

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

Інститут (факультет) _____
Кафедра _____

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

« ___ » _____ 20__ р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____ Віктор СТАБНІКОВ _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 20__ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності _____ 162 «Біотехнологія та біоінженерія» _____
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми _____ «Промислові біотехнології» _____

на тему: _____ «Сучасні підходи у біотехнології гідролітичних ферментів» _____

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 1М

_____ КИСЛИЙ Владислав Павлович _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____ Людмила РЕШЕТНЯК _____
(прізвище та ініціали) (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) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2023р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

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

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” листопада 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Кислий Владислав Павлович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Сучасні підходи у біотехнології гідролітичних ферментів»

керівник роботи Воронцов Олександр Олександрович, доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 780-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2023

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus methylotrophicus*
DCS1 цільовий продукт: ферментний препарат на основі амілази

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Огляд сучасних підходів у біотехнології гідролітичних ферментів, РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва продукту мікробного синтезу, РОЗДІЛ 3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях, РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання, РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми, РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва продукту мікробного синтезу, РОЗДІЛ 7. Проект технічних умов (ТУ) на випуск товарної форми цільового продукту

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема виробництва – 1 аркуш А1. Технологічна схема – 1 аркуш А3

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Огляд сучасних підходів у біотехнології гідролітичних ферментів	10.12.2022-17.12.2022	
2	Техніко-економічне обґрунтування виробництва продукту мікробного синтезу	18.12.2022-24.12.2022	
3	Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	25.12.2022-30.12.2022	
4	Специфікація обладнання	31.12.2022-05.01.2023	
5	Опис технологічної схеми	6.01.2023-10.01.2023	
6	Контроль виробництва продукту мікробного синтезу	11.01.2023-17.01.2023	
7	Проект технічних умов (ТУ) на випуск товарної форми цільового продукту	18.01.2023-24.01.2023	
8	Оформлення пояснювальної записки	25.01.2023-31.01.2023	
9	Виконання графічної частини проекту	25.01.2023-31.01.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Кислий Владислав
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Воронцов Олександр
(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

Реферат.....	4
Вступ.....	5
РОЗДІЛ 1. Огляд сучасних підходів у біотехнології гідролітичних ферментів	8
1.1. Генетична модифікація продуцентів.....	9
1.1.1. Раціональна реконструкція.....	9
1.1.2. Спрямована еволюція.....	11
1.2. Підвищення синтезу ферментів шляхом додавання наночастинок.....	13
1.3. Використання відходів виробництв для підвищення екологічності виробництва.....	14
1.4. Оптимізація умов культивування та складу ПС.....	16
1.5. Пошук нових штамів продуцентів.....	17
РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва продукту мікробного синтезу.....	26
2.1. Потреба у цільовому продукті.....	26
2.2. Обґрунтування вибору біологічного агенту для інженерної частини роботи.....	34
2.3. Розрахунок річної потужності виробництва.....	46
2.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту мікробного синтезу.....	40
РОЗДІЛ 3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	43
РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання.....	47
РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми.....	50
РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва продукту мікробного синтезу	53
6.1. Визначення амілазної активності.....	54
6.2. Визначення вологовмісту.....	56

РОЗДІЛ 7. Проект технічних умов (ТУ) на випуск товарної форми цільового продукту.....	58
Список використаних джерел.....	80
Додатки.....	87

РЕФЕРАТ

Робота присвячена дослідженню новітніх підходів в біотехнології пов'язаній з синтезом гідролітичних ферментів. В літогляді було описано основні сучасні підходи в біотехнології ферментів, також було наведено приклади використання цих методів для окремих продуцентів та описано способи їх виділення. Серед різних представників гідролаз було обрано один з найбільш застосовуваних у виробництві ферментів – амілазу.

Після порівня з іншими зразками в якості продуцента альфа - амілази було обрано штам *Bacillus methylotrophicus* DCS1. Розрахована потужність його виробництва становить 215 кг препарату за рік.

Для виділення та очистки продукту було запропоновано центрифугування та дві стадії ультрафільтрації з подальшим випарюванням отриманої речовини. Висушування продукту здійснюють за допомогою ліофільної сушки.

Розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва ферментного препарату. Запропоновано проект технологічних умов (ТУ) виробництва продукту та методи контролю для його виробництва.

Дипломний проект викладений на 89 стор. друкованого тексту, містить 8 таблиць, 2 рисунки і складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (71 джерело) та графічної частини (2 креслень одне з яких формату А1 і одне креслення формату А3).

Ключові слова: ферменти, гідролітичні ферменти, гідролази, амілаза, виділення, ультрафільтрація, продуцент, біосинтез.

ВСТУП

Ферменти – це органічні каталізатори білкової природи, які необхідні для численних хімічних взаємоперетворень, що підтримують життя. Вони прискорюють усі обмінні процеси в організмі та виконують конкретне завдання. Ферменти дуже ефективні, можуть в декілька разів збільшувати швидкість хімічної реакції. Завдяки розвитку рекомбінантної технології та білкової інженерії ферменти перетворилися на важливу речовину, яка широко використовується у різних промислових та терапевтичних цілях.

Мікробні ферменти нині привертають велику увагу у зв'язку зі швидким розвитком біотехнологічного ринку. Перевага віддається мікробним ферментам через їх економічну доцільність, високі виходи, консистенцію, простоту модифікації та оптимізації продукту, регулярні поставки через відсутність сезонних коливань, швидке зростання мікробів на недорогих середовищах, стабільність і велику каталітичну активність.

А найбільшого значення серед них здобули гідролітичні ферменти. Як можна бачити з діаграми (Рис.1) гідролази займають більше половини ферментного ринку [1].

Що не дивно адже вони мають широкий спектр практичного використання. Це може бути як харчова промисловість так і виробництво миючих засобів та навіть виробництво біопалива [2].

Гідролази - це клас ферментів, які зазвичай діють як біохімічні каталізатори, які використовують воду для розриву хімічного зв'язку, що зазвичай призводить до розподілу більшої молекули на дрібніші. Деякими поширеними прикладами ферментів гідролаз є естерази, включаючи ліпази, фосфатази, глікозидази, пептидази та нуклеозидази.

					НУХТ БТЕК 02 01 03 КР ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Вступ		
<i>Розроб.</i>		<i>Кислий В.П.</i>					
<i>Перевір</i>		<i>Воронцов О.О.</i>					
<i>Консульта</i>							
<i>Н.Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>		<i>Стабников В.П.</i>			Кафедра БТМ		
					<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акривієв</i>
						5	89

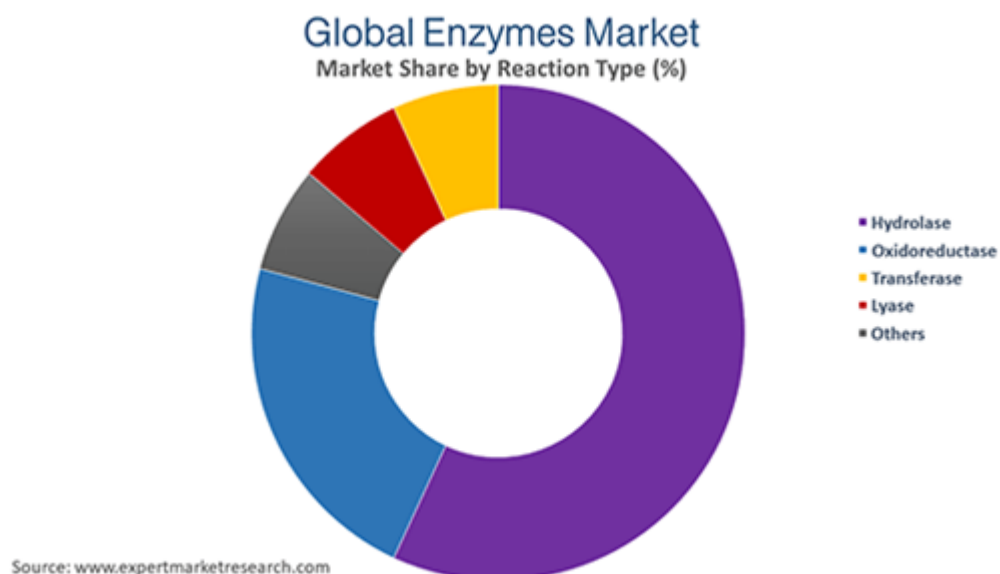


Рис1. Світовий ринок ферментів.

Попит на гідролази постійно зростає адже шляхи їх використання в промисловості постійно розширюються, а галузі в яких вони використовуються постійно розвиваються. Ще одним фактором, що допомагає в розвитку ферментного ринку є постійне посилення жорстокості екологічних норм та правил, що стосуються хімічних речовин та змушує переходити на їх біологічні аналоги [3].

Одним із найпоширеніших представників гідролаз є амілаза. Вона виробляється декількома бактеріями, грибами та генетично модифікованими видами мікробів. Найбільш широко використовуваним джерелом серед видів бактерій є *Bacillus spp.* *B. amyloliquefaciens* та *B. Licheniformis* які широко використовуються для комерційного виробництва ферменту. Грибкові джерела α -амілази обмежені наземними ізолятами, переважно це *Aspergillus* та *Penicillium*. Синтез амілази як і будь якого фермента може бути модифіковано за допомогою різних штамів бактерій та середовища культивування (наприклад, джерело вуглецю, іммобілізація клітин, температура, рН, швидкість змішування, об'єм посівного матеріалу та повітряний потік).

Амілази знаходять широке застосування в різних галузях промисловості, таких як харчова, хлібопекарська, паперова, текстильна, підсолоджувачі, сиропи глюкози та фруктози, фруктові соки, миючі засоби, паливний етанол з крохмалю, алкогольні напої, засоби для травлення та засоби для виведення плям. у хімчистці.

Бактеріальні α -амілази також використовуються в клінічній, медичній та аналітичній хімії. Сьогодні амілаза практично замінила хімічний гідроліз крохмалю у промисловості з його переробки [4].

Актуальність теми. Приймаючи до уваги широкий спектр застосування та постійне збільшення попиту на виробництво гідролітичних ферментів, бачимо потребу в дослідженні сучасних підходів до їх біотехнології.

Новизна. Використання високопродуктивного штаму, нового продуцента амілаз *Bacillus methylotrophicus* DCS1. Застосування схеми виділення цільового продукту, що дозволяє обійтись без стадій осадження ферментів різними хімічними елементами.

РОЗДІЛ 1. Огляд сучасних підходів у біотехнології гідролітичних ферментів

Гідролази - найбільший і різноманітний клас ферментів, що включає понад 200 ферментів, що каталізують гідроліз кількох типів сполук. Вони каталізують гідролітичний розрив зв'язків вуглець-кисень (C-O), вуглець-азот (C-N), вуглець-вуглець (C-C), фосфор-азот (P-N) та ін.». Однак загальні імена зазвичай мають форму "субстратази", така як нуклеаза, відноситься до ферменту, який гідролізує нуклеїнові кислоти. Приклади деяких поширених гідролаз включають естерази, протеази, глікозидази та ліпази [5].

Гідролітичні ферменти є не тільки фізіологічно важливими, граючи роль у різних клітинних процесах, але також мають безліч комерційних застосувань. Промислове значення гідролаз перевищує значення інших класів ферментів, які займають найбільшу частку ферментів, які у промислових цілях. Майже 75% всіх промислових ферментів є гідролітичними ферментами. На ринку ферментів домінують карбогідрази, протеази та ліпази, на частку яких припадає понад 70% усіх продажів ферментів. Багато галузі промисловості, такі як миючі засоби, шкіра, текстиль, целюлоза та папір, продукти харчування та корми, молочні продукти, біопаливо та переробка відходів залежать від гідролаз. Протеази залишаються домінуючим типом ферментів через їхнє широкого використання у виробництві миючих засобів та молочної промисловості [6].

Через ці всі фактори запити виробників до постійного покращення процесу біосинтезу стають дедалі активнішими, дослідники застосовують різні підходи, серед них може бути постійний пошук нових перспективних мікроорганізмів продуцентів, крім того, інновації впроваджуються в природні ферменти з

					ІНСТІТУТ БІОТЕХНОЛОГІЙ І НАНТЕХНОЛОГІЙ НА НАУКОВИЙ ЦЕНТР НАН УКРАЇНИ		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>	<i>Кислий В.П.</i>				<i>Лит.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Актуальні</i>
<i>Перевір</i>	<i>Воронцов О.О.</i>					8	89
<i>Консульта</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н.Контр.</i>					<i>РОЗДІЛ 1. Огляд сучасних підходів у</i>		
<i>Затверд.</i>	<i>Стабников В.П.</i>				<i>...</i>		

використанням різних інструментів технології рекомбінантної ДНК та білкової інженерії, що дозволяє перепроєктувати ферменти для їх кращого пристосування до процесу. Окрім зміни самих продуцентів, сучасні біотехнології продовжують досліджувати вплив різних речовин на процес утворення ферментів під час культивування. Об'єднання даних методів в з пошуком або створенням нових високопродуктивних штамів мікроорганізмів продуцентів та пошуком речовин що допомагають підвищити вихід ферментів, в майбутній перспективі може дати великий прогрес в технології біосинтезу ферментів [7].

Також актуальним в нас час постійно залишається оптимізація поживних середовищ та умов культивування для підвищення ефективності культивування мікроорганізмів. Важливою складовою сучасної біотехнології є намагання підвищити екологічність виробництв, через це важливим в наш час є пошук варіантів заміни стандартних поживних середовищ на відходи різних виробництв.

У цьому огляді ми обговорюємо сучасні біотехнологічні напрями розвитку технології виробництва гідролітичних ферментів. Та узагальнюємо поточні знання про джерела таких ферментів та їх модифікацію.

1.1. Генетична модифікація продуцентів

Зважаючи на сталий розвиток, інтерес кінцевих користувачів змістився з хімічних продуктів на ферментні продукти. Зростаючий інтерес до використання ферментів для промислових процесів стимулював пошук біокатализаторів з новими або покращеними властивостями шляхом включення деяких неминучих технологій редагування генів і нової бактеріальної платформи для терапевтичних ферментів

Для вдосконалення існуючих ферментів існує два підходи, які дозволяють змінити дизайн ферменту, який може або підвищити активність, або обмежити інгібіторні проблеми ферменту [8].

1.1.1. Раціональна реконструкція

Раціональна реконструкція – як впливає з назви, вона змінює дизайн існуючого біокатализатора за допомогою спрямованого на сайт мутагенез, таким чином, вимагає повного знання 3-D білкових структур і механізму ферментативної реакції [9]

Традиційно ферменти оптимізували з використанням статистичних підходів, таких як метод поверхневого відгуку та Taguchi [10]. З розвитком технологій стало можливим редагувати специфічні залишки в природному ферменті, щоб отримати найкращий фермент із покращеними функціональними властивостями. Це може бути досягнуто за допомогою високопродуктивних технологій або використання екстраординарних джерел, а саме. екстремальних умов, щоб їх фермент міг підтримувати та працювати краще в екстремальних умовах [11].

Прогрес у сфері модифікації ферментів дозволив налаштувати біокаталізатор задля досягнення промислових цілей. Сайт-спрямований мутагенез є одним із таких інструментів для створення нових білків, які є ефективними каталізаторами. Він включає редагування амінокислоти в конкретному сайті і оцінку ефекту білка, що мутував, таким чином, метод є вибором для тих білків, структура і механізми дії яких вже відомі.

Перевага у тому, що у оцінку йде менше часу, оскільки кількість вироблених варіантів менше. Це допомагає в оцінці структурних та функціональних аспектів певних амінокислотних залишків у білку. Основним застосуванням сайт-спрямованого мутагенезу є надання біокаталізатору нових властивостей, таких як підвищена специфічність, стабільність, активність, розчинність, експресія тощо *Bacillus megaterium* був клонований і мутований. Дослідження як допомогло поліпшити властивості ферменту, а й дало величезну структурно-функціональну інформацію, яка також виявила механізм підвищення активності на молекулярному рівні. Вони виявили білок, який містить тунельну структуру, і NAD (кофактор) пробивається до активного центру через цей тунельний білок [12]. Нещодавно цей підхід був застосований до рослинних культур для введення мутацій з використанням сайт-спрямованих нуклеаз.

Його перевага полягає у більш швидкому та контрольованому редагуванні геному з використанням спрямованого мутагенезу, заміни генів та вставки трансгенів [13]. Сайт-спрямований мутагенез також поширюється іммобілізовані ферменти. Раніше іммобілізація використовувалася для збереження функції ферменту з використанням підкладки, що прикріплена до ферменту випадковим

чином. Оскільки орієнтація ферменту грає значну роль каталізі, тому дослідники зрозуміли, що іммобілізувати фермент у певної орієнтації з деякими певними залишками. Було кілька повідомлень, в яких фермент не може бути іммобілізований через їх іонні перешкоди, сайт-спрямований мутагенез дозволив іммобілізувати такий фермент. Приклад, коли пеніцилін G ацилазу з *Escherichia coli* зроблений для адсорбції на носіях, покритих DEAE або поліетиленіміном, шляхом введення восьми залишків Glu шляхом сайт-спрямованого мутагенезу. Часто спостерігалось, що ферменти після іммобілізації втрачають певні властивості, такі як термостабільність і т.д [14].

1.1.2. Спрямована еволюція

Спрямована еволюція є неупередженим підходом до генерації варіантів, що імітує природний процес. Природа потребує років, щоб розвиватися шляхом мутації або рекомбінації, і вона вибирає на основі виживання найбільш пристосованого. Цей метод дає можливість отримати мутантний продукт протягом кількох тижнів шляхом створення бібліотеки мутантів та відбору членів на основі бажаної відповідної властивості. Він також долає блокаду білків, структура чи каталітичний механізм яких невідомі.

Даний метод вимагає ефективної системи скринінгу з високою пропускнуою здатністю, оскільки кількість варіантів, що виробляються, часто велика. Цей метод вводить випадкові мутації в ген з основною метою охарактеризувати відкриті рамки зчитування, створюючи безліч варіантів, які піддаються скринінгу на наявність відповідних властивостей [15].

Ця невибіркової мутагенез у генах ґрунтується на двох методах, т . е. спрямованої еволюції *in vitro* та рекомбінації генів. Спрямована еволюція *in vitro* здійснюється за допомогою різних методів, таких як хімічний мутагенез, мутагенез з насиченням сайтів, схильна до помилок ПЛР, з використанням штамів-мутаторів, тоді як методи, засновані на рекомбінації генів, являють собою перетасовування ДНК, процес ступінчастого (StEP), випадковий хімерогенез на перехідних матрицях (RACHITT), ітеративне усічення для створення гібридних ферментів (ITCHU),

рекомбіноване подовження на усічених матрицях (RETT). Хоча висновку про те, який метод найкраще підходить для конкретної мутації, немає [16].

Однак найчастіше використовується схильна до помилок ПЛР, де успіх заснований на частоті помилок полімерази Taq або зміні концентрації dNTP, іонів Mg, додаванні аналогів нуклеотидних основ з використанням мутазимної полімерази під час ПЛР [17].

В цілому розглянувши сучасні підходи у генній інженерії можна сказати, що це один із найбільш прогресивно розвиваючихся галузей біотехнології. Серед наведених методів кожен має свої плюси та мінуси. Проте найперспективнішим є раціональна реконструкція, оскільки напрямлена еволюція має ряд суттєвих недоліків. Серед них, наприклад, деяка спонтанність мутацій, після перероблення генів в штаму можуть з'явитися як нові позитивні сторони, так і негативні ефекти.

Далі розглянемо приклади сучасних досліджень з генетичної модифікації продуцентів які проводилася частково з використанням даних методів. Одним з таких штамів є *Fusarium Incarnatum* KU377454 [18]. В якості мутагену для цього штаму використовували етилметилсульфонат (EMS) для посилення вироблення ліпази. Вибраний штам грибів обробляли хімічними мутагенами EMS (2%) протягом 2 год і інокуляти витягували через часті інтервали часу: 5 хв, 10 хв, 15 хв, 30 хв, 60 хв, 90 хв та 120 хв з наступним нанесенням на середовище з картопляним декстрозним агаром та інкубацією при 27 °C протягом 24 год. Штам з найбільшою ліпазною активністю і був обраний для дослідження. Також було оптимізовано ПС для вирощування продуцента. В результаті найбільший вихід ліпази спостерігався в наступному ПС: CaCl₂ 0,1%, пшеничні висівки 8%, дріжджовий екстракт 1%. Ще один генномодифікований штам був виділений з *A. niger* 89. Його отримали шляхом експресії повнорозмірних генів ANL, що відповідають за синтез ліпази. Експресія була додатково покращена шляхом введення послідовності Козака навколо стартового кодону через більш високу ефективність трансляції. Ферментацію проводили на середовищі наступного складу (г/л): NaNO₃ - 2, KCl - 0,5, MgSO₄ · 7H₂O - 0,5, K₂HPO₄ · 3H₂O - 1, FeSO₄ · 7H₂O - 0,01, (NH₄)₂SO₄ - 10, Оливкової олії - 20, Кукурузного крохмалу - 40, при pH 3,0 [19].

Іще одним геномодифікованим штамом став продуцент целюлази гриб *Trichoderma reesei* [20]. Модифікація відбувалась шляхом сверхекспресії генів EG₂ – BGL₁, що впливали на синтез целюлази. Подібні маніпуляції підвищили вихід ферменту майже в 2 рази.

Загалом методи генетичної модифікації в сучасній біотехнології є основою для покращення ефективності виробництва ферментів. Такі методики дають надійні результати і не несуть за собою ніяких ризиків і мінусів на відміну від інших представлених в роботі. З їх допомогою можна не тільки підвищити продуктивність, а і підвести деякі характеристики ферменту під потрібні виробнику.

1.2. Підвищення синтезу ферментів шляхом додавання наночастинок

Однією з сучасних тенденцій синтезу ферментів є додавання наночастинок які б могли підвищити синтез позаклітинних ліпаз. Додавання мікрочастинок - це новий підхід до збільшення виробництва ферментів нитчастими грибами в зануреній культурі. Мікрочастинки також контролюють морфологію міцеліальних грибів під час ферментації, запобігаючи масовому росту грибів. Так нещодавно група руминських вчених на чолі з Чичолі А.А. [21] дослідили вплив наночастинок на синтез ліпаз в різних продуцентах. Для підвищення біосинтетичних здібностей продуцентів була протестована велика група наноокислів металів, з яких індивідуально для кожного штаму були відібрані найперспективніші наночастки; виявлено їх оптимальні розміри та концентрації:

- для *Trichoderma koningii* CNMN FD 15 — наночастинки ZnO, з оптимальними розмірами 30 нм, концентраціях 5-10 мг/л середовища;
- для *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – наночастинки Fe₃O₄, з оптимальними розмірами 65-70 нм, концентрації 10 мг/л середовища;
- для *Aspergillus niger* CNMN FD 01 — наночастинки TiO₂, з оптимальними розмірами 40 нм, концентрації 10 мг/л середовища;
- для *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 — наночастинки Fe₃O₄, з оптимальними розмірами 70 нм, концентрації 5-10 мг/л середовища.

Наночастинки вносилися до посівного матеріалу перед посівом. Заміри показників ліполітичної активності показали, що у мікроміцету *Rhizopus arrhizus* CNMN FD 03 [22] використання наночастинок Fe_3O_4 забезпечує значне посилення активності у 3 рази порівняно з максимальним контрольним варіантом; а у штаму *Aspergillus niger* CNMN FD 01 [23] ліполітична активність збільшується на 55,3–57,5% при використанні наночастинок TiO_2 .

Цікавляться впливом наночастинок на покращення виходу ферментів не тільки східноєвропейські вчені, а і азійські. Саме так індійський вчений Vijender Singh [24] дослідив вплив наночастинок на продукцію амілази *Aspergillus oryzae* SBS50. За допомогою додавання порошку тальку та оксиду алюмінію збільшили виробництво амілази з 6,13 до 13,145 Од/мл. Морфологія грибів також була розроблена за допомогою мікрочастинок. Розмір гранул грибів значно зменшився (~90%) з допомогою додавання мікрочастинок. Час ферментації було скорочено з 4 до 3 днів після додавання мікрочастинок, що значно підвищило продуктивність ферментів

В цілому інтерес до впливу наночастинок на синтез ферментів виник відносно нещодавно. Цей метод може підвищити ефективність синтезу вже досліджених продуцентів ферментів без втручання в їх генетичну структуру, відкидаючи необхідність пошуку більш продуктивних штамів продуцентів. Можливим мінусом цього методу може стати суттєве підвищення собівартості виробництва при переході на промислові масштаби випуску продукції.

1.3. Використання відходів виробництв для підвищення екологічності виробництва

В останні десятиліття популярність та поінформованість про охорону навколишнього середовища зросли, оскільки загроза глобального потепління стала більш тривожною, ніж будь-коли. У свою чергу, попит на захист навколишнього середовища зріс. Розвиток науки відіграв ключову роль у встановленні екологічних стандартів.

Це стало одним з факторів збільшення інтересу до біологічних активних речовин, таких як ферменти. В свою чергу використання при їх синтезі відходів з різних виробництв ще більше вплине на екологічність виробництва. Через це вчені активно працюють над розробкою нових поживних середовищ на основі відходів сільськогосподарського та деяких інших виробництв.

В 2021 Dayana P.Meneses з колегами [25] провели дослід з вирощування *Aureobasidium pullulans* URM 7059, продуцента екстрази, на середовищі з використання залишкового біодизельного гліцерину в якості субстрату. Вирощування відбувалося на наступному середовищі: гліцерин (0,1 % об/об), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4 г/л) та дріжджовий екстракт (8 г/л) було отримано 28.6 ± 1.8 ОД/мл ферменту. Штам в результаті досліджень проявив хороші темпи росту.

Один з прикладів оптимізації поживного середовища з використанням біологічних відходів використовується при синтезі *Bacillus velezensis* KB 2216 [26]. В роботі, окрім дослідження виробляємої штамом амілази, було встановлено оптимальний час культивування та перевірено ефективність використання відходів виробництва в якості субстратів для росту мікроорганізмів. Для вирощування продуцента використовували середовище наступного складу: 4% шолухи бобів, 2% соєвого жмиха, 1,5% фруктози, 0,5% NaNO_3 , 0,3% KH_2PO_4 , 0,1% MgSO_4 при pH 5,0. Оптимальним періодом інкубації є 72 години, в цей час мікроорганізми перебувають в стаціонарній фазі росту і подальше культивування призведе до зменшення вмісту амілази яка на цей час становить 2,78 ОД/мл.

Оскільки серед продуцентів гідролітичних ферментів досить багато нитчастих грибів доволі часто зустрічаються розробки в напрямі твердофазної культивування. Як вважається вона ідеально підходить для вирощування подібних видів мікроорганізмів і дає змогу значно зменшити вартість виробництва. Так для штаму грибка *Aspergillus oryzae* було розроблено оптимальне поживне середовище на основі відходів сільського господарства [27]. В роботі порівнювався вплив різних відходів з їх концентрацією в середовищі, в результаті найпродуктивнішою виявилася сполука соєвої шолухи та пшеничних висівок. Також були підібрані

оптимальна температура та рівень рН для отримання максимального рівня ферментів. Для того ж продуцента *A. Oryzae* через рік розробили ще одне середовище на основі с/г відходів [28]. Окрім іншого компонентного складу стаття виділяється застосування для синтезу нового експериментального ферментеру об'ємом 600л.

Тенденція використання відходів у виробництві є дуже позитивною. Окрім очевидної користі для природи, переробка відходів у якості поживних середовищ має і економічний ефект, виробникам набагато дешевше використовувати саме відходи замість звичайних середовищ. Єдиною проблемою в цьому випадку може стати пошук місця де б можна було дістати відходи в потрібній кількості.

1.4. Оптимізація умов культивування та складу ПС

Іще одним з сучасних способів покращення виробництва ліпаза є оптимізація загальноприйнятих поживних середовищ. Навіть для однакових мікроорганізмів споживання поживних речовин може відрізнятися в залежності від його штаму. Саме тому навіть зараз деякі виробництва які користуються загальноприйнятими поживними середовищами мають потребу в оптимізації процесу. Сучасні технології допомагають значно полегшити цей процес.

Розберемо деякі сучасні дослідження вчених з різних країн, що стосуються оптимізації процесів біосинтезу гідролітичних ферментів. У 2021 році [29] група вчених вивчила вплив компонентів ПС на біосинтез ліпази дріжджами *Yarrowia Lipolytica* Y-3153. Вони з'ясували, що хоч і при більшій концентрації глюкози збільшується вихід біомаси, кількість виділеної ліпази зменшується. Це пояснюється тим, що коли вичерпується глюкоза клітини починають споживати олії що містяться в середовищі, а для їх розщеплення і потрібно виділення ліпази. Після врахування всіх факторів найбільш ефективним визначили середовище наступного складу (г/л): глюкоза - 5, дріжджовий автолізат – 5, зневоднена сойова мука – 40, твін-20 – 0,001 мг/мл. Така оптимізація допомогла збільшити синтез ліпази в 2 рази (210 Од/мл).

Viplab Kumar Dash зі співавторами [30] оптимізували умови для біосинтезу амілази *Bacillus subtilis* ВІ19. Під час проведення дослідження було виявлено, що рисове борошно, крохмаль і кукурудзяне борошно є стимуляторами вироблення амілази. Рисове борошно в концентрації 1,25% (мас./об.) підтримувало оптимальне виробництво ферментів, за чим слідувало зниження при більш високих концентраціях. Це можна пояснити високою в'язкістю культурального бульйону за таких концентрацій, які перешкоджають надходженню O₂. Умови культивування 24 години інкубації при 37 ° С з вихідним рН середовища 8,0. Максимальна продукція амілаз складала 8,67 Од / мл.

Іще одним прикладом роботи над оптимізацією поживного середовища є *Bacillus methylotrophicus* DCS1 [31]. Особливістю цього штаму є те що він одночасно продукує і амілази і ліпопептид біосурфактант. В якості джерела вуглецю використовується картопляний крохмал (20 г/л), а в якості джерела азоту глутамінову кислоту (5 г/л). В результаті отримуємо амілазу концентрацією 6,94 Од/мл. Дослідження проведені вченими змогли підібрати ефективне і доволі дешеве поживне середовище, що робить цей штам цікавим прикладом для використання в промисловому біосинтезі.

Gaurav Pant з колегами розробили технологію синтезу і очістки протеаз з *Bacillus subtilis* [32]. У даній роботі було здійснено розробку економічно ефективного виробничого процесу одержання протеази *Bacillus subtilis* та було отримано найвищий вихід ферменту (175,083 Од / мл).

Звичайно методи оптимізації поживних середовищ та умов культивування не є новими, проте вони є невід'ємною складовою сучасною біотехнології. В процесі дослідження інтегруються новітні технології які полегшують обчислювання для вчених, проте поки що нема сучасного методу якій би міг замінити цей.

1.5. Пошук нових штамів продуцентів

Фактично пошук нових продуцентів є відлаженим методом, що має свою послідовність процедур, проте його результати визначається виключно

випадковістю. Провівши пошук вчені можуть як не відкрити нічого вартісного, так і знайти новий потенційний мікроорганізм продуцент. Для збільшення вірогідності знайти необхідний продуцент потрібно правильно підібрати середовище з якого буде здійснюватися відбір. Наприклад для термофільних ферментів які б можна було б використовувати в виробництві миючих засобів відбір краще здійснювати поряд з гарячими джерелами, де мікроорганізми адаптувалися до росту при високих температурах.

Розберемо деякі приклади відкриття нових штамів в дослідженнях останніх років. Так Марита Хіменес разом з колегами провела дослідження нитчастих грибів в пошуках нового високопродуктивного біологічного агента [33]. Для цього вони виділили мікроорганізми з ґрунту в різних регіонах Бразилії. Далі гриби були підвергнуті скрінінгу в пошуках найкращого продуцента. Серед виділених зразків найбільшу активність проявив *Hypocrea pseudokoningii*. Вчені дослідили вплив різних джерел поживних речовин на синтез ліпази в продуценті і найкращі показники спостерігалися при використанні Твін-80 в якості джерела вуглеводів, та дріжджового екстракту як джерела азоту. Пікові показники ліпазної активності (6 Од/мл ліпази при 10^7 спор/мл) спостерігали на 4 день культивування. Іще одним потенційним продуцентом виділеним з ґрунту є гриб *Curvularia sp.* DNE 5 [34]. Штам був виділений із ґрунту в регіоні Міт-Гамра, Ель-Дакалея, Єгипет і опізнаний, як і в інших прикладах, за допомогою тесту 16-s РНК. Ліпазну активність визначали вирощуванням спор виділених грибів на чашках Петрі з додаванням трибутерину на фенол червоному агарі (Протеозопептон – 10, м'ясний екстракт – 1, натрій хлорид – 5, феноловий червоний – 0,025 г/л). Зразки які найбільше забарвили середовище додатково вирощували в колбах з різними ПС та перевіряли рівень виділеної ними ліпази. Додатково було встановлено оптимальне ПС та технологічні параметри для вирощування продуценту. Найбільший вихід біомаси спостерігався при культивування на середовищі з пшеничними висівками при температурі 30°C та рН 7,0, додатково було встановлено що додавання оливкової олії як індуктора та КСІ як джерела іонів додатково збільшувало продукцію ліпази до $(88,9 \pm 1,2)$ Од/г у перерахунку на суху масу. В 2020 році був відкритий ще один потенційний продуцент

ліпази [35]. Зразки були взяті з стічних вод, що йшли від місцевої маслоробки. Після перевірки ліпазної активності в виділених грибах найпродуктивнішим виявився штам *Meyerozyma guilliermondii* NRRL Y-7400. Після цього для нього було обрано оптимальне поживне середовище та час росту. Особливістю штаму є те, що він може рости на відходах від молочного виробництва використовуючи в якості єдиного джерела живлення 2% молочну сировотку. Оптимальними умовами для його росту є рН 4,0 впродовж 24 годин. При цьому він буде виділяти 285.82 Од/мл⁻¹ ліпази. Нещодавно в Турції відкрили виділили ще один продуцент ліпази *Bacillus cereus* ATA179 [36]. Як і в попередніх статтях ряд виділених в природі мікроорганізмів перевіряли на ліпазну активність на тестових середовищах та визначали їх родову належність за допомогою 16-s РНК тесту. Далі для аналізу відбирають найбільш активні об'єкти та для визначення найкращого продуцента використовуються три різні середовища (Kumar et al., 2005; Hasan et al., 2006; Dahiya and Purkayastha, 2011) і порівнюють між собою результати. Для обраного БА були підібрані оптимальне ПС, температура культивування та рівень рН. В ході досліджень було виявлено, що неорганічні джерела поживних речовин для даного продуцента ефективніші, ніж органічні. Максимальну продукцію ферменту було досягнуто при рН = 7,0. При рН 4,0 зростання не спостерігалось. Хоча при високих значеннях рН кількість біомаси збільшувалась, було визначено зниження продукції ферментів.

З наведених статей бачимо, що неодмінною складовою в дослідженні нових продуцентів є також і оптимізація ПС та умов культивування. Підбір приходить відповідно до принципів описаних в попередньому розділі.

Цікавим прикладом відкриття нових продуцентів є гриб *Tuber maculatum*, наведена стаття є першим структурованим дослідженням вивчаючим виділення позаклітинної амліази у даного виду грибів [37]. Особливістю даного продуценту є належність до роду *Tuber*, тобто трюфелів, що мають найвищу економічну вартість серед їстівних грибів. В роботі дослідники провели оптимізацію ПС для промислового культивування, встановили оптимальні умови росту культури,

перевірили вплив іонів металів та температури на активність виділеної амілази. Оптимізовані умови після експериментів включали розчинний крохмаль як джерело карбону (0,5% мас./об.), вихідний рН середовища 7,0 та час інкубації 7 днів при кімнатній температурі ($22\pm 2^\circ\text{C}$). Тобто як бачимо навіть нові вже дослідженні організми можуть виявитися потенційним продуцентом корисних речовин таких як ферменти.

Прикладом вдалого пошуку термостабільних ферментів є дослід якій відбувся у 2020 р, де група вчених на чолі з Marwan Jawad Msarah [38] провели скрінінг гарячих джерел в пошуках нових продуцентів термостабільних амілаз. Результатом дослідження став ідентифікований штам *Bacillus licheniformis* SUNGC2. Цей штам є термофільним і тому оптимальна температура культивування складала 50°C , в результаті чого концентрація ферменту складала 24.65 Од/мл. В результаті ще одного подібного дослідження було відкрито продуцент термофільної целюлази був виділений з гарячих джерел і ідентифікований як *Geobacillus sp.* HTA426 [39]. В ході оптимізації ПС було виявлено, що середовища в яких містяться нітрити та нітрати, токсичні для продукції целюлази. В результаті було обрано середовище з пептоном в якості джерела карбону, воно забезпечило вихід ферменту в районі 54.99 Од/мл.

Нещодавно вчені дослідили нових високоефективних продуцентів пектинази і лаккази [40]. Для виділених в процесі скрінінгу з лянної мочалки грибів визначали пектитазну і лакказну активність. Найбільший рівень отримання цільового продукту був помічений у *Aspergillus pulverulentus*, F23 з пектиназною активністю 2.265 Од/мл. Для визначення активності застосовували ПС з пектиназою в якості джерела карбону.

Уцілому оглянувши роботи присвячені сучасним біотехнологічним підходам до синтезу гідролітичних ферментів можна сказати, що наука не стоїть на місці. Кількість новітнього матеріалу по темі є приголомшливою. Найбільшого розвитку зараз набули методи генетичної модифікації продуцентів, що пов'язанно з бурхливим розвитком генної інженерії яка створила низку нових підходів у розробці генно-модифікованих штамів. Також інновації проводяться і для безпосереднього

процесу культивування мікроорганізмів. Дослід з додавання наночастинок до поживного середовища дали дійсно дієві результати і допомогли збільшити вихід ферменту в декілька разів в деяких зразках. Звичайно розвиток технологій полегшує і спрощує доволі давні біотехнологічні методи такі як оптимізація поживного середови і умов культивування. Окрім цього нельзя забувати про те що вчені постійно проводять скрінінг різних середовищ, що допомагає віднайти не тільки нові штами продуцентів, а й принципово нові види мікроорганізмів що продукують ферменти. Важливою частиною є також дослідження можливого використання відходів різних виробництв які б могли забезпечити створення практично безвідходних екологічно чистих виробництв.

Узагальнююча таблиця синтезу гідролітичних ферментів

№	Назва ферменту	Продуцент	ПС, г/л	Масообмін та аерація	pH	Температура, °	Тривалість, год	Вихід ферменту, Од/мл	Особливість процесу	Література
1	Ліпаза	<i>Fusarium Incarnatum</i> KU377454	пшеничні висівки – 80, дріжджовий екстракт – 10, CaCl – 1	–	7,0 ± 0,2	30	20	3,01	Генно-модифікований штам, оптимізація ПС	[18]
2	Ліпаза	<i>A. niger 89</i>	Кукурудзяний крохмал – 40, оливкова олія - 20, NaNO ₃ - 2, KCl – 0,5, MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,5, K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O - 1, FeSO ₄ · 7H ₂ O – 0,01, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 10	200 об/хв, аерація	3,0 ± 0,2	30	68	100,60	Генно-модифікований штам	[19]
3	Целюлаза	<i>Trichoderma reesei</i> QEB4	-	150 об/хв	-	-	48	5,8	Генно-модифікований штам	[20]
4	Ліпаза	<i>Rhizopus arrhizus</i> CNMN FD 03	сойова мука — 35,0; KH ₂ PO ₄ – 5,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ –1,0	200 об/хв	7,2	30	72	15,81	Додавання наночастинок	[22]
5	Ліпаза	<i>Aspergillus niger</i> CNMN FD 01	сойова мука — 35,0; KH ₂ PO ₄ – 5,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ –1,0	200 об/хв	7,2	30	120	30.8 ± 0.7	Додавання наночастинок	[23]

Продовження табл 1.1

6	Амілаза	<i>Aspergillus oryzae</i> SBS50	Крохмаль- 15, екстракт яловичини - 8, FeSO ₄ 0,1 MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,5, KCl - 0,1 Алюмінієвий тальк- 15	200 об/хв	5,0 ± 0,2	30	96	13,145	Використання наночастинок	[24]
7	Естераза	<i>Aureobasidium pullulans</i> URM 7059	гліцерин - 1 (NH ₄) ₂ SO ₄ - 4 г/л та дріжджовий екстракт - 8 г/л	Аерація 8 л/хв 150 об/хв	7,0 ± 0,2	30	48	28.6 ± 1.8	використання залишкового біодизельного гліцерину	[25]
8	Амілаза	<i>Bacillus velezensis</i> KB 2216	шолуха бобів - 40, соевий жмих - 20, фруктоза - 15, NaNO ₃ - 5, KН ₂ РО ₄ -3, MgSO ₄ - 1	125 об/хв.	5,0 ± 0,2	35	72	2,78	Використання с/г відходів	[26]
9	Амілаза	<i>Aspergillus oryzae</i>	сойова шолуха – 45% пшеничні висівки – 55%	–	-	30	144	4,59	Твердофазне культивування, використання с/г відходів	[27]
10	Амілаза	<i>A. Oryzae</i>	арахісовий жмих	–	4,5 ± 0,2	32,5	108	9,86	Твердофазне культивування, використання	[28]

									я с/г відходів	
11	Ліпаза	<i>Yarrowia Lipolytica</i> Y-3153	глюкоза - 5, дріжджовий автолізат – 5, зневоднена сойова мука – 40, твін-20 – 0,001 мг/мл	250 об/хв	7,0 ± 0,2	30	48	210	Оптимізація ПС	[29]
12	Амілаза	<i>Bacillus subtilis</i> B119	рисове борошно – 12,5, 1% пептон - 12, (NH ₄) ₂ SO ₄ -8 , MgSO ₄ · 7H ₂ O - 2, CaCl ₂ · 2H ₂ O – 0,5, K ₂ HPO ₄ - 6	150 об/хв,	6,0	37	24	8,67	Підбір джерела карбону і натрогену	[30]
13	Амілаза	<i>Bacillus methylotrophicus</i> DCS1	Картопляний крохмал -20, глютамінова кислота -5, KH ₂ PO ₄ – 1, MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,5, KCl - 0,5	150 об/хв,	8,0 ± 0,2	25	48	6,94	Підбір ПС	[31]
14	Протеаза	<i>Azotobacter vinelandii</i> AT6	галактоза - 10, казеїн - 5, пептон – 5,5, KH ₂ PO ₄ - 2 , Na ₂ CO ₃ - 10 та MgSO ₄ · 7H ₂ O - 2;	150 об/хв, а	8,0 ± 0,2	37	72	17,5	Параметри біосинтезу	[32]
15	Ліпаза	<i>H. pseudokoningii</i> FJ810506	Твін-80 – 10, глюкоза – 0,4, ацетат натрію – 2,3, дріжджовий екстракт -2	100 об/хв	6,0	35	96	6	Новий штам	[33]

Продовження табл 1.1

16	Ліпаза	<i>Curvularia sp. DHE 5</i>	пшеничні висівки – 50, оливкова олія – 20, KCl – 0,5	150 об/хв	7,0	30	168	88.9 ± 1.2	Новий штам, оптимізація ПС	[34]
17	Ліпаза	<i>Meyerozyma guilliermondii NRRL Y-7400</i>	Молочна сыворотка - 20	250 об/хв	4,0	35	24	28.82	Новий штам	[35]
18	Ліпаза	<i>Bacillus cereus ATA179</i>	сахароза - 10, (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 10, CaCl ₂ – 0,55	50 об/хв	7,0 ± 0,2	45	48	10	Новий штам, оптимізація ПС	[36]
19	Амілаза	<i>T. maculatum</i>	розчинений крохмал - 5, дріжджовий екстракт - 2, KH ₂ PO ₄ - 1, MgSO ₄ x7H ₂ O – 0,5.	–	7,0 ± 0,2	22	168	1,44	Новий продуцент, оптимізація ПС	[37]
20	Амілаза	<i>Bacillus licheniformis SUNGC2</i>	NaCl - 0,1, розчинний крохмаль - 10, MgSO ₄ x7H ₂ O - 1,0, Na ₂ HPO ₄ - 3,0, пептон- 2,0 FeSO ₄ - 0,03.	100 об/хв	7,0 ± 0,2	50	18	24,65	Термофільний продуцент, підбір рН	[38]
21	Целюлаза	<i>Geobacillus sp. HTA426</i>	Пептон- 10, Твін-80 – 10 та (NH ₄) ₂ SO ₄ -1,4, CaCl ₂ x2H ₂ O – 2, MnSO ₄ x2H ₂ O – 1,6, ZnSO ₄ - 1,4, FeSO ₄ -5	-	7,0 ± 0,2	60	72	54.99	Термофільний штам	[39]
22	Пектиназа	<i>Aspergillus pulverulentus, F23</i>	Пектин - 5, KH ₂ PO ₄ 4, Na ₂ HPO ₄ - 6, 2 (NH ₄) ₂ SO ₄ - 2, Дріжджовий екстракт - 1, FeSO ₄ – 0,001, MgSO ₄ – 0,2, CaCl ₂ – 0,001, H ₃ BO ₃ - 0.00001	180 об/хв	5,0 ± 0,2	30	120	2,265	Підбір штаму	[40]

РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва продукту мікробного синтезу

2.1. Потреба у цільовому продукті

Амілази є одними з основних ферментів, що використовуються у промисловості. Такі ферменти гідролізують молекули крохмалю полімери, що складаються з одиниць глюкози. Амілаза є важливим ферментом, що використовується в промисловості, і на його частку припадає приблизно 25% ринку ферментів [41].

Амілази можуть бути отримані з рослин, тварин та мікроорганізмів. Тим не менш, ферменти з грибкових та бактеріальних джерел домінують у застосуванні у промислових секторах.

Амілаза може продукуватися різними видами мікроорганізмів, але для комерційного застосування амілаза в основному походить з роду *Bacillus*. Амілази, отримані з *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* і *Bacillus amyloliquefaciens*, знаходять потенційне застосування в ряді промислових процесів, таких як харчова, ферментаційна, текстильна та паперова промисловість.

Для промислового одержання препаратів бактеріальної амілази, окрім *B. subtilis*, використовують також культури *B. amyloliquefaciens* і *B. licheniformis*. Амілазу *B. amyloliquefaciens* застосовують для гідролізу крохмалю при температурі до 90⁰ С. Однак галузь промисловості, де є переробка крохмалю, зацікавлена в підвищенні температури гідролізу. Це стало можливим після одержання амілази із *B. licheniformis*.

					НУХТ БТЕК 02 01 03 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Кислий В.П.				Літ.	Арк.	Аркуші
Перевір	Ворониов О.О.					26	89
Консульта					Кафедра БТМ		
Н.Контр.					РОЗДІЛ 2. Техніко- економічне обґрунтування виробництва продукту		
Затверд.	Стабников В.П.						

Ця амілаза дозволяє проводити гідроліз крохмалю при температурі до 105–110°C. *B. amyloliquefaciens* у процесі культивування утворює, окрім амілази, нейтральну протеазу, глюканазу, геміцелюлазу. Під час гідролізу крохмалю присутність протеази небажана, оскільки деградація білкових фракцій крохмалю призводить до потемніння сиропу.

З огляду на це для одержання більшості комерційних препаратів амілаз використовують штами, які не продукують протеазу. Винятком є амілази *B. licheniformis*. Їхня висока термостабільність дозволяє позбутися небажаних домішок протеази термічною інактивацією без значних втрат амілазної активності.

Бактеріальні амілази випускають переважно у вигляді рідких препаратів, що містять як консервант 20%-й розчин хлориду натрію, але бувають і тверді препарати [42].

На ринок окрім бактеріальних надходять також амілази грибного походження. Для їх одержання застосовують культури *A. oryzae* і *A. niger*. Так, амілаза *A. oryzae* є основним компонентом ферментного препарату такадіастаза, що є одним з найперших ферментних препаратів цієї групи, який почали виробляти. Оптимальне для дії цієї амілази значення рН лежить в інтервалі 4,8–5,8, а термостабільність її нижча, ніж у амілази *B. amyloliquefaciens*.

Властивості амілази *A. niger* мало чим відрізняються від властивостей амілази *A. oryzae*. Деякі штами *A. niger* продукують амілазу, яка зберігає стабільність у ще кислшому середовищі (при рН < 2) і є більш термостійкою. Однак препарати амілази *A. niger* мають обмежене застосування через низьку амілазну активність і, отже, їхню високу вартість.

Препаратам амілази *Aspergillus* притаманна більша оцукрювальна здатність порівняно з препаратами амілази *Bacillus*: з їхньою допомогою можна досягти вищого виходу цукрів (50%-й вихід мальтози під час гідролізу крохмалю) [43].

Амілаза є ферментом широкого застосування і ефективно використовується в технологічних процесах різних галузей:

➤ Харчова промисловість

У **виробництві спирту** як основний ферментовмісний матеріал раніше застосовували солод, який від початку виникнення спиртової промисловості використовували для оцукрювання крохмалю сировини і який з успіхом було замінено на культури мікроміцетів з активним амілолітичним комплексом ферментів [44]. Застосування у процесі виробництва спирту грибної амілази замість солоду дозволяє: а) зекономити десятки тисяч тонн високоякісного зерна; б) підвищити вихід спирту; в) різко скоротити в часі процес одержання ферментного препарату. Як відомо, для одержання активного зернового солоду потрібно 7–8 діб, для вирощування ж культури гриба й отримання з неї препарату ферменту — кілька десятків годин; г) зменшити кількість виробничих площ, а також усіх видів енергії.

У **пивоварінні** амілази використовують замість зернового солоду. Смакові якості пива при цьому практично не змінюються. Для застосування у пивоварінні найбільш придатними є ферменти грибного походження (*A. oryzae*), що дозволяє заощадити десятки тисяч тонн ячменю. Якщо у виробництві пива зменшити кількість солоду і збільшити кількість ферментного препарату до 4–5%, то можна взагалі обійтися без солоду і з несолодженої сировини одержати сусло, яке майже не відрізнятиметься від сусла, виготовленого із солоду. Якщо затір у процесі такого способу виробництва піддати гідротермічній обробці певного режиму, то він набуває смаку й аромату солоду.

Амілолітичні ферменти також використовують у **крохмалепатоковій промисловості** для виготовлення глюкозної і мальтозної патоки [45]. У цьому разі застосування амілаз різноманітне. Насамперед, за їхньою участю може бути отримана розчинна форма крохмалю. За допомогою бактеріальних і рослинних амілаз вдається одержати мальтозну і глюкозну патоки, зокрема з кукурудзяного і маїсового борошна, а також чисту глюкозу. Різні види паток використовують

головним чином у кондитерському виробництві, де вони перешкоджають кристалізації сахарози і лактози, поліпшують консистенцію виробів і збільшують терміни їх зберігання, а також у виробництві морозива, консервованих фруктів і варення, безалкогольних напоїв, столових сиропів тощо.

У крохмале-патоковій промисловості ферментативний гідроліз має переваги перед кислотним завдяки ряду переваг, таких як специфічність реакції, стабільність продуктів, нижчі енергетичні потреби [46].

У **хлібопекарській промисловості** амілолітичні ферментні препарати застосовують як біологічні поліпшувачі якості хліба: значно покращуються смак, аромат, забарвлення кірки, збільшується питомий об'єм, пористість, вміст цукру. Крім того, вони інтенсифікують біохімічні й мікробіологічні процеси, прискорюючи процес тістоведення. Амілазу *A. oryzae* додають у разі недостатнього вмісту амілаз у борошні. Амілаза гідролізує крохмаль тіста, а утворювана при цьому мальтоза слугує субстратом для пекарських дріжджів у процесі заквашування. Низька термостійкість амілази *A. oryzae* має позитивне значення, дозволяє уникнути деградації м'якуша у процесі випікання [47].

У виробництві різних виробів із **круп'яних продуктів** амілази застосовують для попереднього оброблення сировини, з якої виробляють харчовий продукт у вигляді пластівців чи зерен або круп'яних концентратів. Готові продукти після гідролізу набувають поліпшених смакових якостей, збагачуються розчинними цукрами, компоненти їх краще перетравлюються і засвоюються [48].

У **виробництві овочепродуктів**, зокрема пюре, супів, різних форм сушених овочів, крохмаль так само модифікують. Процес має ряд технологічних переваг: для супів і пюре — необхідне розрідження за збереження сухої речовини у продуктах; для сушених овочів — деяке прискорення процесу висушування. В усіх випадках повніше використовується сировина [49].

Відходи кондитерської промисловості часто містять значні кількості крохмалю, особливо це стосується відходів виробництва цукерок. За допомогою бактеріальних і грибних амілаз можна виділити з них цукри і використовувати їх.

Дитяча їжа. На сьогодні в деяких країнах налагоджено випуск нових харчових продуктів, які попередньо оброблені ферментами. Так, під час виготовлення дитячої їжі крохмаль чи білки частково гідролізують амілолітичними чи протеолітичними ферментами. Це значно полегшує перетравлення і засвоєння зазначених цінних речовин в організмі дитини і, крім того, поліпшує смакову якість їжі, що в даному разі також є дуже важливим [50].

Вироби із фруктів. У виробництві різної продукції з фруктів — соків, екстрактів, деяких сортів варення, фруктових пюре — застосовують грибні амілази для повного розщеплення в них крохмалю. Залишки крохмалю можуть призводити до поступового загусання продуктів, деякого помутніння соків, екстрактів, погіршення їхнього товарного вигляду [51].

Сучасна технологія виробництва глюкози, мальтози та інших вуглеводів, які використовують у харчовій біотехнології, базується на гідролізі крохмалевмісної сировини високоактивними ферментами амілази і глюкоамілази [52].

➤ Хімічна промисловість

Амілази, разом із протеазами й ліпазами, широко використовують у **виробництві мийних засобів**. Амілази полегшують видалення плям, які містять крохмальні речовини, наприклад, від макаронних виробів, картоплі, шоколаду, дитячої їжі. Крохмаль, що висихає, важко видаляється при середніх і низьких температурах прання, особливо в разі застосування мийних засобів середньої лужності. Крохмаль прилипає до поверхні тканини, відіграючи роль клею для інших компонентів забруднень. Амілаза гідролізує крохмаль у декстрини і цукри, які легко розчиняються у мийному розчині [53].

Амілази використовують і в **промисловості очищення**. За їх участю готують розчинний крохмаль, який застосовують для підкрохмалювання білизни. І навпаки, очищуючи білизну й одяг, можна легко розщепити крохмальний шар і швидко видалити його разом із плямами. Під час ремонтних робіт за допомогою амілаз знімають зі стін шпалери, що були приклеєні крохмальним клейстером [54].

➤ **Фармацевтична промисловість**

На сьогодні за кордоном описано близько 200 поліферментних лікарських засобів, що їх застосовують для поліпшення травлення, зокрема при диспепсії, гастриті, діареї [55]. Разом із ліпазами і/або протеазами, амілази можуть бути використані для лікування травних розладів, при панкреатитах, циститних фіброзах, діабеті типу I і/або типу II.

Так, у Латвії в 90-х роках минулого століття випускали препарат сомілаза, який містив ліполітичний і амілолітичний ферменти і використовувався для поліпшення травлення [56].

Ефективну лікувальну й лікувальнопрофілактичну дію справляють засоби, до складу яких входить амілаза і якими послуговуються у стоматології [57].

Два амілолітичні препарати: амілосубтилін Г3х-1 та амілосубтилін Г10х-1 застосовують у косметиці. Ці препарати одержують у вигляді порошків різного ступеня чистоти й активності під час глибинного культивування *B. subtilis*. Препарат типу Г3х-1 виробляють розпилювальним висушуванням упареного фільтрату культуральної рідини, а препарат Г10х-1 — осадженням упареного фільтрату культуральної рідини органічним розчинником (етиловий спирт). Препарати відрізняються за активністю: у амілосубтиліну Г3х-1 стандартна активність 600 Од/г за колориметричним методом, а в амілосубтиліну Г10х-1 — 3 000 Од/г. Оптимальні умови дії обох препаратів — рН 6 і температура 50–55⁰С [58]. Зниженням у 1,5–2 рази в'язкості культуральної рідини під впливом глікозидази Г3х було поліпшено технологію виробництва ферментних препаратів амілази *B. subtilis*. У процесі

одержання амілосубтиліну Г3х ферментативне розрідження дозволило висушити культуральну рідину з підвищеним ступенем концентрування в 1,5–2,5 рази і збільшити продуктивність розпилювальної сушарки на 13%, а у виробництві амілосубтиліну Г10х — збільшити швидкість фільтрації культуральної рідини в декілька разів і скоротити втрати амілолітичної активності на 10%. Оброблення культуральної рідини глікозидазою не призводить до втрати амілолітичної активності, що дозволило інтенсифікувати технологічні процеси виділення амілази [59].

➤ Легка промисловість

Амілази можна широко використовувати і в легкій промисловості [60]. Так, у **текстильному виробництві** їх застосовують для розшліхтування рослинного волокна перед відбілюванням і фарбуванням. Вихідний продукт — сувора тканина — містить 5% крохмалю і чимало інших домішок, які треба видалити, зробивши тим самим тканину м'якою, здатною змочуватися, краще відбілюватись і зафарбовуватись. Найпридатнішими для цієї мети виявилися бактеріальні амілази. Для фарбування текстильних виробів, навпаки, необхідним є крохмаль. Його вводять у друкувальну фарбу у вигляді загущувача, для того щоб надати фарбі клейкості, пластичності й чіткості. Крохмаль, що його використовують у цьому разі, має бути розчинним. Для цього його деякою мірою гідролізують за допомогою амілолітичних ферментів (краще бактеріального походження, утім можна й рослинного).

У **паперовій промисловості** за допомогою амілаз одержують спеціальний крохмаль, який додають під час проклеювання паперу. Ця операція додає паперу пружності, щільності, глянцю, збільшує його міцність [61].

Спектр використання ферменту амілази досить широкий, проте він може варіюватися відповідно до фізичних властивостей конкретного ферменту. Так за результатами досліджень амілаза виділена з обраного для роботи штаму *Bacillus methylotrophicus* DCS1 проявляє досить високу термостабільність [62]. Це дає змогу

використовувати його в галузях що потребують стійкості до високих температур таких як виробництво миючих засобів, хлібопечення та ін..

Додаткової складності в обрахунок додає те що навіть один окремий препарат амілолітичної дії може використовуватися в декількох галузях. Так, наприклад, препарат амілосубтилін Г10Х використовують при виробництві пива та хліба, а також в технологіях отримання різних патоки і глюкози та інших харчових виробництвах.

Тому для спрощення обрахунку потреби в препараті спробуємо для початку задовольнити потребу в препараті для одного окремого виробництва, з подальшою можливістю розширення виробництва. Одними з найбільших споживачів ферментів є хлібне і пивне виробництва. Оскільки потужності хлібзаводів є надто великими для того щоб їх потребу міг би задовольнити невеликий ферментний завод. Тому для розрахунку візьмемо пивоварне виробництво в київській області. Одними з найбільших таких виробників є ПрАТ «ОБОЛОНЬ».

Відповідно до даних про необхідне дозування візьмемо для обрахунку кількість солоду яке використовують при виготовленні пива.

Постачальниками ячменю для ПрАТ «ОБОЛОНЬ» є всі області України за винятком південно-східних областей. Орієнтація на підприємства Київської, Вінницької, Хмельницької, Сумської, Черкаської областей. На рік пивзавод заготовляє - 1434 т. ячменю. Завод переважно використовує ячмінь сорту «Скарлетт», який надходить з Київської області [63].

Розрахуємо річну потребу в препараті для пивзаводу. Аналогічний препарат додається з розрахунку на кількість несоложеного ячменю в солоді, середній показник становить 150 г препарату на 1 т ячменю (0,15кг/1т) [64].

$$0,15 \text{ кг} \times 1434\text{т} = 215 \text{ кг препарату}$$

Вихідні дані для розрахунку потреби наведено в *табл 2.1*

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в амілазі

Виробництво	Сировина в якій застосовують препарат	Кількість продукції, т	Кількість препарату на 1 т	Загальна кількість препарату необхідна для обробки сировини
ПрАТ «ОБОЛОНЬ»	ячмінь	1434	0,15кг/1т	215 кг

2.2. Обґрунтування вибору біологічного агенту для інженерної частини роботи

Попит на гідролази постійно зростає адже шляхи їх використання в промисловості постійно розширюються, а галузі в яких вони використовуються постійно розвиваються.

Одним із найпоширеніших представників гідролаз є амілаза. Вона виробляється декількома бактеріями, грибами та генетично модифікованими видами мікробів. Амілази знаходять широке застосування в різних галузях промисловості, таких як харчова, хлібопекарська, паперова, текстильна, підсолоджувачі, сиропи глюкози та фруктози, фруктові соки, миючі засоби, паливний етанол з крохмалю, алкогольні напої, засоби для травлення та засоби для виведення плям. у хімічності. Бактеріальні α -амілази також використовуються в клінічній, медичній та аналітичній хімії. Сьогодні амілаза практично замінила хімічний гідроліз крохмалю у промисловості з його переробки.

Тому для подальшого розрахунку оберемо цей фермент, як найбільш актуальну біологічну речовину серед досліджених [65].

Порівняння найбільш перспективних продуцентів амілази, наведено в таблиці 2.2 У додатках наведено скріншоти з використаних статей.

Особливості одержання амілази

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту, ОД/мл	Особливості технологічного процесу	Використана література
1	2	3	4	5	6
<i>Aspergillus oryzae</i> SBS50	Крохмаль- 15, екстракт яловичини - 8, FeSO ₄ 0,1 MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,5 KCl - 0,1 Алюмінієвий тальк- 15	96	13,145	Процес проводили періодичним способом в аеробних умовах з додаванням наночастинок (1 об/(об*хв)). Температура: 30 °С; pH 5 ± 0,2	Bijender Singh Engineering fungal morphology for enhanced production of hydrolytic enzymes by <i>Aspergillus oryzae</i> SBS50 using microparticles. 3 Biotech. 2018 Jun; 8(6): 283.. doi: 10.1007/s 13205-018-1308-x
<i>Bacillus velezensis</i> KB 2216	шолуха бобів - 40, сойовий жмх - 20, фруктоза - 15, NaNO ₃ – 5 KH ₂ PO ₄ -3, MgSO ₄ - 1	72	2,78	Глибинний періодичний спосіб культивування з додаванням відходів с/г виробництв в якості субстрату	Bhatt K., Lal S., Srinivasan R. Molecular analysis of <i>Bacillus velezensis</i> KB 2216, purification and biochemical characterization of alpha-amylase. Int J Biol Macromol. 2020 DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.205
<i>Bacillus methylotrophicus</i> DCS1	Картопляний крохмал -20, глутамінова кислота -5 KH ₂ PO ₄ -1, MgSO ₄ – 0,5 KCl – 0,5	48	6,94	Культивування проводиться періодичним способом. Для цього використовують новий перспективний продуцент.	Noomen H., Nawel J.. Simultaneous production of alkaline amylase and biosurfactant by <i>Bacillus methylotrophicus</i> DCS1: application as detergent additive. Biodegradation. 2019 Aug;30(4):247-258.

Аналіз літературних джерел показав, що найвищий показник синтезу амілази досягається при вирощуванні штаму *Aspergillus oryzae* SBS50 (13,145 Од/мл), який є більшим порівняно з штамами *Bacillus velezensis* KB 2216 та *Bacillus methylotrophicus* DCS1 – лише 2,78 Од/мл та 6,94 Од/мл амілази відповідно.

Тривалість культивування також є важливим показником при виборі біологічного агента. Штам *Bacillus methylotrophicus* DCS1 культивують протягом 48 год, *Bacillus velezensis* KB 2216 – 72 год, а найбільше часу для культивування необхідно *Aspergillus oryzae* SBS50 – 96 год.

Проте така характеристика технологічного процесу є недостатньою для вибору певного біологічного агента. Тому на наступному етапі вибору порівнюємо вартість поживних середовищ для культивування продуцентів (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Вартість поживних середовищ для продуцентів амілази

Біологічний агент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації*
1	2	3	4	5
<i>Aspergillus oryzae</i> SBS50	крохмаль- 15	25	0,375	1
	екстракт яловичини - 8	2400	19,2	2
	FeSO ₄ · 0,1	38	0,0038	3
	MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,5	11	0,0055	4
	KCl - 0,1	87	0,0087	5
	алюмінієвий тальк- 15	200	3	6
Вартість 1 л середовища – 22,6 грн				
<i>Bacillus velezensis</i> KB 2216	шолуха бобів - 40	1	0,04	7
	сойовий жмих - 20,	16	0,32	8
	фруктоза - 15,	36	0,54	9
	NaNO ₃ – 5	70	0,35	10

Закінчення табл. 2.3

1	2	3	4	5
<i>Bacillus velezensis</i> KB 2216	MgSO ₄ - 1	11	0,011	<u>4</u>
	KH ₂ PO ₄ -3	120	0,36	11
Вартість 1 л середовища – 1,6 грн				
<i>Bacillus methylotrophicus</i> DCS1	Картопляний крохмал -20	25	0,5	<u>1</u>
	глутамінова кислота -5	147	0,735	<u>12</u>
	KH ₂ PO ₄ - 1	120	0,12	11
	MgSO ₄ - 0,5	11	0,0055	4
	KCl - 0,5	87	0,043	5
	Вартість 1 л середовища – 1,4 грн			

Примітка: * – ціни наведено станом на грудень 2021 р.:

- <https://prom.ua/ua/p1235280019-krahmal-kartofelnyj-vysshij.html>
- <https://russian.alibaba.com/product-detail/hot-sale-good-quality-10g-seasoning-dried-beef-extract-essence-soup-powder-1600316473813.html?spm=a2700.8699010.29.1.36d12215uB8E7K>
- <https://ukrchemgroup.com/p1092570608-sulfat-zheleza-zheleznyj.html>
- https://selitra.biz/p194784485-magnij-sermokislyj.html?gclid=Cj0KCQiA_JWOBhDRARIsANymNOYyMpbEQIN9RIG2VUsDrwJmRxt3rYW_OrM09rD1-l-Dml6EX_z6pBcaAvVbEALw_wcB
- https://rozetka.com.ua/279325988/p279325988/?gclid=Cj0KCQiA_JWOBhDRARIsANymNOYjp2WKahjuy3Pk0WXnqiFA3FbFuNpmKilJqnXu2_NOz8UERHc3VW8aAhiLEALw_wcB
- https://stancolac-ua.com.ua/p1302384291-alyuminievaya-pudrapap.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQiA_JWOBhDRARIsANymNOaxb1KtZNKg_zBBN234-4DBOajVKCvVqsVPbc-P1UhNWPWskRZIS0saAvKdEALw_wcB
- https://agrovektor.com/physical_product/983198-otubi-sheluhu-othody-goroaha-i-yachmenya.html
- https://prom.ua/p1445575204-soevyj-shrot-zhmyh.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=cpa_1_10_produkty_pitaniya&gclid=Cj0KCQiA_JWOBhDRARIsANymNObgupu77eJb05C5GC7hFafRQd3i-k7Fy2BEHsqYQooaPRe8dSjkmZMaAohcEALw_wcB
- https://selitra.biz/p1086040780-fruktoza-kristallicheskaya-pishevaya.html?gclid=Cj0KCQiA_JWOBhDRARIsANymNOZigfoDFfGdwktZcZcZL36rg1nanfl5xCB06crb_QV74dYCmaLUt2gaAqaKEALw_wcB
- https://selitra.biz/p616274119-natrievaya-selitra-natrij.html?gclid=Cj0KCQiA_JWOBhDRARIsANymNOYhzW0Dn2KP7yWcmH1jlnBFR0vDI7nSMnh5XJcrbCtiBoFzqBoB_M_IaAqWLEALw_wcB
- <https://prom.ua/ua/p151620028-kalij-fosfomokislyj-zameschennyj.html>

Як видно з табл. 2, вартість поживного середовища для культивування *Bacillus methylotrophicus* DCS1 та *Bacillus velezensis* KB 2216 є значно меншими, що зумовлено відсутністю в них дороговартісних компонентів.

Ґрунтуючись на даних таблиць 1 і 3, склали узагальнюючу таблицю (табл. 2.3), де представлено умовну вартість 1 г цільового продукту та продуктивність біологічних агентів:

Таблиця 2.4

Умовна вартість 1 г цільового продукту

Біологічний агент	Концентрація цільового продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного продукту за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>Aspergillus oryzae</i> SBS50	4, 5	96	0,04	22,6	5,02
<i>Bacillus velezensis</i> KB 2216	0,6	72	0,008	1,6	2,6
<i>Bacillus methylotrophicus</i> DCS1	1,2	48	0,025	1,4	1,16

У *Bacillus methylotrophicus* DCS1 кількість утвореної амілази становить 0,025 г/год, що є майже в чотири рази більше за утворення амілази штамом *Bacillus velezensis* KB 2216 – 0,008 г/год та трохи менше за *Aspergillus oryzae* SBS50- 0,047 г/год.

Узагальнивши дані можна зробити висновок, що доцільнішим буде використання *Bacillus methylotrophicus* DCS1 , оскільки вартість цільового продукту

становить 1,16 грн/г, вартість продукту синтезованого штамом *Bacillus velezensis* KB 2216– 2,6 грн/г, а найдорожчим є цільовий продукт отриманий штамом *Aspergillus oryzae* SBS50, що складає 5,02 грн/г.

Отже, враховуючи відносно недороге поживне середовище, короткий термін культивування та високий рівень синтезу цільового продукту вибираємо штам *Bacillus methylotrophicus* DCS1, який є найпродуктивнішим з проаналізованих біологічних агентів для отримання полісахариду ксантану.

2.3. Розрахунок річної потужності виробництва

Ринок України досить насичений різними ферментними препаратами. Є широкий список імпортованих засобів які завозяться в Україну з усього світу, окрім цього на ринку присутні також і вітчизняні виробництва. Одним з найбільших таких вітчизняних виробництв є завод «Ензим». Основне виробниче призначення заводу (на початковому етапі) - це виробництво ферментів для добавок (біодобавки) в пральні порошки при виробництві СМС (синтетичні миючі засоби). Виробничі потужності по даному виду продукції становили до 3800 товарних тонн на рік препарату лужної протеази. Окрім цього завод займається виготовлення антибіотиків, вітамінів, амінокислот, білково вітамінних препаратів та ін..

Амілази є важливою складовою ринку ферментних препаратів проте його використання не завжди є обов'язковим в технології. Досить часто його застосовують для пришвидшення виробничого процесу чи поліпшення якості вихідного продукту. Також є деякі аналоги, що дозволяють його замінити.

Потрібно також врахувати обсяг вже відомих препаратів на ринку, велику кількість імпортованих препаратів та вітчизняні аналоги. І не забувати те що препарат не є унікальним для ринку проте є новим (ще не набув довіри з боку споживачів, не є відомим...), тому на перших етапах виробництва, розрахунок будемо проводити,

орієнтуючись на таку кількість препарату, щоб задовольнити всю потребу для виробництва пива на заводі ПрАТ «ОБОЛОНЬ».

Отже, потужність виробництва складе: 215 кг

Концентрація амілази в культуральній рідині становить 1,2 г/л. Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 215 кг ферменту становить:

$$0,0012 \text{ кг} - 1 \text{ л};$$

$$215 \text{ кг} - x;$$

$$x = 179\,166 \approx 179,2 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту під час виділення і очищення (25%), необхідно отримати наступну кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 179,2 / (1 - 0,25) = 238,9 \text{ м}^3$$

Для забезпечення потреби в препараті (з врахуванням втрат при виділенні) 238,9 м³ культуральної рідини ($V_{\text{ГП}}$).

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 240, тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{д}}$) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{ГП}} / \text{Трд} = 238,9 / 240 = 0,99 \text{ м}^3 .$$

Кількість продукту за цикл ($V_{\text{кр}}$) буде становити:

$$V_{\text{кр}} = (K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot \text{Тцф}) / 24 = (1,1 \cdot 0,99 \cdot 58) / 24 = 2,6 \text{ м}^3 / \text{цикл},$$

де Тцф – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

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

2.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту мікробного синтезу

Вибір товарної форми. Ферментні препарати можуть випускатися в різних товарних формах, зазвичай це або рідини, або порошки білого, сірого або жовтуватого кольору з певною стандартною активністю ферментів.

Їх класифікують на наступні види:

- Пх і Гх - неочищена культуральна рідина;
- П2х та Г2х – рідкий концентрат неочищених розчинних речовин вихідної культури, відділений від нерозчинної частини (П2х – концентрат із вмістом сухих речовин 50 %, Г2х – не більше 40 %);
- П3х і Г3х це сухі ферментні препарати, які були отримані за допомогою висушування в розпилювальній сушарці з неочищеного розчину ферменту (фільтрату глибинної культури або екстракту поверхневої культури).

Препарати з маркуванням 2х та 3х є технічними.

- П10х і Г10х сухі це вже очищені препарати, отримані з водних розчинів в яких ферменти осаджували органічними розчинниками або методом висолювання;
- П15х, Г15х це очищені ферментні препарати, які були отримані за допомогою різних методів очищення та фракціонування ферментів;
- П20х, Г20х високоочищені, але ще не кристалічні ферментні препарати, що містять до 20-25% баластових речовин, отримані методом концентрування та очищення на ультрафільтраційних установках з подальшим розпилювальним сушінням [66].

Для препаратів у яких індекс очищення більше 20х номенклатура не використовуються, так як у цих випадках йдеться про високоочищені і навіть гомогенні ферментні препарати, які іменуються в класифікації ферментів.

Літери «П» і «Г» в номенклатурі позначають спосіб культивування «П» – поверхневий, відповідно продуцентами в препаратах з цим індексом здебільшого є гриби. Літера «Г» – позначає собою глибинний спосіб культивування.

Препарати ГХ використовуються переважно на місці вироблення. Так, в спиртовому виробництві застосовують культуральну рідину продуцентів амілолітичних і целюлітичних ферментів, що отримуються у ферментних цехах спиртзаводів. Препарати з індексом ГЗХ є неочищеними. Вони мають високий ступінь мікробного обсіменіння. Це обмежує сферу їх застосування.. У сільському господарстві препарати ГЗХ широко застосовуються для обробки кормів з метою підвищення їх засвоюваності. Препарати Г10Х мають значно більш високу чистоту, ніж ГХ, ГЗХ. Сфера застосування препаратів Г10Х охоплює різні харчові виробництва, галузі легкої і хімічної промисловості. Препарати Г20Х застосовують у виробництві харчових продуктів і напоїв, в кормовиробництві, у складі лікарських засобів для лікування захворювань, пов'язаних з ферментною недостатністю.

Зауваживши, що згідно ТЕО препарат буде застосовуватися в виробництві пива можна визначити, що форми ГХ і ГЗХ не підходять для застосування в подібному виробництві. Відповідно вибір буде стояти між Г10Х і Г20Х, обидві форми можуть застосовуватися в харчових виробництвах, а Г20Х і в ліках. З економічних міркувань для необхідних цілей потрібно обрати Г10Х, оскільки він може застосовуватися в подібному виробництві в той час як для очищення ферменту до Г20Х потрібно буде затратити більше часу і грошей [67].

Вибір упаковки. Відповідно до техніко-економічного обґрунтування препарат не буде продаватися в роздрібній торгівлі. Згідно розрахунку він буде виготовлятися безпосередньо для задоволення потреб одного конкретного виробництва. Це знімає потребу в малих упаковках, тому для нас краще підійдуть великі мішки. Щоб уникнути контакту з водою, через який може відбутися передчасне псування препарату. Тому матеріал упаковки повинен бути вологостійким. Найкращим вибором для цього буде будуть поліетиленові мішки. Габаритні розміри можуть варіюватися на 5 кг і 10 кг мішки [68]

РОЗДІЛ 3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

ТП 1. Відділення біомаси

ТП 1.1 Центрифугування культуральної рідини

ТП 2. Ультрафільтрація

ТП 2.1 Відділення високомолекулярних речовин

ТП 2.2 Відділення низькомолекулярних речовин

ТП 3. Упарювання

ТП 3.1. Упарювання на вакуум випарній установці

ТП 4. Ліофілізація

ТП 4.1. Ліофілізація амілази

ТП 5. Подрібнення

ТП 5.1. Подрібнення амілази

ТП 6. Просіювання

ТП 6.1. Просіювання амілази

Вихідні дані:

- a. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 2,6 \text{ м}^3$;
- a. концентрація цільового продукту у КР $C_{ант} = 1,2 \text{ г/л} (=1,2 \text{ кг/м}^3)$
- b. концентрація біомаси у КР $C_{БМ} = 3,8 \text{ г/л} (=3,8 \text{ кг/м}^3)$ – АСБ,
- c. втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 20%

початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає

$2,6\text{м}^3 \times 1,2\text{кг/м}^3 = 29 \text{ кг}$; кінцева кількість (з урахуванням 20% втрат) має становити 24,6 кг;

					НУХТ БТЕК 02 01 02 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Кислий В.П.</i>				РОЗДІЛ технологічного обладнання з врахуванням матеріальних	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрюків</i>
<i>Перевір</i>	<i>Воронцов О.О.</i>					43	89	
<i>Консультац</i>					Кафедра БТМ			
<i>Н.Контр.</i>					45			
<i>Затверд.</i>	<i>Стабников В.П.</i>							

1. втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 20%

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 20 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 1. Відділення біомаси						
1	ТП 1.1 Центрифугування культуральної рідини	Супернатант	2,6 м ³	4% (104)	2 481 л	Центрифугування при 6 000 об/хв впродовж 1 -1,5 год
		Біомаса	9,12 кг (3,8кг/м ³ х2,4м ³)	-	14,6 кг (3,8кг/м ³ х2,4м ³ +60% вологи)	Збірник для фільтрату 0,4 м ³
ТП 2. Ультрафільтрація						
2	ТП 2.1 Відділення високомолекулярних речовин	Супернатант	2,48м ³	2% (49 л)	–	Ультрафільтрація за допомогою ацетил целюлозних мембран з розміром пір 220 нм
		Перміат	–		2026 л	
		Ретентант	–		405 л	
3	ТП 2.2	Перміат 1	2026 л	2%	–	Ультрафільтрація за

	Відділення низькомолекулярних речовин			(40 л)		допомогою мембрани з розміром пір 50- 100 нм, а також мембрани вінілового ряду
		Перміат 2	–	-	1655 л	
		Ретентант 2	–	–	330	
ТП 3. Упарювання						
4	ТП 3.1. Упарювання на вакуум випарній установці	Перміат 2	1655 л	5% (82)	–	Вакуум-випарний апарат з продуктивністю по випареній волозі 500 л/год
		Концентрована амілаза	–		412 л	
ТП 4. Ліофілізація						
5	ТП 4.1. Ліофілізація амілази	Концентрована амілаза	412 л	5% (20 л)	-	Ліофільна сушарка
		Сухий препарат (вміст вологи 10%)	–		-	
ТП 5. Подрібнення						
6	ТП 5.1. Подрібнення амілази	Сухий препарат	25 кг	1% (0,25)	24,65 кг	Валикова дробарка
ТП 6. Просіювання						
7	ТП 6.1. Просіювання	Сухий препарат	24,65 кг	1% (0,05)	24,6 кг	Вібраційне сито

РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 3.1.

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу біомаси дріжджів

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)	Джерело
1	2	3	4	5
Н-1 Н-3 Н-5 Н-7 Н-9	Відцентровий насос	5	Насос відцентровий з магнітною муфтою DM 10 (Італія), продуктивність 2 м ³ /год.	[1]
Ц-2	Центрифуга для відділення біомаси	1	Центрифуга ОГШ-202К-03 Максимальна частота обертання - 6 000 об/хв. Габаритні розміри (з віброізоляцією) (Д*Ш*В): 1490*860*490 мм. Виробник - Сумське НПО (Україна)	[2]
ЗБ-4 ЗБ-8	Збірник фільтрату	2	Збірник об'ємом 4 м ³ , габаритні розміри (мм): d=1750, h=3070	[3]
УФ-6	Ультрафільтраційна установка	1	Установки ультрафільтрації NECOZ 0032-0020P BT продуктивністю 2м ³ /год з вставними целюлозними мембранами з розміром пір 220 нм Коефіцієнт концентрування 1,2 Перепад тисків 0,2 - 2,0 атм	[4]

НУХТ БТБК 02 01 03 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ док.	Підпис	Дата
Розроб.	Кислий В.П.			
Перевір	Ворошиов О.О.			
Консульта				
Н Коитр.				
Затверд.	Стабников В.П.			
РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання				
			Літ.	Арк.
				47
			Акрушів	
			89	
Кафедра БТМ				

УФ-7	Ультрафільтраційна установка	1	Установки ультрафільтрації NECOZ 0032-0020P ВТ продуктивністю 2м3/год з мембрани з розміром пір 50-100 нм, а також мембрани вінлового ряду Коефіцієнт концентрування 1,2 Перепад тисків 0,2 - 2,0 атм	[4]
Н-11 Н-13 Н-15	Відцентровий насос	3	Насос відцентровий з магнітною муфтою DM 10 (Італія), продуктивність 1 м ³ /год	[5]
Зб-12 Зб-16	Збірник фільтрату	2	Збірник об'ємом 1 м3, габаритні розміри (мм): d= 1100, h= 2080.	[6]
ВВУ-14	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарної апарат МЗС-320 продуктивність за випареною вологою 500 л/год, габаритні розміри (мм): 1310*1310*1380	[7]
Л-17	Ліофілізатор	1	Ліофілізатор фармацевтичний GLZY-B (СІР), ємність піддонів для рідини 400 л, кількість полиць до 11, температура полиць -55-80°С, габаритні розміри: 6810×2050×4100 мм	[8]
ВД-18	Валкова дробарка	1	ДРОБАРКА ВАЛКОВА ВІБРОТЕХНІК ДВГ 200Х125 - 6411-00037 (Україна). Габаритні розміри, мм (ДхШхВ) 680х400х950. Матеріал валків- інструментальна сталь 65Г, ХВГ, 9ХС. Розмір часточок – до 100 мкм. Продуктивність: макс. 700 кг/год	[9]
ВС-19	Вібраційне сито	1	Вібраційне сито SWECO Модель МХ40_66 (2 фракції) Діаметр сита – 1020 мм Розмір часточок – до 100 мкм. Матеріал - вуглецева та нержавіюча сталь 304 та 316	[10]
ФМ-20	Фасувальна машина	1	Автоматична фасувально-пакувальна машина Матеріал мішків Паперові та поліетиленові мішки Доза, від 1 до 20 кг Продуктивність, мішк./хв 5-6 Точність зважування, %о ±5	[11]

			Параметри електромережі 380V±10% 50Hz 5.5KW Вага машини, кг 2000 Габаритні розміри, мм 6000x2000x4900 Параметри повітряної мережі 0.6МПа, 0.5 м3/хв	
--	--	--	---	--

Література

1. https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/nasosy_s_magnitnoj_muftoj/dm10/
2. <http://snpo.ua/uk/produktsiya/tsentrifugi/tsentrifugi-osadzuvalni-filtruyuchi-i-kombinovani-z-shnekovoyi-vivantazhennyam-osadu/>
3. <https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/583.html>
4. <https://ecoz.ru/ultrafiltracii-necoz-0032-0020r-bt/>
5. https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/nasosy_s_magnitnoj_muftoj/dm10/
6. <https://tdredoctober.com/catalog/sborniki-nerzhaveyushchiy/583.html>
7. <https://prom.ua/ua/p1125249041-vakuum-vyparnoj-apparat.html?&primelead=M143NQ>
8. <https://etwinternational.ru/1-1-freeze-dryer-for-apis-41522.html>
9. https://chemtest.com.ua/ua/drobilka_valkovaya_vibrotekhnika_dvg_200_125_ua
10. <https://vibro-separator.ru/kruglij-separator/>
11. https://omela.ua/ua/avtomaty-i-linii-vesovoie-avtomat-dlya-upakovki-pilyashix-i-trudnosipuchix-produktov-v-gotovie-otkritie-meshki-032_50_01

РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми

Технологічний процес виділення та очищення амілази (*Bacillus methylotrophicus*) для одержання ферментного препарату складається із технологічного процесу, стадії фасування та пакування та знешкодження відходів.

До основного технологічного процесу (ТП) відносять стадії відділення біомаси, ультрафільтрації, випаровування та ліофілізації.

Знешкодження відходів (ЗВ) – знешкодження твердих та газоподібних відходів.

ТП 1. Відділення біомаси

ТП 1.1 Центрифугування культуральної рідини

Для відділення біомаси 2,6 м³ культуральної рідини зі збірника культуральної рідини насосом (Н-1) подають до до центрифуги (Ц-2) з автоматичним вивантаженням осаду вагою 14,6 кг і відведенням 2 481 л супернатанту в у збірник (ЗБ-4) за допомогою відцентрового насосу (Н-3). Центрифугування проводиться за параметрів: 6 000 об/хв (впродовж 1,5-2 год.).

ТП 2. Ультрафільтрація

ТП 2.1 Відділення високомолекулярних речовин

Після відділення біомаси супернатант об'ємом 2481л із збірника (ЗБ-4) за допомогою насосу (Н-5) поступає в ультрафільтраційної установки (УФ-6). Ультрафільтрація проходить за допомогою ацетил целюлозних мембран з розміром пір 220 нм. Під час ультрафільтрації рідину концентрують в 1,2 рази до 2026 л. Отриманий перміат відводиться до збірника (ЗБ-8) за допомогою насосу (Н-7), а ретентант відправляють до стадії ЗВ. Процес триває впродовж 2,5 годин.

		2,5 годин.			НУХТ БТЕК 02 01 03 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ дкум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми		
Розроб.	Кислий В.П.						
Перевір	Воронцов О.О.						
Консульта							
Н.Контр.							
Затверд.	Стабников В.П.				Літ.	Арк.	Акрюшів
					50	89	Кафедра БТМ
					52		

ТП 2.2 Відділення низькомолекулярних речовин

Після відділення високомолекулярних речовин перміат 1 об'ємом 2026 л із збірника (Зб-8) насосом (Н-9) переноситься до другої ультрафільтраційної установки (Уф-10). Тут ультрафільтрація відбувається мембранами з розміром пір 100 нм, а також мембрани вінілового ряду, для концентрування розчину амілази, та одночасного видалення низькомолекулярних білків. На цій стадії речовини також концентрують в 1,2 рази до 1655 л. Ретентант об'ємом 330 л відводять до стадії знешкодження відходів, а перміат насосом (Н-11) переміщують до збірника (Зб-12). Процес триває 2 години.

ТП 3. Упарювання

ТП 3.1. Упарювання на вакуум випарній установці

Перміат після відділення зі збірника (Зб-12) за допомогою насосу (Н-13) подають до вакуум-випарної установки (ВВУ-14), де за допомогою насиченої пари розчин амілази позбавляється зайвої вологи. Фільтрат упарюється при температурі 60°C до $\frac{1}{4}$ первісного обсягу, тобто до 412 л, впродовж 3 годин. Далі упарений розчин з концентрацією амілази 5,1 г/л за допомогою відцентрового насосу (Н-15) подається в збірник (Зб-16).

ТП 4. Ліофілізація

ТП 4.1. Ліофілізація амілази

Упарену амілазу зі збірника (Зб-16) розливають у 4 піддони об'ємом 100 л кожний і переносять до ліофільної сушарки (Л-17). При ліофілізації речовину спочатку заморожують до -50°C, а потім сушать при +55°C. Ліофілізація триває 2 доби.

ТП 5. Подрібнення

ТП 5.1. Подрібнення амілази

Після сушіння в ліофілізаторі (Л-17) амілазу вагою 24,8 кг, у вигляді суцільного твердого коржа переносять до валкової дробарки (ВД-18) та

подрібнюють до розміру часток 1 мм. Також до дробарки вносять неконденційні частинки які не пройшли через сито (ВС-19) на наступному етапі.

ТП 6. Просіювання

ТП 6.1. Просіювання амілази

Просіювання подрібненої амілази здійснюється на віброситі (ВС-19) до отримання однорідних часточок (1 мм). Після просіювання амілазу, що залишився на ситі знову повертається на стадію ТП 4.1 для повторного подрібнення. Процес повторюють декілька разів. З врахуванням витрат отримуємо 24,6 кг готового продукту з амілазою активністю 5000 Од/г, який прямує до стадії пакування.

ПМВ 7. Пакування, маркування та відвантаження

ПМВ 7.1 Пакування, маркування та відвантаження

Після подрібнення від ТП 6.1 амілаза масою 24,6 кг надходить на стадію пакування, маркування та відвантаження. Пакування здійснюється в 5 пакетів з полімерних матеріалів по 5 кг в кожному, за допомогою (ФМ-20). Пакети в які буде упакована продукція мають бути марковані принтом-етикеткою на якій зазначено назва, виробник, маса та термін придатності. Після пакування та маркування готовий продукт відправляється на склад для зберігання.

ПМВ 7.2. Фасування упакованого продукту в групову тару

Для полегшення подальшого зберігання та транспортування готового продукту, препарат в індивідуальних упаковках фасують в гофроящики (4 мішки в одну коробку) і переносять на зберігання в склад.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1 Знешкодження твердих відходів

Для знешкодження твердих відходів, які представлені біомасою від ТП 1.1 їх відправляються на знешкодження на спеціально відведений полігон.

ЗВ 8.2 Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи, що утворюються після миття обладнання та та осадом після ультрафільтрації супернатанту від ТП 2.1 та ТП 2.2 зливаються в каналізацію.

РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва продукту мікробного синтезу

6.1. Визначення амілазної активності

Йодомеричний (амілокластичний) метод заснований на здатності йодиду утворювати яскраво-синє забарвлення у поєднанні з крохмалем. Крохмаль гідролізується амілазою у зразку з вивільненням дрібніших молекул, таких як декстран, мальтоза та деякі молекули глюкози. Дрібніші молекули цукру не утворюють комплексу з йодидом і не дають синього забарвлення. У міру розщеплення більшої кількості крохмалю інтенсивність синього кольору зменшується. Субстрат (крохмаль) та зразок (амілаза) змішують разом та інкубують протягом фіксованого часу. Додають барвник йодиду, і утворюється барвник крохмаль/йодид. Спектрофотометричний вимір проводиться визначення інтенсивності забарвлення (поглинання). Чим нижче кінцеве поглинання (що більша різниця між контрольним і тестованим розчинами), тим вища активність амілази в сироватці.

МАТЕРІАЛИ

- 13 пробірок по 100 мм
- Нагрівальний блок або водяна баня
- 16 пробірок х 100 мм
- Спектрофотометр
- 19 пробірок х 150 мм
- Нормальне управління
- Крохмальний субстрат
- Зразки сироватки
- Йодний реагент

					НУХТ БТФК 02 01 03 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ док.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Кислий В.П.</i>				РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва продукту	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акривів</i>
<i>Перевір</i>	<i>Ворониов О.О.</i>						54	89
<i>Консульта</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н.Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабников В.П.</i>							

- Піпець
- Дистильована вода
- 0,9% сольовий розчин

ПРОЦЕДУРА

1. Помістіть приблизно 4 мл крохмального субстрату в позначену пробірку 16 x 100 мм. Помістіть пробірку в нагрівальний блок при 37 °C або на водяну баню мінімум на 5 хвилин для попереднього нагрівання. Продовжуйте нагрівати при 37°C, поки не знадобиться для кроку 7.
2. Позначте дві пробірки розміром 19 x 150 мм для кожного контролю та зразка, які потрібно перевірити. Позначте одну з кожної пари пробірок «порожньою», а іншу «тестовою».
3. Додайте 21,0 мл дистильованої води в кожен з пробірок 19 x 150 мм («холосту» і «тестову»). Відкладіть ці трубки для майбутнього використання.
4. Позначте дві пробірки розміром 13 x 100 мм для кожного контролю та зразка, які потрібно перевірити.
5. Додайте 1,0 мл 0,9% фізіологічного розчину в кожен пробірку 13 x 100 мм.
6. Піпетка 30 μ л відповідного контролю або зразка в кожен пробірку 13 x 100 мм, позначену як «тест». Перемішайте кожен шляхом перевертання та інкубуйте всі пробірки 13 x 100 мм («тест» і «холоста») при 37°C протягом 5 хвилин для попереднього промивання.
7. Після 5-хвилинного попереднього нагрівання, продовжуючи інкубацію, додайте 0,5 мл підігрітого крохмального субстрату (з кроку 1) до всіх пробірок 13 x 100 мм («порожня» і «тест»). Інкубуйте кожен пробірку рівно 7 хвилин.
8. Рівно через 7 хвилин інкубації додайте 2,0 мл розчину йодиду в кожен пробірку.

9. Додайте 30 μ л відповідного контролю або зразка в кожен «порожню» пробірку.
10. Перемістіть вміст кожної пробірки 13 x 100 мм у відповідну пробірку 19 x 150 мм із кроку 3. Перемішайте шляхом перевертання.
11. Виміряйте абсорбцію суміші в кожній пробірці («тест» і «холоста») при 660 нм проти дистильованої води. Запишіть абсорбцію в таблицю даних.
12. Обчисліть значення амілази для досліджуваного матеріалу за наведеною нижче формулою:

$$A_{\text{б л а н к}} - A_{\text{т е с т}} / A_{\text{б л а н к}} \times 5000 = \text{одиниць амілази/л [70]}$$

6.2. Визначення вологовмісту

Методи висушування є найбільш надійними методами визначення вмісту вологи в продукті. Принцип їх полягає в тому, що певну наважку речовини висушують до постійної маси і по різниці між початковою масою і масою сухого залишку знаходять кількість вологи в досліджуваному продукті [71].

Для визначення вологості зерна і напівпродуктів застосовують такі методи висушування: метод висушування до постійної маси в шафі при температурі 105 ° С; метод висушування інфрачервоними променями; швидкий метод висушування при температурі 130 ° С.

Визначення методом висушування до постійної маси при температурі 105 ° С .

Для наважки речовини і подальшого висушування користуються невисокими широкими скляними бюксами (діаметр 5-6 см, висота 4-5 см), забезпеченими добре притертими кришками.

Попередньо визначають постійну масу бюкса.

Для цього вимитий бюкс поміщають в сушильну шафу на 30 хв при температурі 105 ° С, потім його ставлять в ексікатор, охолоджують і зважують, після чого знову поміщають в сушильну шафу на 10-15 хв і після охолодження зважують. Періодичне підсушування і зважування проводять до тих пір, поки бюкс не набуде постійної маси.

У висушений бюкс зважують 2-5 г подрібненої речовини. Висота шару цієї речовини в бюксі не повинна перевищувати 1 см.

Бюкс у відкритому вигляді ставлять в сушильну шафу, попередньо нагрітий до 105 ° С. Поряд з бюксе кладуть кришку.

При масових дослідженнях число бюксів має бути не дуже велике (не більше 4-8), так як накопичується в шафі волога перешкоджає висушування проб.

Висушування проводять протягом 4-5 годин, після чого бюкс виймають, з термостата, поміщають в ексікатор, для охолодження на 30 хв і зважують на аналітичних вагах.

Потім бюкс з навішуванням повторно поміщають в сушильну шафу і через 1,0-1,5 год повторюють ту ж операцію охолодження і зважування. Так надходять до тих пір, поки різниця між результатами двох зважувань буде не більше 0,0005 г. У цьому випадку маса речовини вважається постійною.

У деяких випадках після зменшення маси матеріалу, що висушується речовини настає її збільшення, що обумовлюється наявністю окислювальних процесів. За постійну масу тоді приймають останню ще спадну масу. Таким чином, в результаті аналізу отримують два показники: масу бюкса і вологого речовини, взятого на висушування, і масу сухого залишку і бюкса, отриману після висушування. Втрата маси в грамах, віднесена до маси наважки, з перерахунком на 100 г речовини, висловлює вологість досліджуваного продукту.

Вологість речовини знаходять за формулою

$$w = \frac{b}{a} \times 100,$$

де: b - спад в масі навішення після висушування, що визначається за різницею;
a-маса випробуваної вологої речовини (навішування).

Знаючи вологість, досліджуваного продукту, легко визначити процентний вміст, в ньому сухих речовин по формулі:

$$C_{св} = 100-w$$

РОЗДІЛ 7. Проект технічних умов (ТУ) на випуск товарної форми цільового продукту

ТУ 5722-014-8826142-2022

Ці технічні умови (ТУ) поширюються на біопрепарат.

Продукт призначений для покращення оцукрювання при переробці підвищеної кількості несолодженої сировини, для гідролізу білків до пептидів і амінокислот, що позитивно впливає на зброджуваність сусла дріжджами, а також для дооцукрювання сусла при фільтруванні у киплячому стані. Галузь застосування:

— додавання в пивне сусло для прискорення процесу бродіння;

Умови експлуатації:

— Температурний діапазон роботи препарату 30-60°C;

— Оптимум дії рН 4.0-6.0.

Перелік нормативної та технічної документації, на яку дано посилання в цих ТУ, наведено в Додатку 1.

НУХТ БТЕК 02 01 03 КР ПЗ				
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Кислий В.П.</i>		
<i>Перевір</i>		<i>Воронцов О.О.</i>		
<i>Консульта</i>				
<i>Н.Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>		<i>Стабников В.П.</i>		
РОЗДІЛ 7. Проект технічних умов (ТУ) на випуск товарної форми цільового продукту				
		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
			58	89
<i>Кафедра БТМ</i>				

ТЕХНІЧНІ ВИМОГИ

1.1 Основні параметри та характеристики

1.1.1 Біопрепарат повинен відповідати вимогам цих ТУ.

1.1.2 Характеристика біопрепарату.

1.1.2.1 Біопрепарат випускається у вигляді однієї марки:

- МАРКА СП – сухий порошок з аполітичною активністю 5000 ± 25 од/г.

1.2 Вимоги до біопрепарату

1.2.1 Наявність амліазної активності на рівні з стандартом

1.2.1.1 Біопрепарат за органолептичними показниками якості повинен задовольняти вимоги та норми, зазначені у таблиці 1.1.

Таблиця 1.1 – Органолептичні показники біопрепарату

Найменування показника	Характеристика	Метод випробування
Зовнішній вигляд	Дрібнозернистий продукт	за ДСТУ 20264.1
Колір	Світло – сірий чи бежевий	за ДСТУ 20264.1
Запах	Без запаху	за ДСТУ 20264.1

1.2.1.2 Фізико-хімічні та мікробіологічні показники яким повинен відповідати біопрепарат з відповідними вимогами та нормами, вказані у таблиці 1.2.

Таблиця 1.2 – Фізико-хімічні показники біопрепарату

найменування показника	Характеристика та норма	Метод випробування
Розмір частинок	1 мм	за ДСТУ 20264.1
Масова доля вологи, %, не більш ніж	13%	за ДСТУ 20264.1
Амілолітична активність (АС), од/г	250 ± 25	за ДСТУ Р 54330
Наявність сторонньої мікрофлори, КУО/мл, КУО/мл	$1 \cdot 10^2$	за ДСТУ 20264.1

1.2.1.3 За своїм складом біопрепарат повинен відповідати зазначеному у таблиці 1.3.

найменування показника	Норма, мас.	Метод випробування
Амілаза бактеріальна	94%	за ДСТУ 20264.1
Сульфат натрію	6 %	за ДСТУ 20264.1

1.2.2 Біопрепарат ефективно працює у діапазоні кислотності середовища (рН 4,0 - 6,0) та температур (від плююс 30 до плюс 60 °С).

1.3 Вимоги до сировини

1.3.1 Компоненти та сировина, що застосовується для виробництва біопрепарату є дозволеними для застосування у встановленому порядку за ДСТУ 24297.

1.3.2 Використання сировини вітчизняного та імпортного походження допускається, яка за якісними характеристиками співпадає з 1.3.1 та відповідної щодо безпеки норм, встановлених нормативними правовими актами

1.4 Вимоги до препарату

1.4.1 Амілазна активність сягає 5000 ± 25 од/г.

1.4.2 Амілазна активність при відносно невеликих температурах від 30 °С.

1.5 Комплектність

1.5.1 До комплекту поставки препарату входить:

— біопрепарат;

— посібник із застосування (інструкція).

1.6 Упаковка

1.6.1 При виробництві біопрепарату як споживчу тару використовують поліетиленові мішки місткістю 5, 10 кг (далі - ємності).

1.6.2 Герметичність та збереження біопрепарату вже в розфасованому вигляді при транспортуванні повинен забезпечувати спосіб закупорювання споживчої тари. Окрім цього він забезпечує зберігання та реалізацію споживачеві протягом терміну придатності продукції.

1.6.3 Біопрепарат у розфасованому вигляді в споживчій тарі упаковують до транспортної тари з пакувальних матеріалів. Пакувальні матеріали повинні бути дозволеними наглядовими органами України.

1.6.4 Окрім затверджених інструкцією допускається використання інших можливих пакувальних матеріалів, які дозволені до застосування та які могли б забезпечити збереження якості біопрепаратів.

1.6.5 Шов поліетиленових мішків для забезпечення герметичності упаковки повинен бути звареними, окрім цього завареним має бути і шов завантажувального отвору.

1.6.6 Оскільки біопрепарат виготовляється в сухому вигляді для його упаковки допускається використання коробок із гофрованого картону, які мають бути обклеєні клейовою стрічкою за ДСТУ 18251.

1.6.7 Окрім наведених вище допускається також упаковка біопрепарату з використанням коробок з гофрованого картону, що були у вжитку. Умовами для цього є те що коробки будуть міцними, сухими та без сторонніх запахів.

1.6.8 Маса нетто біопрепарату розфасованого у коробки з гофрованого картону має становити 20 кг (4 поліетиленові мішки по 5 кг або 2 по 10). Відхилення від маси не повинні перевищувати показника $\pm 1,5$ %.

1.7 Маркування

1.7.1 Маркування споживчої тари біопрепарату. Постачання біопрепарату здійснюється в поліетиленових мішках. Обов'язково кожна одиниця споживчої

тари повинна бути маркована фарбою за допомогою трафарету. В залежності від виду маркування допускається також використання штемпелювання, маркувальними машинами при використанні стікерів танаклеюванням етикетки. Якщо упаковка представляє з себе подвійні пакети між ними вкладають етикетку з позначенням:

Маркування. На упаковці вказують:

- «Україна»;
- термін зберігання
- назву підприємства, його товарний знак та адресу;
- назву препарату українською (російською) мовою та англійською (міжнародною);
- номер серії;
- біохімічні параметри (активність, рН, температура)
- умови зберігання
- заходи безпеки;
- маса нетто

1.7.2 Транспортне маркування здійснюється за ДСТУ 141-92 з нанесенням маніпуляційного знаку “Оберігати від вологи!” і наступних позначень:

- назва продукту;
- дата виготовлення;
- товарний знак, назва підприємства-виробника, його адреса і місце виготовлення;

- умови зберігання;
- термін придатності до споживання;
- номер партії (серії);
- кількість пакувальних одиниць
- ферментативна активність;
- позначення технічних умов;
маса нетто кожної пакувальної одиниці в г або кг.

2 ВИМОГИ БЕЗПЕКИ І ОХОРОНИ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

2.1 Загальні вимоги безпечні під час виробництва

- 2.1.1 Зміст токсичних елементів у біопрепараті повинен відповідати нормам, що були встановлені нормативно правовими актами України.
- 2.1.2 Мікробіологічні показники біопрепарату також повинні відповідати нормам, що були встановлені нормативно правовими актами України.
- 2.1.3 Вдихання біопрепарату або його потрапляння в очі може викликати алергічні реакції, тому під час виготовлення, транспортування, використання та зберігання слід цього уникати.
- 2.1.4 Якщо відбулося потрапляння біопрепарату на слизову оболонку очей або при його потрапленні в дихальні шляхи необхідно промити очі та прополоскати горло водою. Також допускається використання розчину питної соди масовою концентрацією 50 г/дм³.
- 2.1.5 Під час використання та виробництва біопрепарату на всіх його технологічних стадіях слід використовувати ефективну припливно-витяжну вентиляцію.

2.2 Біопрепарат нешкідливий

Встановлено що біопрепарат є екологічно чистим, не містить токсичних речовин, не є шкідливим для тварин, рослин та водних біоресурсів.

2.3 Вплив на навколишнє середовище

Біопрепарат не чинить хімічних, радіаційних, електромагнітних механічних, та термічних впливів що до навколишнього середовища при випробуванні, використанні, зберіганні та транспортуванні.

3 ПРАВИЛА ПРИЙМАННЯ

3.1 Розфасований біопрепарат приймають

Розфасовані біопрепарати приймаються партіями. Партія – це однорідна упаковка біопрепаратів однієї марки та типу з однаковою назвою, виготовлена на одному виробничому підприємстві, з використанням одного технологічного обладнання, в одному виробничому циклі, в одну дату виробництва та з однаковою супровідною документацією, що засвідчує якість та безпеку продукту.

3.2 Документ, що засвідчує якість та безпеку продукції

Якість та безпеку продукції засвідчують в документах, що мають містити таку інформацію:

- найменування виду біопрепарату та його марку;
- найменування підприємства-виробника, його місцезнаходження;
- номер та дату його видачі;
- термін придатності;
- дату виготовлення;
- товарний знак виробника (за наявності);
- дату відвантаження;
- кількість пакувальних одиниць продукції (мішки, коробки, ємності) у партії;
- номер партії;
- масу нетто, кг;
- підтвердження відповідності якості розфасованого біопрепарату вимогам цих ТУ;
- позначення реальних ТУ.
- номер бригади, відповідальної за випуск, чи номер шлюбника;
- умови зберігання;

3.3 Для перевірки відповідності органічного продукту вимогам цього стандарту на виробничому підприємстві повинні бути проведені наступні випробування. :

- приймально-здавальні випробування.

3.4 Приймально-здавальні випробування

В кожній партії проводять наступні приймально-здавальні випробування:

- визначення органолептичних показників;
- визначення фізико-хімічних показників;
- визначення мікробіологічних показників

Кожна партія органічної продукції підлягає вхідному контролю на відповідність вимогам цього стандарту шляхом вибіркової перевірки якості.

упаковки, правильності нанесення маркування, маси продукту, органолептичними, фізико-хімічними показниками та мікробіологічними показниками

3.5 Обсяг вибірки від партії

Обсяг вибірки партії становить 5% від кількості одиниць транспортної упаковки. Якщо лот містить менше 20 одиниць, обирається одна одиниця.

Споживча тара відбирається методом випадкової вибірки. У цьому випадку з кожної транспортної пакувальної одиниці (але не менше трьох) у зразку відбирають 1 % споживчої тари.

3.6 Отримання незадовільних результатів

Якщо хоча б для одного маркера не отримано задовільних результатів аналізу, повторіть тест з подвоєним об'ємом зразка, відібраного з однієї серії біопрепарату.

3.7 Результати повторних аналізів

Результати повторних аналізів є остаточними і дійсними для всієї партії.

4 МЕТОДИ ВИПРОБУВАНЬ

4.1 Метод відбору проб

Відбір проб – за ДСТУ 20264.0.

4.2 Метод визначення органолептичних показників

4.2.1 Визначення зовнішнього вигляду, колір та запах біопрепарату.

4.2.1.1 Апаратура, реактиви та матеріали:

- Ложка або порцеляновий келих.

4.2.1.2 Продукт поміщають у білу порцелянову чашку або ложку і візуально оцінюють зовнішній вигляд, колір і запах при кімнатній температурі при природному освітленні. Запах визначається органічно. Підготовка

має бути сіро-коричневою рідиною з легким запахом казеїну. Допускається стратифікація при зберіганні.

4.3 Метод визначення фізико-хімічних показників

4.3.1. Визначення вмісту вологи в препараті.

4.3.1.1 Сутність методу.

Цей метод ґрунтується на висушуванні досліджуваного біопрепарату при 105 °С до досягнення постійної ваги.

4.3.1.2 Апаратура, реактиви:

- Електрична сушарка будь-якої марки, яка підтримує температуру від 0°С до понад 200°С з похибкою $\pm 2^\circ\text{C}$.
- Ваги лабораторні загального призначення другого класу точності або вище з найбільшою межею зважування 200 г згідно з ДСТУ 53228.
- Екстрактор будь-якої конструкції згідно ДСТУ 25336.
- Стаканчик для зважування (бюкс) SV 19/9 або SV 24/10 згідно з ДСТУ 25336 або металевий.
- Кислота сірчана за ГОСТ 4204 або гель сірчаноокислий за ДСТУ 3956, х.ч. або ч.д.а.
- Прутки за ДСТУ 25336.
- 4.3.1.3 Проведення аналізу.
- Плоскогубці за ДСТУ 25336.

Помістіть 1000-2000 г суспензії біопрепарату в бюкс, попередньо висушений до постійної ваги, помістіть його в сушильну шафу за допомогою щипців на 2 години, потім закрийте бюкс, охолодіть в сушильній шафі і зважте. Зважуйте щогодини, поки суспензія не висохне до постійної ваги.

Якщо різниця між двома наступними зважуваннями не перевищує 0,005 г, вага вважається стабільною.

4.3.1.4 Опрацювання результату.

Масову частку вологи (W) у відсотках обчислюють за формулою (1)

$$W = (m_2 - m_3) \cdot 100 / (t_2 - t_4), \quad (1)$$

де m_2 – маса бюкси з наважкою, г;

m3 - маса висушеної бюкси з наважкою, г;

m4 - маса висушеної порожньої бюкси, р.

Остаточним результатом випробування є середнє арифметичне результатів двох паралельних вимірювань, відносна різниця яких не повинна перевищувати 0,25 відсотка.

Результат заокруглюють до першого десяткового знака.

4.4 Метод визначення мікробіологічних показників

4.4.1 Визначення загального бактеріального обсіменіння біопрепаратів.

4.4.1.1 Сутність методу.

Цей метод заснований на підрахунку колоній, що ростуть у чашках Петрі ГОСТ 25336 з поживними речовинами.

Загальна кількість бактерій виражається як кількість мікробних колоній на грам біопрепарату.

4.4.1.2 Обладнання, реактиви та матеріали.

- Лабораторні ваги другого класу точності з найбільшою границею зважування 200 г згідно з ДСТУ Р 53228.
- Термостат з автоматичним регулюванням температури, що гарантує температуру зразка $(40 \pm 0,2)$ °С.
- Стерилізатор паровий типу ГП-400 Праб 0,2 МПа відповідно до ДСТУ Р EN 13060.
- Скляний посуд та лабораторне обладнання згідно з ДСТУ 25336.
- Мірний циліндр для вимірювання об'ємів від 10 до 100 см³ згідно з ДСТУ 1770.
- Біологічний мікроскоп МВІ або МВР або іншої аналогічної марки згідно з ДСТУ 8074.
- Скляний посуд та лабораторне обладнання згідно з ДСТУ 23932.
- Біологічна чашка (Петрі) згідно з ДСТУ 25336.
- Скляний посуд та лабораторне обладнання згідно з ДСТУ 29227.
- Скляна мірна склянка лабораторна за ДСТУ 1770.

- Вода дистильована за ДСТУ 6709.
- М'ясне пептонно-агарове середовище (МПА) за ДСТУ 21237.
- Сухий ферментний пептон для бактеріологічних цілей згідно з ДСТУ 13805.
- Бульйон м'ясний пептонний за ДСТУ 20730.
- Фізіологічний розчин (хлорид натрію за ДСТУ 4233, 0,9 %).
- Мікробіологічне агарове середовище згідно з ДСТУ 17206.
- Вода м'ясна згідно з ДСТУ 20729.
- Бавовна медична гігроскопічна за ДСТУ 5556.
- Шпатель Дригальського за ДСТУ 25336.
- Марля медична за ДСТУ 9412.

4.4.1.3 Підготовка до тестування

4.4.1.3.3.1 Приготування фізіологічного розчину за ДСТУ 4233, 0,9 %.

4.4.1.3.2 Підготовка води для м'яса згідно з ДСТУ 20729.

4.4.1.3.3 Приготування м'ясного пептонного агару (МПА) згідно з ДСТУ 21237.

4.4.1.3.3.4 Приготування м'ясного пептонного бульйону згідно з ДСТУ 20730.

4.4.1.1.4 Проведення тесту.

4.4.1.4.1 Помістіть стерильну біологічну чашку (чашку Петрі) з поживним агаром (далі - "чашка") на стіл і запишіть на кришці чашки назву аналізу, дату посіву, розведення та кількість посівного препарату.

4.4.1.4.2 Приготуйте серію серійних розведень. Для цього 10 см³ попередньо розведеного препарату змішують у колбі, що містить 90 см³ стерильного фізіологічного розчину (перше розведення). Потім 10 см³ першого розведення переносять у другу колбу, що містить 90 см³ фізіологічного розчину, щоб зробити друге розведення, і так далі. Використовуйте стерильну піпетку та окрему мірну пляшку кожного разу для приготування розведення.

4.4.1.4.3 Для визначення автентичності культури препарату використовуйте розведення, яке дозволяє вирощувати ізольовані колонії. Помістіть 20-25 см³

стерильного агарового середовища, розтопленого і охолодженого до 40°C, у стерильну пластину. Після того, як середовище застигне, $X=AP/mV$, (2)

де А - середнє арифметичне число колонії, що вирости на чашках Петрі;

Р – розведення препарату;

m – маса наважки препарату, г;

V - обсяг проби, що використовується для висіву, см³.

Приклад розрахунку

Маса навішування препарату 1,00 г.

На чашках Петрі в розведенні 10² підраховано:

200 колоній-на 1-й чашці;

160 колоній - на 2-й чашці;

250 колоній - на 3-й чашці;

220 колоній - на 4-й чашці;

150 колоній - на 5-й чашці;

240 колоній - на 6-й чашці.

Середня кількість колоній - 203.

$$X=(203 \cdot 10^2)/(1,0 \cdot 0,5)=406 \cdot 10^2=0,46 \cdot 10^5 \text{ (колоній/г)}.$$

4.4.1.4.4 Культурально-морфологічна характеристика культур, що використовуються в препараті, повинна відповідати опису.

При мікроскопії - палички одиночні та в ланцюжках, 0.9-1.0 x 3.0-3.6 мкм, спори овальні, спорангій не роздутий, спори розташовані ексцентральні.

4.4.2 Визначення загального вмісту мікробних клітин.

4.4.2.1 Обладнання, прилади та матеріали:

фотоелектроколориметр КФК-2 або аналогічний;

кювети із товщиною шару 0,5 см; 0,85% розчин хлориду натрію.

4.4.2.2 Хід аналізу.

Досліджувану пробу попередньо розводять розчином натрію хлориду до концентрації, при якій показання за шкалою приладу знаходяться в межах від 0,1 до 0,3 одиниць екстинкції. Вимірюють оптичну щільність проби на ФЕК при довжині хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) в кюветі з товщиною шару 0,5 см, в порівнянні з розчином хлориду натрію.

4.4.2.3 Розрахунок результатів.

Загальну концентрацію клітин у 1 см³ проби обчислюють за формулою (3)

$$C=2*10^9*E*p, \quad (3)$$

де С - загальна концентрація клітин, кл*см-3;

Е – величина екстинкції проби, од. Е;

п - розведення досліджуваної суспензії, число разів;

2- перерахунковий коефіцієнт.

4.4.3 Визначення вмісту колонієутворюючих одиниць (СЕ).

4.4.3.1 Обладнання, прилади та матеріали:

- чашки Петрі, піпетки, шпателя;
- агаризоване живильне середовище;
- 0,85% розчин хлориду натрію

4.4.3.2 Хід аналізу.

Цей тест визначає кількість мікробних клітин на основі їх здатності утворювати колонії в поживних середовищах високої щільності (КУО - колонієутворююча одиниця) Показник КУО використовується для кількісної характеристики складу біопрепарату "Нефтекосил".

Посів суспензії, що аналізується, слід проводити шляхом експериментального визначення співвідношення між загальною кількістю мікробних клітин (визначеною за допомогою ШОЕ) і кількістю клітин, здатних утворювати колонії, з урахуванням результатів вимірювання загальної концентрації клітин.

Слід зробити серію 10-кратних серійних розведень стандартної бактеріальної суспензії; по 0,1 см³ кожного розведення від 10⁻⁵ до 10⁻⁷ слід висіяти в три чашки Петрі, з оптимальною кількістю 100-120 колоній на чашку Петрі.

Кількість КУО в рідкому препараті "Еконефтоцил" має становити щонайменше $(1,5)10^9$ мікробних клітин, а посів з максимального розведення 10^{-7} має супроводжуватися позитивним результатом.

4.4.4 Визначення активності біодеградації (утилізація вуглеводнів, у %) по відношенню до нафтопродуктів.

4.4.4.1 Обладнання, інструменти та матеріали.

- ІЧ-спектрофотометр з перетворенням Фур'є FT1R-8201 (Shimadzu).
- Лабораторні електронні ваговимірювальні прилади.
- Лабораторний сушильний навіс.
- Жолоб глушника.
- Центрифуга.
- Флакони з пеніциліном, з силіконовими прокладками та металевими кришками, 15 см³.
- Оксид алюмінію, КПК
- Хлорид кальцію.
- Чотирьохлористий вуглець
- Ангідросульфат натрію
- Гідроксид натрію
- Раймонд Мінералз.
- Продукти на основі вуглеводнів (наприклад, сира нафта, паливно-мастильні матеріали, ароматичні вуглеводні).

4.4.4.2 Аналітична процедура

У скляну колбу на 250 см³ спорожніть 45 см³ мінерального середовища Раймонда, додайте 5 см³ мікробної суспензії (кінцева концентрація клітин $1 \cdot 10^7$ клітин/см³) і 0,5 см³ вуглеводневмісного продукту. Колба з 50 см³ середовища Раймонда і продуктом, що містить вуглеводні в тій самій концентрації, що й експериментальна

система, слугувала контролем. Контрольні та експериментальні колби інкубували в статичних умовах при $(29 \pm 1) ^\circ\text{C}$ протягом 30 днів.

Потім додавали концентровану соляну кислоту до досягнення значення рН $4,0 \pm 1,0$, вміст колби фільтрували через фільтрувальний папір і промивали 10 см³ чотирехлористого вуглецю. Промитий фільтрат і чотирехлористий вуглець виливали в чисту колбу і проводили екстракцію протягом 30 хвилин. Потім вміст колби переносили в ділільну колбу, розділяли шари і зливали нижній шар (екстракт) в чисту колбу.

Відберіть 0,5 см³ екстракту піпеткою і додайте його в пробірку на 4,5 см³, що містить чистий чотирехлористий вуглець. Розбавте його до такої концентрації вуглеводнів, щоб коефіцієнт поглинання (max) не перевищував 1,85 одиниць. ABS. потім вимірювали в діапазоні випромінювання від 3200 до 2700 нм.

Кількість вуглеводнів у зразку розраховували за допомогою програмного забезпечення FTIR-8201, використовуючи попередньо визначену калібрувальну залежність вмісту нафтопродуктів у зразку від спектрального діапазону.

Для визначення калібрувальної функції було використано кілька зразків з різним вмістом вуглеводнів. Контрольні зразки обробляли так само, як і досліджувані. Знімають спектри поглинання екстрактів, отриманих в результаті обробки зразків, і визначають спектральний діапазон в межах певного діапазону для визначення калібрувальної залежності.

Ступінь деградації вуглеводневої основи розраховували як різницю між початковим і залишковим вмістом вуглеводнів у рідкій системі та виражали у відсотках.

4.4.5 Визначення втрати маси під час сушіння.

Втрата маси при сушінні не повинна перевищувати 5 %.

Втрата маси при сушінні визначається наступним чином. Приблизно 0,5 г (точно зважені) висушують до постійної маси в сушильній шафі²¹ при температурі від 100°C до 105°C протягом 1 години і вимірюють залишковий вміст вологи в препараті на основі різниці у вазі.

4.4.6 Визначення сторонньої мікрофлори.

Сторонню мікрофлору в препараті визначали шляхом культивування та морфологічної характеристики ізольованих колоній, вирощених на поживних середовищах при обприскуванні біологічних суспензій (чашок Петрі) лікарських

засобів у різних концентраціях у вигляді 10-кратних серійних розведень, приготованих у фізіологічному розчині.

4.4.6.1 Обладнання, реактиви та матеріали.

- Лабораторні ваги другого класу точності з найбільшою границею зважування 200 г згідно з ГОСТ Р 53228.
 - Термостат (автоматичний регулятор температури) для забезпечення температури нагріву $(40 \pm 0,2)^\circ\text{C}$.
 - Стерилізатор паровий ГП-400, тиск 0,2 МПа згідно з ДСТУ Р ЕІ 13060.
 - Мірний циліндр для вимірювання об'ємів 10-100 см³ згідно з ДСТУ 1770.
 - Біологічна чашка (Петрі) згідно з ДСТУ 25336.
 - Скляний посуд та лабораторне обладнання згідно з ДСТУ 23932.
 - Скляний посуд та лабораторне обладнання згідно з ДСТУ 25336.
 - Стакан скляний лабораторний для зважування згідно ДСТУ 1770.
 - Скляний посуд та лабораторне обладнання згідно з ДСТУ 29227.
 - Вода дистильована за ДСТУ 6709.
 - Сухий ферментний пептон для бактеріологічних цілей згідно з ДСТУ 13805.
 - Фізіологічний розчин (хлорид натрію за ДСТУ 4233, 0,9 %).
 - Мікробіологічне агарове середовище згідно з ДСТУ 17206.
 - М'ясо-пептонне агарове середовище (МПА) за ДСТУ 21237.
 - Вода м'ясна згідно з ДСТУ 20729.
 - Марля медична за ДСТУ 9412.
 - Бавовна медична гігроскопічна за ДСТУ 5556.
 - Шпатель дригальний по ДСТУ 25336.
- #### 4.4.6.2 Підготовка до тестування
- 4.4.6.2.2.1 Приготування фізіологічного розчину за ДСТУ 4233, 0,9 %.
 - 4.4.6.2.2 Підготовка води для м'яса згідно з ДСТУ 20729.

4.4.6.2.2.3 Приготування м'ясного пептонного агару (МПА) згідно з ДСТУ 21237.

4.4.6.2.2.4 Приготування сусло-агару згідно з ДСТУ 10444.12.

4.4.6.3 Проведення тесту.

4.4.6.3.3.1 Визначення кількості сторонніх бактерій в 1 см³ препарату.

4.4.6.3.2 Стерильну біологічну чашку Петрі (далі - чашка), що містить поживний агар, слід розмістити на столі, а на кришці чашки підписати назву аналіту, дату посіву, розведення та кількість посівного препарату.

4.4.6.3.3 Приготуйте серію серійних розведень. Для цього 10 см³ попередньо розведеного препарату поміщають у колбу з 90 см³ стерильного фізіологічного розчину - це перше розведення. Потім 10 см³ першого розведення переносять у другу колбу, що містить 90 см³ фізіологічного розчину, який є другим розведенням, і так далі. Використовуйте стерильну піпетку та окрему мірну пляшку кожного разу для приготування розведення.

4.4.6.3.4 Для визначення кількості екзотичної мікрофлори використовують розведення, що дають кількість колоній, які ростуть, в діапазоні 30-200. Чашки Петрі слід засіяти

$$X=AP/mV \quad (4)$$

де А - середнє арифметичне число колоній, що вирости на чашках Петрі;

Р – розведення препарату;

m – маса навішування препарату, г;

V - обсяг проби, що використовується для висіву, см³.

5 МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

5.1 Відбір проб

Після перевірки цілісності упаковки, пакунки були відкриті, а вміст ретельно перемішаний. Зразки органічних продуктів швидкого приготування були відібрані з кожної одиниці споживчої упаковки в різних місцях. Відбір проб здійснюється згідно з ДСТУ 20264.0.

Отримані зразки негайно об'єднують, перемішують і поміщають у стерильний контейнер з щільно закритою кришкою і використовують для оцінки якості органічної продукції.

Загальна вага зразків становить приблизно 100 г.

З усіх зразків, упакованих у протокол відбору проб, один примірник відправляється в лабораторію для аналізу, а інший опечатується і зберігається на випадок будь-яких розбіжностей в якості органічного продукту.

5.2 Контроль якості упаковки та правильності маркування

Контроль якості та правильності маркування упаковки здійснюється шляхом зовнішнього огляду кожної вибіркової одиниці споживчої упаковки.

5.3 Визначення маси

Визначення маси біопрепарату – за ДСТУ 3622.

6 ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ

6.1 Транспортування

Біопрепарати, упаковані в контейнери, можуть транспортуватися будь-яким видом транспорту за умови захисту від прямого впливу атмосферних опадів при температурі не вище 10°C і відповідно до правил перевезення, що діють на кожному виді транспорту.

Біопродукти не можна перевозити разом з мінеральними добривами, пестицидами або синтетичними відбілювачами.

6.2 Зберігання

Продукт зберігають при температурі від +2°C до +15°C у сухих, чистих, добре вентильованих складських приміщеннях, захищених від прямих сонячних променів, згідно з ДСТУ Р 57249-2016. Термін придатності - 12 місяців з дати виготовлення.

Органічні препарати не слід зберігати поблизу опалювальних або нагрівальних приладів.

7 ВКАЗІВКИ З ВИКОРИСТАННЯ

7.1 Витрата біопрепарату

Витрата біологічних речовин, що використовуються, визначається інструкцією з експлуатації.

7.2 Безпека та умови праці для обслуговуючого персоналу

7.2.1 До роботи з біопрепаратами допускаються особи не молодше 18 років, які пройшли медичний огляд і навчання для даного виду робіт; вони працюють під наглядом відповідальної особи, призначеної підприємством в період між ІТП.

7.2.2 Під час проведення робіт забороняється присутність сторонніх осіб і виконання робіт, пов'язаних з цією технічною процедурою.

7.3 Токсичність

7.3.1 Штами мікроорганізмів, покладені в основу біопрепарату, нетоксичні та непатогенні, не викликають ушкодження слизової оболонки та шкіри людини.

7.4 Індивідуальні засоби захисту

7.4.1 При роботі з біопрепаратами та сухими солями використовуйте фільтруючий респіратор, протигаз РПГ-67 (ДСТУ 12.4.004), захисні окуляри (ДСТУ 12.4.230.1), захисні мазі та пасти, наприклад, крем силіконовий - ТР ТС 019/2011 [4

7.4.2 Якщо біологічні препарати або солі потрапили на слизові оболонки, промийте їх водою. Припиніть роботу з цими особами, якщо на слизових оболонках або шкірі з'явилися ознаки подразнення.

7.5 Пожежна безпека

7.5.1 Біопрепарат не є горючим і вибухобезпечним. Температура самозаймання - + 435 °С, нижня межа займання - + 195,5 °С.

7.5.2 При поводженні з біологічними препаратами необхідно дотримуватися вимог безпеки згідно з ДСТУ 12.1.008.

8 ГАРАНТІЇ ВИРОБНИКА

Виробник гарантує, що біопрепарат відповідає вимогам цієї специфікації за умов транспортування, зберігання та застосування.

Гарантований термін зберігання біопрепарату - один рік при температурі від 0 до плюс 15°С.

Висновок. В ході роботи було проведено аналіз сучасних біотехнологічних підходів при отриманні біотехнологічних препаратів. Було встановлено що основні шляхи розвитку біотехнологій

- Отримання нових перспективних продуцентів в тому числі за допомогою генної інженерії і генних технологій.
- Оптимізація поживних середовищ

Досліджено ринок ферментів, в ході чого було з'ясовано, що гідролітичні ферменти мають найбільшу долю ринку. А серед них найбільш широкого використання серед гідролітичних ферментів набула амілаза, через що і була обрана в якості цільового продукту синтезу.

Найкращим продуцентом в ході вивчення літератури виявилася *Bacillus methylotrophicus* DCS1. Тому, що для нього застосовується просте і дешеве поживне середовище при відносно великій концентрації виділяюмого ферменту.

Для підприємств на яких масово використовується амілаза, можливо, доцільним є створення власного виробництва цього ферменту.

Список використаних джерел

- 1) INDUSTRIAL ENZYMES MARKET - GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECASTS (2021 - 2026) Електронний ресурс [Режим доступу]

<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market#faqs>

- 2) Gurung N., Ray S., Bose S (2021). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. Biomed Res Int 2013;2013:329121. doi: 10.1155/2013/329121 doi:10.3390/polym13040530
- 3) Ashok Pandey Christian Larroche. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Elsevier 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.01001-X>
- 4) Gopinath S.C., Anbu P., Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production Biomed Res Int 2017;2017:1272193.doi: 10.1155/2017/1272193
- 5) "History of Biology: Cuvier, Schwann and Schleiden". pasteur.fr. 8 April 2002. Archived from the original on 24 September 2015. Retrieved 17 May 2015.
- 6) Prince, Amanda L.; Antony, Kathleen M.; Chu, Derrick M.; Aagaard, Kjersti M. (2014). "The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers". Journal of Reproductive Immunology. 104–105: 12–19. doi:10.1016/j.jri.2014.03.006. ISSN 0165-0378. PMC 4157949. PMID 24793619.
- 7) Belorkar, S.A., Gupta, A.K. Oligosaccharides: a boon from nature's desk. AMB Expr 6, 82 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0253-5>
<https://link.springer.com/article/10.1186/s13568-016-0253-5>

					НУХТ БТЕК 02 01 02 КР ПЗ					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Список використаних джерел					
<i>Розроб.</i>		Кислий В.П.						<i>Лит.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрютив</i>
<i>Перевір</i>		Воронцов О.О.							79	89
<i>Консульта</i>								Кафедра БТМ		
<i>Н Контр.</i>										
<i>Затверд.</i>		Стабников В.П.								

- 8) A. Pandey, P. Nigam, C. R. Soccol, V. T. Soccol, D. Singh, and R. Mohan, "Advances in microbial amylases," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 135–152, 2000
- 9) S. Mitidieri, A. H. Souza Martinelli, A. Schrank, and M. H. Vainstein, "Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations," *Bioresource Technology*, vol. 97, no. 10, pp. 1217–1224, 2006.
- 10) M. Asgher, M. J. Asad, S. U. Rahman, and R. L. Legge, "A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing," *Journal of Food Engineering*, vol. 79, no. 3, pp. 950–955, 2007
- 11) S. Djekrif-Dakhmouche, Z. Gheribi-Aoulmi, Z. Meraihi, and L. Bennamoun, "Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder," *Journal of Food Engineering*, vol. 73, no. 2, pp. 190–197, 2006.
- 12) Prince AL, Antony KM, Chu DM, Aagaard KM. The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers. *J Reprod Immunol*. 2014 Oct;104-105:12-9. doi: 10.1016/j.jri.2014.03.006. Epub 2014 Apr 18. PMID: 24793619; PMCID: PMC4157949
- 13) B. Prakash, M. Vidyasagar, M. S. Madhukumar, G. Muralikrishna, and K. Sreeramulu, "Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101," *Process Biochemistry*, vol. 44, no. 2, pp. 210–215, 2009.
- 14) S. Ahlawat, S. S. Dhiman, B. Battan, R. P. Mandhan, and J. Sharma, "Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric," *Process Biochemistry*, vol. 44, no. 5, pp. 521–526, 2009.

- 15) S. Das, S. Singh, V. Sharma, and M. L. Soni, "Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme," *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 486–496, 2011.
- 16) Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res Int*. 2013;2013:329121. doi: 10.1155/2013/329121. Epub 2013 Sep 11. PMID: 24106701; PMCID: PMC3784079
- 17) D. Grandgirard, J. M. Loeffler, V. A. Fischetti, and S. L. Leib, "Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 197, no. 11, pp. 1519–1522, 2008.
- 18) Joshi R., Sharma R., Bhunia R. Lipase production from mutagenic strain of *Fusarium Incarnatum* KU377454 and its immobilization using Au@Ag core shells nanoparticles for application in waste cooking oil degradation *3 Biotech*. 2019 Nov; 9(11): 411. doi: 10.1007/s13205-019-1949-4
- 19) Zhu S. Y. , Xu Y. Yu X.W. Improved Homologous Expression of the Acidic Lipase from *Aspergillus niger* *J. Microbiol. Biotechnol*. 2020; 30(2): 196-205. <https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06028>
- 20) Yuanchao Qian, Lixia Zhong, Jia Gao. Production of highly efficient cellulase mixtures by genetically exploiting the potentials of *Trichoderma reesei* endogenous cellulases for hydrolysis of corncob residues. *Microbial Cell Factories* volume 16, Article number: 207 (2017) <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0825-3>.
- 21) Pajic P, Pavlidis P, Dean K, Neznanova L, Romano RA, Garneau D, et al. (May 2019). "Independent amylase gene copy number bursts correlate with dietary preferences in mammals". *eLife*. 8. doi:10.7554/eLife.44628. PMC 6516957. PMID 31084707.

- 22) CILOCI (DESEATNIC), Alexandra; CLAPCO, Steliana; TIURINA, Janeta; LABLIUC, Svetlana; DVORNINA, Elena; MATROI, Alexandra. Particularitățile fizicochimice și catalitice ale lipazelor exocelulare obținute cu tulpina de micromicete rhizopus arrhizus fișer cnmn fd 03 la cultivare prin nanoprocedee. In: Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă. Ediția 8, Vol.2, 20-21 martie 2021
- 23) BIVOL, Cezara; CILOCI (DESEATNIC), Alexandra; TIURINA, Janeta; LABLIUC, Svetlana; DVORNINA, Elena; CLAPCO, Steliana. Nanoprocedeu de obținere a unui preparat lipolitic autohton în baza tulpinii de micromicete *Aspergillus niger* CNMN Fd 01.. In: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2020.
- 24) Bijender Singh Engineering fungal morphology for enhanced production of hydrolytic enzymes by *Aspergillus oryzae* SBS50 using microparticles. 3 Biotech. 2018 Jun; 8(6): 283. doi: 10.1007/s13205-018-1308-x.
- 25) Dayana P.Meneses, Livia Maria N. Esterase production by *Aureobasidium pullulans* URM 7059 in stirred tank and airlift bioreactors using residual biodiesel glycerol as substrate. Biochemical Engineering Journal Volume 168, April 2021, 107954 <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107954>
- 26) Bhatt K., Lal S., Srinivasan R. Molecular analysis of *Bacillus velezensis* KB 2216, purification and biochemical characterization of alpha-amylase. Int J Biol Macromol. 2020 DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.205
- 27) Melnichuk N., Anselmi P.A. Braia M.J. Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. Waste Manag. 2020 Apr 1;106:155-161 doi: 10.1016/j.wasman.2020.03.025
- 28) Balakrishnan M., Jeevarathinam G., Kumar S. Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state

- fermentation of edible oil cakes. *BMC Biotechnol.* 2021 May 4;21(1):33
DOI: 10.1186/s12896-021-00686-7
- 29) Shnaider K.L., Zinkova M.Є., Gamayurova V.S. Effect of nutrient medium components on lipase biosynthesis by yeast *Yarrowia Lipolytica* Y-3153 *Chemical technology and biotechnology Chemical technology and biotechnology* DOI:10.15593/2224-9400/2021.3.01
- 30) Biplab K.D., M. Mizanur, Palash K.S. Molecular Identification of a Newly Isolated *Bacillus subtilis* BI19 and Optimization of Production Conditions for Enhanced Production of Extracellular Amylase. *BioMed Research International* Volume 2015 <https://doi.org/10.1155/2015/859805>
- 31) Noomen Hmidet, Nawel Jemil. Simultaneous production of alkaline amylase and biosurfactant by *Bacillus methylotrophicus* DCS1: application as detergent additive. *Biodegradation.* 2019 Aug;30(4):247-258. DOI: 10.1007/s10532-018-9847-8
- 32) Gaurav Pant, Anil Prakash, J.V.P. Pavani. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. Pages 50-55 | Published online: 16 Apr 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.010>
- 33) Pereira M., Vici A. Facchini F. Screening of filamentous fungi for lipase production: *Hypocrea pseudokoningii* a new producer with a high biotechnological potential. *Biocatalysis and Biotransformation* 07 Jan 2014Pages 74-83 <https://doi.org/10.3109/10242422.2013.873417>
- 34) El-Ghonemy D.H., El-Gamal M.S., Tantawy A.E. Extracellular Alkaline Lipase from a Novel Fungus *Curvularia* sp. DHE 5: Optimisation of Physicochemical Parameters, Partial Purification and Characterisation *Food Technol Biotechnol.* 2017 Jun; 55(2): 206–217 doi: 10.17113/ftb.55.02.17.4958
- 35) Khob A., Tigre L., Rodriguez A, A novel lipolytic yeast *Meyerozyma guilliermondii*: Efficient and low-cost production of acid and promising feed

- lipase using cheese whey Biocatalysis and Agricultural Biotechnology
Volume 24, March 2020 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101565>
- 36) Demirkan E., Cetinkaya A.A., Abdou M. Lipase from new isolate *Bacillus cereus* ATA179: optimization of production conditions, partial purification, characterization and its potential in the detergent industry *Turk J Biol.* 2021; 45(3): 287–300 doi: 10.3906/biy-2101-22
- 37) Bedade D., Deska J., Bankar S. Fermentative production of extracellular amylase from novel amylase producer, *Tuber maculatum* mycelium, and its characterization. *Prep Biochem Biotechnol.* 2018;48(6):549-555 DOI: 10.1080/10826068.2018.1476876
- 38) Marwan Msarah, Izyanti Ibrahim. Isolation and Characterisation of Thermophilic *Bacillus licheniformis* SUNGC2 as Producer of α -Amylase from Malaysian Hot Spring. *Pertanika Journal of Science and Technology* • December 2020 DOI: 10.47836 / pjst.28.S2.10
- 39) Xiao-Qin Wang, Ye-Ju Han, Didonc Nyobe. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. Published: April 13, 2017 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175004>
- 40) Wafaa M. Abd El-Rahim, Hassan Moawad. Highly efficient fungal pectinase and laccase producers among isolates from flax retting liquor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* Volume 25, May 2020 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101570>
- 41) Sundarram, Ajita, and Thirupathihalli Pandurangappa Krishna Murthy. " α -Amylase Production and Applications: A Review." *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 2.4 (2014): 166-175.
- 42) Saini R., Harnek S.S. Anjali D. Amylases: Characteristics and industrial applications *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2017; 6(4): 1865-1871

- 43) Варбанець Л. Д., Авдіюк К. В., Борзова Н. В. Мікробні α -амілази: виділення, властивості, практичне застосування // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 2. — С. 39-51. — Бібліогр.: 45 назв. — укр.
- 44) de Souza PM, de Oliveira Magalhães P. Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Braz J Microbiol.* 2010 Oct;41(4):850-61. doi: 10.1590/S1517-83822010000400004. Epub 2010 Dec 1. PMID: 24031565; PMCID:PMC3769773..
- 45) Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res Int.* 2013;2013:329121. doi: 10.1155/2013/329121. Epub 2013 Sep 11. PMID: 24106701; PMCID: PMC3784079.
- 46) Gopinath SC, Anbu P, Arshad MK, Lakshmipriya T, Voon CH, Hashim U, Chinni SV. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1272193. doi: 10.1155/2017/1272193. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28280725; PMCID: PMC5322433.
- 47) Chandra P, Enespa, Singh R, Arora PK. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb Cell Fact.* 2020 Aug 26;19(1):169. doi: 10.1186/s12934-020-01428-8. PMID: 32847584; PMCID: PMC7449042.
- 48) Javed S, Azeem F, Hussain S, Rasul I, Siddique MH, Riaz M, Afzal M, Kouser A, Nadeem H. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Prog Biophys Mol Biol.* 2018;132:23–34.
- 49) Tang L, Su M, Yan J, Xie S, Zhang W. Lid hinge region of *Penicillium expansum* lipase affects enzyme activity and interfacial activation. *Process Biochem.* 2015;50(8):1218–1223 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.022>
- 50) Phulpoto IA, Yu Z, Bowen H, Ndayisenga F, Jinmei L, Liang H, Qazi MA. Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and its potential for oil contaminated soil remediation. *Microb Cell Fact.* 2020;19:145 doi: 10.1186/s12934-020-01402-4
- 51) Liu X, Kokare C. Microbial enzymes of use in industry. In: *Biotechnology of microbial enzymes.* Acad Press; 2017, p. 267–98.

- 52) Özgen FF, Vardar-Yel N, Roth OS, Shahbaz LS, Vardar-Schara G. Surface residues serine 69 and arginine 194 of metagenome-derived lipase influence catalytic activity. *Biochem Eng J.* 2020;154:107442
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107442>
- 53) Kapoor M, Gupta MN. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* 2012;47(4):555–569
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>
- 54) Vaidya, Soumya & Srivastava, Praveen & Rathore, Dr. Pragya & Pandey, A.K.. (2015). AMYLASES : A PROSPECTIVE ENZYME IN THE FIELD OF BIOTECHNOLOGY. *J. Appl. Biosci.* 41. 1-18.
- 55) El-Fallal, A., Dohara, M. A. , El-Sayed, A., & Omar, N. (2012). Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. In (Ed.), *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology.* IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/51571>
- 56) Dibyangana Raul, Tania Biswas, Suchita Mukhopadhyay, Shrayan Kumar Das, Suvroma Gupta, "Production and Partial Purification of Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) Using Solid State Fermentation", *Biochemistry Research International*, vol. 2014, Article ID 568141, 5 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/568141>
- 57) Rochalska M, Grabowska K. Influence of magnetic fields on the activity of enzymes: a- and b-amylase and glutathione S-transferase (GST) in wheat plants. *Int. Agrophys.* 2007;21(2):185-188.
- 58) Yurong Chen, Zachary Armstrong, Marta Artola, Bogdan I. Florea, Chi-Lin Kuo, Casper de Boer, Mikkel S. Rasmussen, Maher Abou Hachem, Gijsbert A. van der Marel, Jeroen D. C. Codée, Johannes M. F. G. Aerts, Gideon J. Davies, and Herman S. Overkleeft *Journal of the American Chemical Society* 2021 143 (5), 2423-2432
DOI: 10.1021/jacs.0c13059
- 59) Alexandra Cristina Blaga, Dan Cașcaval, Anca Irina Galaction. Improved Production of α -Amylase by *Aspergillus terreus* in Presence of Oxygen-Vector. *Fermentation.* 2022, Vol.8, No.6, p.271.
https://doi.org/10.7831/ras.8.0_158

- 60) Mehta D and Satyanarayana T (2016) Bacterial and Archaeal α -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. *Front. Microbiol.* 7:1129.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01129
- 61) Ankesh Pandey, Reena Yadav, Indraneel Sanyal, Evaluating the pesticidal impact of plant protease inhibitors: lethal weaponry in the co-evolutionary battle, *Pest Management Science*, 78, 3, (855-868), (2021).
<https://doi.org/10.1002/ps.6659>
- 62) He, L., Mao, Y., Zhang, L. et al. Functional expression of a novel α -amylase from Antarctic psychrotolerant fungus for baking industry and its magnetic immobilization. *BMC Biotechnol* 17, 22 (2017).
<https://doi.org/10.1186/s12896-017-0343-8>
- 63) Hmidet, Noomen & Jemil, Nawel. (2019). Simultaneous production of alkaline amylase and biosurfactant by *Bacillus methylotrophicus* DCS1: application as detergent additive. *Biodegradation*. 30.
DOI:10.1007/s10532-018-9847-8
- 64) ПрАТ “ОБОЛОНЬ” [електронний ресурс] режим доступу:
<https://obolon.ua/ua/about/structure/1>
- 65) Технологія виготовлення пивного сусла [електронний ресурс] режим доступу: <http://www.comodity.ru/beer/beerwort/12.html>
- 66) Neelam Gurung, Sumanta Ray. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. Volume 2013
<https://doi.org/10.1155/2013/329121>
- 67) Макаеева О.Н. Технологія хранения и переработки растительного сырья // г. Могилев, пр. Шмидта, 3
- 68) Сидоров Ю.І. Промислові ферментери. *Біотехн.* 2012, 5(3).
- 69) Макаеева О.Н. Технологія хранения и переработки растительного сырья // г. Могилев, пр. Шмидта, 3

Перелік нормативної документації,
на яку дано посилання у справжніх ТУ

ДСТУ 2.114-95	Єдина система конструкторської документації. Технічні умови.
ДСТУ 8.423-81	Державна система забезпечення єдності вимірів. Секундоміри механічні. Методи та засоби перевірки
ДСТУ 12.0.004-90	Система стандартів безпеки праці. Організація навчання безпеки праці. Загальні положення.
ДСТУ 12.1.005-88	Система стандартів безпеки праці. Загальні санітарно-гігієнічні вимоги до повітря робочої зони.
ДСТУ 12.1.007-76	ССБТ. Шкідливі речовини. Класифікація та загальні вимоги безпеки.
ДСТУ 12.1.008-76	ССБТ. Біологічна безпека. Загальні вимоги.
ДСТУ 12.4.004-74	Респіратори, що фільтрують протигазові РПГ-67. Технічні умови.
ДСТУ 12.4.011-89	ССБТ. Засоби захисту працюючих. Загальні вимоги та класифікація.
ДСТУ Р 12.4.230.1-2007	ССБТ. Засоби індивідуального захисту очей Загальні технічні вимоги
ДСТУ 15.309-98	Системи розробки та постановки продукції на виробництво. Випробування та приймання продукції, що випускається. Основні положення.
ДСТУ 1770-74	Посула мірна скляна лабораторна. Циліндри, мензурки, колби, пробірки. Загальні технічні умови
ДСТУ 3622-68	Молоко та молочні продукти. Відбір проб та підготовка їх до випробування.
ДСТУ 3956-76	Силікагель технічний. Технічні умови.
ДСТУ 4168-79	Наірій азотнокислий. Технічні умови
ДСТУ 4204-77	Реактиви. Кислота сірчана. Технічні умови.
ДСТУ 4233-77	Реактиви. Натрій хлористий. Технічні умови.
ДСТУ 5556-81	Вата медична гігроскопічна. Технічні умови.
ДСТУ 6259-75	Гліцерин. Технічні умови
ДСТУ 6709-72	Вода дистильована. Технічні умови.
ДСТУ 8074-82	Мікроскопи інструментальні. Типи, основні параметри та розміри. Технічні вимоги
ДСТУ 9412-93	Марля медична. Загальні технічні умови
ДСТУ 10075-75	Калій фосфорнокислий 7-водний. Технічні умови
ДСТУ 10354-82	Плівка поліетиленова. Технічні умови. ГОСТ
ДСТУ 10444.12-88	Продукти харчові. Метод визначення дріжджів та цвілевих грибів
ДСТУ 13805-76	Пептон сухий ферментативний для бактеріологічних цілей Технічні умови.

ДСТУ 14192-96	Маркування вантажів.
ДСТУ 14922-77	Аеросил. Технічні умови
ДСТУ 17206-96	Агар мікробіологічний. Технічні умови.
ДСТУ 17811-78	Мішки поліетиленові для хімічної продукції. Технічні умови.
ДСТУ 18481-81	Ареометри та циліндри скляні. Загальні технічні умови
ДСТУ 18251-87	Стрічка клейова на паперовій основі. Технічні умови.
ДСТУ 20264.0-74	Препарати ферментні. Правила приймання та методи відбору проб.
ДСТУ 20264.1-89	1 Препарати ферментні. Методи визначення органолептичних, фізико-хімічних та мікробіологічних показників
ДСТУ 20729-75	Поживні середовища. М'ясна вода (для ветеринарних цілей). Технічні умови.
ДСТУ 20730-75	Поживні середовища. Бульйон м'ясо-пептонний (для ветеринарних цілей). Технічні умови
ДСТУ 21237-75	М'ясо. Методи бактеріологічного аналізу.
ДСТУ 21802-84	Паста хвойна хлорофіл-каротинова. Технічні умови.
ДСТУ 23932-90	Посуд та обладнання лабораторні скляні. Загальні технічні умови
ДСТУ 24297-2013	Верифікація закупленої продукції. Організація проведення та методи контролю.
ДСТУ 25336-82	Посуд та обладнання лабораторні скляні. Типи, основні параметри та розміри.
ДСТУ 28495-90	Продукція мікробіологічна. Правила приймання та методи відбору проб.
ДСТУ 29224-91 (ІСО 386-77)	Посуд лабораторний скляний. Термометри скляні скляні лабораторні. Принципи влаштування, конструювання та застосування.
ДСТУ 29227-91	Посуд лабораторний скляний. Піпетки градуйовані. Частина 1. Загальні вимоги.
ДСТУ Р 51474-99	Упаковка. Маркування, що вказує на спосіб поводження з вантажами.
ДСТУ Р 51720-2001	Мішки із полімерних плівок. Загальні технічні умови
ДСТУ Р ЄН 13060-2011	Стерилізатори парові малі.
ДСТУ Р 53228-2008	Терези неавтоматичної дії. Частина 1. Метрологічні та технічні вимоги. Випробування.