator або French. Для дезінтеграції метіоніну будемо використовувати дезінтегратор French.

Даний дезінтегратор призначений для дезінтеграції бактеріальних та рослинних клітин, а також дріжджів та грибів методом декомпресії через вузький отвір під високим тиском, що спричиняє декомпресію, яка руйнує мембрани та клітинні стінки. Це дозволяє отримати всі клітинні компоненти: білки, нуклеїнові кислоти, мембрани.

Клітинну суспензію вносять у металеву камеру, де утворюється тиск близько 40 000 МПа. Потім отриману суспензію пропускають через вузький отвір, через що утворюється перепад тиску, який розриває клітинні стінки та мембрани і дозволяє отримати вміст клітини.

Отриману дезінтегровану суспензію центрифугують упродовж 10-15 хв за температури 4°C на 10 000 обертів, для уникання денатурації. Це дозволяє отримати прозорий супернатант для подальшого аналізу метіоніну [36-37].

5.2.1 Ідентифікація метіоніну

Для ідентифікації метіоніну використовуємо аналізатор амінокислот Sykam S 433. Принципом його роботи є метод іонообмінної хроматографії. У спеціальну колонку подається зразок з амінокислотою (в нашому випадку метіонін), усередині колонки міститься іонообмінний фільтр, який затримує амінокислоту, через колонку проходить буферний розчин, який змушує амінокислоти від'єднуватись від фільтру і виходити з колонки. Після виходу з колонки розчини змішуються з нінгідрином (реагент, який добре реагує з амінокислотами) у високотемпературному реакторі, де перетворюються на забарвлені сполуки. Після фарбування розчини проходять через світловий сенсор, який вимірює інтенсивність кольору. Чим інтенсивніший колір, тим більше амінокислоти [7,34].

5.2.2 Визначення кількості метіоніну

Для визначення кількості метіоніну ми будемо використовувати метод RP-HPLC – це метод вискоефективної рідинної хроматографії з оберненим фазовим розділенням.

Метод базується на розділенні компонентів отриманого супернатанту у колонці C18 стаціонарною фазою та визначенні концентрації метіоніну площею піку на хроматограмі.

Для проведення аналізу використовують колонку типу Hypersil BDS C18, рухому фазу у вигляді фосфатного буфера та органічну фазу у режимі з переходом від 0 до 100 % органічної фази за 35 хв. Температура колонки має підтримуватись на рівні 45°C зі швидкістю потоку 1,7мл/хв, об'єм ін'єкції становить 20 мкл.

Для кількісного визначення площі піків необхідно підготувати стандартні розчини метіоніну з концентраціями 5, 10, 20, 50 і 100 мкг/мл і проаналізувати їх у реєстрації площі піків. Отримані дані будують у калібрувальну криву, де площа піку відображає концентрацію метіоніну.

Площа піку отриманого зразка представляється у рівнянні калібрувальної кривої, що дозволяє визначити концентрацію метіоніну у супернатанті. Отриману концентрацію враховують як для об'єму ферментаційної рідини і визначають загальну кількість метіоніну, який був отриманий за час ферментації [9].

5.3 Визначення концентрації азоту

Відбирають пробу культуральної рідини і фільтрують для виділення біомаси перед визначенням загального азоту методом К'ельдаля.

Метод К'ельдаля полягає в перетворенні органічного азоту в аміак. Після повного розкладання органічних сполук амоніак вивільнюється при внесенні луку, далі його дистилюють у розчин. Для отримання стійкої та рівномірної суспензії в розчин вносять полівініловий спирт, який виступає у ролі захисного колоїду.

Отриманий розчин аміаку титрують розчином натрій-хлору для кількісного визначення вмісту азоту. За об'ємом використаної кислоти визначають кількість азоту.

Загальна формула для розрахунку кількості азоту за методом К'ельдаля має вигляд:

$$N(mg) = (V_{\text{кисл}} - V_o) * C_{\text{кисл}} * M_N,$$

де: $V_{\text{кисл}}$ – об'єм розчину кислоти, який був використаний для титрування аміаку,

V_o – об'єм розчину кислоти, який був використаний для титрування холостої проби без зразку,

$C_{\text{кисл}}$ – молярна концентрація кислоти, яка була використана для титрування,

M_n – молярна маса азоту, яка є стандартною і становить 14,007 г/моль.

Джерелом азоту в середовищі для культивування *C. glutamicum* MB001 є сульфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Для отримання більш точних результатів слід уникати надлишків лугу [35].

ВИСНОВКИ

1. Робота спрямована на розробку технології біосинтезу метіоніну, що буде використовуватися як добавка у кормах при відгодівлі великої рогатої худоби.
2. Для виявлення найбільш ефективного біологічного агента для біосинтезу метіоніну проведено порівняння штамів *Corynebacterium glutamicum* MB001, *Corynebacterium glutamicum*-1, *E.coli* 218. Аналіз виявив, що штам *Corynebacterium glutamicum* MB001 є найбільш продуктивним. Вихід цільового продукту при культивуванні зазначеного штаму складає 0,07 г/год, а вартість поживного середовища економічно вигідна і складає 9,99 грн/кг.
3. Проведено розрахунки потужності виробництва, стадій підготовки поживного середовища, вибору обладнання для реалізації біосинтезу.
4. Розроблено технологічну схему біосинтезу метіоніну при культивуванні штаму *C. glutamicum* MB001, яка включає етапи підготовчих робіт та технологічного процесу, стадію біосинтезу, етап знешкодження відходів.
5. Визначено основні методики контролю якості на виробництві, які передбачають технологічний, мікробіологічний та хімічний контроль.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Z. Chen et al. Determination and correlation of temperature and pH value dependent solubility of dl -methionine. *AIChE Journal*. 2020. Vol. 66, no. 8. URL: <https://doi.org/10.1002/aic.16270>
2. E. Cellarier et al. Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*. 2003. Vol. 29, no. 6. P. 489–499. URL: [https://doi.org/10.1016/s0305-7372\(03\)00118-x](https://doi.org/10.1016/s0305-7372(03)00118-x)
3. C. Wei et al. Meta-Analysis of Rumen-Protected Methionine in Milk Production and Composition of Dairy Cows. *Animals*. 2022. Vol. 12, no. 12. P. 1505. URL: <https://doi.org/10.3390/ani12121505>
4. D. Radzikowski et al. Feed additives in the diet of high-producing dairy cows. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica*. 2021. Vol. 19, no. 4. P. 5–16. URL: <https://doi.org/10.21005/asp.2020.19.4.01>
5. C. Wei et al. Meta-Analysis of Rumen-Protected Methionine in Milk Production and Composition of Dairy Cows. *Animals*. 2022. Vol. 12, no. 12. P. 1505. URL: <https://doi.org/10.3390/ani12121505>
6. Z. Chen et al. [Determination and correlation of temperature and pH value dependent solubility of dl -methionine. *AIChE Journal*. 2020. Vol. 66, no. 8. URL: https://doi.org/10.1002/aic.16270](https://doi.org/10.1002/aic.16270)
7. Inui, M., & Toyoda, K. (Eds.). *Corynebacterium glutamicum: Biology and biotechnology* (2nd ed.). 2020. Springer Nature Switzerland AG
8. *Corynebacterium glutamicum MB001 (Strain no. 130936)*. DSMZ – BacDrive Retrieved June 16, 2025.
9. *Biochemistry, Essential Amino Acids*. Lopez MJ & Mohiuddin SS. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–. Updated April 30, 2024. PMID: 32496725.
10. E. Pfeifer et al. [Adaptive laboratory evolution of *Corynebacterium glutamicum* towards higher growth rates on glucose minimal medium. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, no. 1. URL: https://doi.org/10.1038/s41598-017-17014-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-17014-9)

11. Lee H. S., Hwang B. J. Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum* : parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003. Vol. 62, no. 5-6. P. 459–467. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1306-7>

12. Havryliuk I. S. Kultyvuvannia *Brevibacterium heali* dlia vyrobnytva metioninu [Cultivation of *Brevibacterium heali* for methionine production]. National University of Food Technologies, Institute of Biotechnology and Environmental Control, Department of Biotechnology and Microbiology. 2021.

13. Меласа. CraftStore : веб-сайт. URL : <https://craftstore.com.ua/%D0%BF%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BA%D0%B0-%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F-%D0%BC%D0%B5%D0%BB%D0%B0%D1%81%D1%81%D0%B0-1-%D0%BA%D0%B3-%D0%B8%D0%BD%D0%B4%D0%B8%D1%8F/?srsltid=AfmBOorchv33ZGLH91wZs2jUchTD18YrJhhfXgJ-mCMVlQr6l9Jr1lDt>

14. Карбонат кальцію. MyChem: веб-сайт. URL : <https://mychem.in.ua/ua/p2171172319-karbonat-kaltsiya-mychem.html?srsltid=AfmBOop8ZCaEUthUCVAmegv-rnnHDIry18exNuddXIRvu7BvZ7l2iydd>

15. Сульфат магнію. Садіба UA: веб-сайт. URL : https://sadybaua.com.ua/tproduct/549777549-192354294681-sulfat-magnyu-mg-98-mgo-1624-1-kg?srsltid=AfmBOorjlCQH__CwcXjDLKDdVN7W73qJnNonVYDpvN2NW6EYjHa9LEdh

16. Сульфат заліза. TOB XTC: веб-сайт. URL : <https://xtc.com.ua/ua/p1828020516-sulfat-zheleza-zheleznyj.html?srsltid=AfmBOoqN2FLtUCjipK82RvXGQjZWc1TnI5Q6MmPaccIE49GjuHbWT1WR>

17. Сульфат амонію. Агромаг. веб-сайт. URL :
[https://agromag.ua/ua/sulfat-ammoniya-1-kg-\(agromag\)](https://agromag.ua/ua/sulfat-ammoniya-1-kg-(agromag))
18. Біотин. Profitprom. веб-сайт. URL :
https://profiprot.com.ua/ua/p1990751085-vitamin-biotin-profiprot.html?srsltid=AfmBOooSJEB0_PvsuR_So9W35Z_5qzt5GmsuZ1wQn03rpErn-ENzdn3T
19. Монофосфат калію. MyChem: веб-сайт. URL :
<https://mychem.in.ua/ua/p2565010571-monofosfat-kaliya-1kg.html>
20. Глюкоза. Chef's shop: веб-сайт. URL : <https://chefs-shop.com/uk/glyukoza-1kg>
21. Дріжджовий екстракт. VianoKs: веб-сайт. URL :
<https://vianoksgel.ua/ua/p2429300269-drozhzhevoj-ekstrakt.html>
22. Канаміцин. Zoo Vet: веб-сайт. URL :
<https://vetzoo.com.ua/goods/kanamitsin-25-100-ml-o-l-kar-5430270/>
23. Фосфорнокислий натрій. ТОФ СРП: веб-сайт. URL : <https://tov-srp.com/product/natrij-fosfornokislyj/>
24. Хлористий натрій. PROM: веб-сайт. URL :
<https://prom.ua/ua/p5216502-natrij-hloristyj.html>
25. Хлористий амоній. My Store: веб-сайт. URL :
<https://chemilab.com.ua/ru/khimicheskie-veshhestva/16883-ammoniiji-hloriistieji-chda-0-1-kg-3522949000006.html>
26. Хлористий кальцій. Харків Торг: веб-сайт. URL : https://harkiv-torg.com.ua/ua/p739141047-kaltsij-hloristyj-tehnicheskij.html?srsltid=AfmBOoohotjhoErTaEKZKb-rW8eOVWgsSk66yTtkbG5rTMmY1cl_biRQ
27. Тіамін. Bulk Supplements: веб-сайт. URL :
<https://www.bulksupplements.com/uk-ua/products/%D0%B2%D1%96%D1%82%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD-b1-%D1%82%D1%96%D0%B0%D0%BC%D1%96%D0%BD-hcl-%D0%BF%D0%BE%D1%80%D0%BE%D1%88%D0%BE%D0%BA?country=>

UA&srsltid=AfmBOooRC5bG95GVwbb4tJoxvOLsUpe4kD8FiOeX4Wgy5ddZn
HjUqrmr

28. Adonofrio D. URL :
<https://www.flickr.com/photos/adonofrio/6269417254/>

29. Біореактор BLBIO-SJA на 5 м³. Bailun: веб-сайт. URL :
<https://www.bailunbioreactor.com/pid18449009/Popular-stainless-steel-stirred-bioreactor-mechanical-stirring-BLBIO-SJA-SCA-model-suitable.htm>

30. Біомой. ALL HIM: веб-сайт. URL :
https://labormarket.com.ua/ua/p1158551299-biomoj-moyuschee-sredstvo.html?source=merchant_center

31. Кальцинована сода. MyChem: веб-сайт. URL :
https://mychem.in.ua/ua/p1660976832-kaltsinirovannaya-soda-poroshok.html?srsltid=AfmBOor5S5CXE8qxl7Yk0_hEr48qeZhMngu5yYMdfPvq71qkK4F74B-

32. НОВОХЛОП ЕКСТРА. Інтердез: веб-сайт. URL :
<https://interdez.com.ua/product/novohlor-ekstra>

33. Вапно хлорне. AgroRetail: веб-сайт. URL :
https://agroretail.com.ua/ua/p1090465172-izvest-hlornaya-hlorka.html?srsltid=AfmBOooAt45hYgI4MjvxWpBD7uhg1c9sgDyKNHcKw934C_AnA0TkXu9W

34. Vanderheiden G. J., Fairchild A. C., Jago G. R. Construction of a Laboratory Press for Use with the French Pressure Cell. *Applied Microbiology*. 1970. Vol. 19, no. 5. P. 875–877. <https://doi.org/10.1128/aem.19.5.875-877.1970>

35. Willke T. Methionine production—a critical review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014. Vol. 98, no. 24. P. 9893–9914. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6156-y>

36. Аналізатор амінокислот Sykam S433. SYKAM: веб-сайт. URL :
<https://sykam.com/product/amino-acid-analyzers/s-433-amino-acid-analyzer/>

37. Vîrzar I., Untea A.E., Marțura T., Olteanu M., Pănaite T.D., Schitea M., Van I. Development and validation of an RP-HPLC method for methionine,

cystine and lysine separation and determination in corn samples (Bucharest). 2013.
Vol. 64, № 7. P. 673–678.