

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) _____ біотехнології та екологічного контролю _____
Кафедра _____ біотехнології і мікробіології _____

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Грегірчак Н.М.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2021 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« ___ » _____ 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності _____ 162 «Біотехнології та біоінженерія» _____

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми _____ «Промислова біотехнологія» _____

на тему: _____ Сучасні аспекти біотехнології _____
_____ хітинолітичних ферментів _____

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 1

Кривець Тетяна Юріївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник _____ Слободян Ольга Петрівна _____

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент _____ Моцар В.С. _____

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2021 р.

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

Пирог Т.П.

“ 28 ” жовтня 2020 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Кривець Тетяни Юріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Сучасні аспекти біотехнології
хітинолітичних ферментів

керівник роботи Слободян Ольга Петрівна, к.т.н., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “26”жовтня 2020 року № 868-кв

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи Ферментер об'ємом 250 л. Продуктент -
Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1. Коефіцієнт заповнення –
0,55.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; Розділ 1. Отримання хітинолітичних ферментів за допомогою мікроорганізмів; Розділ 2. Виділення хітиназ з водоростей та шлунків риб, молюсків; Розділ 3. Вплив умов культивування на синтез і активність хітиназ; Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску продукту мікробного синтезу; Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми; Розділ 6. Специфікація обладнання; Розділ 7. Опис технологічної схеми; Розділ 8. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема (формат А1), схема біосинтезу (формат А2), схема післяферментаційних робіт (формат А2)

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання _____ 28 жовтня 2020 р. _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Розділ 1. Отримання хітинолітичних ферментів за допомогою мікроорганізмів	29.10.2020-03.11.2020	
2.	Розділ 2. Виділення хітиназ з водоростей та шлунків риб, молюсків	29.10.2020-03.11.2020	
3.	Розділ 3. Вплив умов культивування на синтез і активність хітиназ	29.10.2020-03.11.2020	
4.	Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску продукту мікробного синтезу	03.11.2020-20.11.2020	
5.	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.12.2020-15.11.2020	
6.	Розділ 6. Специфікація обладнання	15.12.2020-25.12.2020	
7.	Розділ 7. Опис технологічної схеми	25.12.2020-03.01.2021	
8.	Розділ 8. Контроль виробництва	03.01.2021-15.01.2021	
9.	Оформлення апаратурної схеми	15.12.2020-04.11.2020	
10.	Оформлення технологічної схеми	15.12.2020-04.11.2020	

Здобувач

_____ (підпис)

Кривець Т.Ю.

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Слободян О.П.

_____ (прізвище та ініціали)

Реферат

Метою дипломної роботи є розроблення технологічної схеми виробництва ферменту хітинази з використанням бактеріального штаму *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-N1. Хітинолітичні ферменти є хорошою альтернативою для утилізації хітиновмісних відходів, які утворюються після переробки ракоподібних.

Технологічна схема виробництва хітинази включає допоміжні роботи (підготування мийних засобів, підготовка вентеляційного та аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (вирощування інокуляту в колбах на качалках, інокуляторі та ферментері; виробничого біосинтезу; відділення біомаси сепаратором; дезінтеграція клітин; ультрафільтрація ферментного комплексу; осадження ферментного комплексу сульфатом амонію; центрифугування осадженого ферментного комплексу, очищення ферменту хітиназа за допомогою іонообмінної хроматографії; ліофільне сушіння та пакування ферменту хітинази).

Дипломна робота складається зі вступу, восьми розділів, графічної частини, в якій представлено технологічна схема (формат А1), схема біосинтезу (формат А2), схема післяферментаційних робіт (формат А2) список використаних джерел. Загальний обсяг роботи — 129 сторіноки, 17 таблиць та 12 рисунків.

Ключові слова: *C. meiyuanensis*, біомаса, хітин, культивування, біосинтез, фермент, хітиновмісні відходи, хітиназа, біомаса.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	
РОЗДІЛ 1. ОТРИМАННЯ ХІТИНОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРООРГАНІЗМІВ	
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
1.1. Синтез хітиназ	10
1.2. Синтез хітиназ грибами	18
1.3. Синтез хітиназ рекомбінантними мікроорганізмами	23
РОЗДІЛ 2. ВИДІЛЕННЯ ХІТИНАЗ З ВОДОРОСТЕЙ ТА ШЛУНКІВ РИБ, МОЛЮСКІВ	29
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА СИНТЕЗ І АКТИВНІСТЬ ХІТИНАЗ	32
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ	37
4.1. Потреба у цільовому продукті	39
4.2. Розрахунок потужності виробництва	41
4.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	41
4.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	42
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ...	44
5.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування та перевірочний розрахунок складу поживного середовища	44
5.2. Обґрунтування вибору технології культивування та типу ферментера	50
5.3. Обґрунтування стадій підготовки повітря	52
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	52
5.5. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	53
5.6. Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту (упаковки).....	70
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	75
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	84
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	101
8.1. Мікробіологічний контроль	101
8.2. Визначення хітиназної активності	101
8.3. Визначення ферментативної активності.	102
8.4. Контроль чистоти виробничих приміщень	103
8.5. Показники росту і синтезу.....	103
8.6. Кількісне визначення білка на основі біуретової реакції.....	104
8.7. Визначення вмісту вологи.....	105
Висновки	116
Список використаної літератури	117
ДОДАТКИ	

Вступ

Хітин є одним із найпоширеніших біополімерів. Його модифікація та деградація в природі відбуваються завдяки хітинолітичним ферментам, які широко представленим у живих організмах і виконують різні функції. Хітинази в природі виконують ряд функцій, включаючи морфогенетичну, захисну, живильну і патогенну. Хітинази зустрічаються як у еукаріотних, так і у прокаріотних організмах. Хітинолітичні ферменти виявлені у вищих рослин, деяких безхребетних, членистоногих, нематод. Біосинтез хітинази широко поширений у бактерій і грибів. В даний час основними біотехнологічними джерелами отримання хітинази є мікроорганізми [1].

Рослини, риби та савці використовують хітинолітичні ферменти в якості захисту від патогенних грибів, мікроорганізми використовують їх для утилізації хітину та хітозану, а гриби - для часткового гідролізу хітинової клітинної стінки. В даний час виділено і охарактеризується велику кількість хітинолітичних ферментів. Вони знаходять широке застосування в біотехнології, сільському господарстві та медицині. Це дуже зручні інсектициди та фунгіциди[2].

Вперше хітинази були знайдені в латексі гевеї в 1965 р. У теперішній час хітинази знаходять не тільки у вищих рослин, але і у грибів, деяких членистоногих, нематод, а також бактерій [3-5]. Серед бактеріальних продуцентів, що синтезують хітинолітичні ферменти, найпоширенішими є представники видів *Streptomyces*, *Vibrio*, *Serratia*, *Bacillus* [7-10]. Частіше за все бактерії продукують не одну, а кілька хітиназ. Хітинази тієї або іншої бактерії можуть різнитися за питомою активністю, субстратною специфічністю, а також по динаміці накопиченням у зовнішньому середовищі.

НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ

7

Вступ

Літ.

Арк.

АКРУШІВ

Кафедра БТМ

					НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ			7		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ					
Розроб.	Кривець Т.Ю.							Літ.	Арк.	АКРУШІВ
Перевір.	Слободян О.П.									
Реценз.										
Н. Контр.										
Затверд.	Пирог Т.П.									

Багато видів бактерій родів *Bacillus*, *Pseudomonas* і *Streptomyces* за рахунок секреції хітиназ здатні використовувати хітин як єдине джерело вуглецю. Крім того, продукція хітиназ багатьма організмами є важливим захисним фактором проти дії різних патогенів [11].

Для ефективного обробітку сільськогосподарських культур і забезпечення збереження врожаю потрібно застосовувати засоби захисту рослин від збудників хвороб. Переважаючи в даний час хімічні засоби захисту стали серйозним фактором забруднення навколишнього середовища і продуктів харчування. Розробка і застосування екологічно безпечних біологічних методів боротьби із захворюваннями сільськогосподарських культур є актуальною проблемою [12].

На сьогодні великої популярності набуло використання хітиназ для утилізації хітиновмісної сировини, яка утворюється після переробки ракоподібних. Інтерес до них зумовлений тим, що дані ферменти утилізують ці відходи утворюють сировину, яка в подальшому може бути використана в медицині для виробництва антибактеріальних і протизапальних препаратів. Крім того, було показано, що N-ацетил-D-глюкозамін, який утворюється після гідролізу хітину, був випробований в клінічних дослідках для лікування остеоартрита та інших захворювань суглобів, а також захворювань кишечника.

Актуальність

На сьогодні відомо, що хітинази викликають інтерес у біотехнологів через високий попит і застосування цих ферментів у медицині, сільському господарстві та промисловості. Протигрибкові властивості деяких бактеріальних хітиназ, які гідролізують клітинну стінку фітопатогенних грибів, інтенсивно досліджують як альтернативний підхід для захисту сільськогосподарських культур від грибкових захворювань. Хітинази додають до складу препаратів: пестицидів, добрив. Також їх використовують для

утилізації хітиновмісної сировини. Бактерія *Chitinolyticbacter meiyuanensis* є одним із найбільш перспективних культур для синтезу ферменту хітинази, який можна використати для утилізації хітинолітичних ферментів.

Новизна заключається в використанні для біосинтезу хітинази високопродуктивного штаму *Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1*, який на відміну від інших мікроорганізмів синтезує даний фермент з високою хітинолітичною активністю – 13,6 од/мл, та за рахунок секреції хітиназ здатний використовувати хітин як єдине джерело вуглецю.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ОТРИМАННЯ ХІТИНОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРООРГАНІЗМІВ

1.1. Синтез хітиназ бактеріями

За останні 10 років вченими було досліджено і описано велику кількість продуцентів хітиназ. Найперспективнішими з них є бактерій, завдяки яким отримують велику кількість високопродуктивних хітинолітичних ферментів.

У 2018 році японськими вченими було синтезовано фермент хітиназа бактеріями родини *Aeromonadaceae*. Молекулярний розмір однієї хітинази, що продукується *Andreprevotia*, більший ніж у типових бактеріальних хітиназ. Супернатант діалізної культури, що містить хітинази чотирьох штамів (*S. plymuthica* SWSY-3.47, *A. salmonicida* SWSY-1.411, *A. salmonicida* SWSY-1.31, *A. Lacus* SWCS-3.14), придушує ріст гіфів гриба *Trichoderma reesei*. Ці результати показують, що ці чотири штами є хорошими представниками для контролю патогенних грибів [13]. Цього ж року корейськими вченими було культивовано бактерію *Salinivibrio* sp. BAO-1801, яку виділили з солоних ферментованих креветок. Вплив температури і рН на активність і стабільність хітинази BAO-1801 також були досліджені. Більш того, цей фермент в залежності від його концентрації інгібує ріст грибів [14].

Індійськими вченими в 2011 році було запропоновано хітиназу синтезовану *Streptomyces griseus* (MTCC 9723). Дослідники показали, що Hg^+ , Hg^{2+} і Р-хлормеркурібензойна кислота повністю інгібує активність хітинази. Очищена хітинази показала високу активність відносно колоїдного хітину, хітобіози і хітоолігосахаридів. Аналіз *in vitro* довів, що неочищена хітинази має протигрибкову активність проти всіх досліджених грибових збудників.

					НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Кривець Т.Ю.</i>			Розділ 1. Отримання хітинолітичних ферментів за допомогою мікроорганізмів	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		<i>Слободян О.П.</i>						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						
						Кафедра БТМ ¹⁰		

Молекулярна маса (34,32 кДа) очищеної хітинази була виміряна за допомогою електрофорезу в гелі SDS. Оптимальної хітиназної активності ферменту індійські вчені досягли при рН 6,0 і при 40 ° С. Фермент був стабільним при рН 5-9 і до 20-50 ° С [15].

Китайськими вченими було ідентифіковано два гена СНІ, що кодують синтез хітинази у бактерії SYBC-N1 *Chitinolyticbacter meiyuanensis*, і було передбачено їх 3D-структури білка. У цьому дослідженні СНІ2-хітинази експресувалися в клітині *Escherichia coli* BL21, і цей білок очищувався за допомогою осадження сульфатом амонію, DEAE-целюлози і хроматографії на Sephadex G-100. Оптимальна активність хітинази СНІ2 досягалася при температурі 40 ° С і рН 6,5. Присутність іонів металів Fe (3+), Fe (2+) і Zn (2+) пригнічує активність хітинази СНІ2, а Na⁺ і K⁺ сприяють її активності [16].

Зараз найперспективнішим застосування хітиназ є утилізація хітинових відходів, в продукти глюкозаміну та хіто-олігосахариду. Дана стаття повідомляє про експресію ендохітинази (ChiA) із штаму *Bacillus licheniformis* DSM8785 в *E. coli*. Рекombінантний ChiA може ефективно перетворювати колоїдний хітин до N-ацетилглюкозаміну та хітобіози при рН 4,0, 6,0 та 9,0 при 50 ° С та зберігати свою активність до цих днів у цих умовах, що дозволяє припустити, що цей фермент придатний для утилізації хітинових відходів [17].

У дослідженні [18] китайським вченим вдалося виділити та класифікувати нову аеробну мезофільну бактерію *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBCN1, яка здатна руйнувати хітин. Штам виявляв сильну хітинолітичну активність і являв собою грамнегативні, вигнуті, паличкоподібні та рухливі бактерії. Ріст цього штаму спостерігалось між 10 і 41 ° С та між рН 3,5 та 9,5. Філогенетичний аналіз на основі подібності послідовностей генів рРНК 16S виявив, що штам SYBC-N1 (Т) належав до родини *Neisseriaceae* [18].

Хітиназа синтезована завдяки *P. fluorescens* проявляє інсектицидну активність проти шкідників. Спосіб дії ферментативним гідролізом хітину, який є поширеним компонентом екзоскелета комах. Результати цього дослідження

може використовувати для майбутніх програм поліпшення врожаю та інтегрованих стратегій боротьби зі шкідниками [19].

Згідно з літературними джерелами [20,21] відомо, що бактерії є одними із найпопулярніших та найпродуктивніших продуцентів, які синтезують хітинази з різними ступенями хітинолітичної активності. В якості джерела вуглецю та азоту в більшості випадків використовують хітин. Але наприклад, бактерії *Paenibacillus* [22-24], *Chitinolyticbacter meiyuanensis* [25] культивують на субстратах з глюкозою, пептоном та дріжджовим екстрактом.

В роботах [26,27] вченими в якості джерела вуглецю було використано інулін. Це допомогло синтезувати хітиназу з вищою активністю. Групою вчених у роботі [28] було виділено штам *Yersinia entomophaga*, що синтезує фермент ендохітиназу, який розкладає хітин до N-ацетил-D-глюкозамін. Ця речовина використовують в медицині, в складі препаратів для лікування остеоартриту.

Перспективними в отриманні хітиназ з високою активністю є бактерії роду *Bacillus*: *Bacillus thuringiensis* [29,30], *Bacillus licheniformis* [32-35].

В більшості роботах в якості джерела вуглецю вчені пропонують використовувати хітин. Наприклад, дослідниками *Savita* із співавторами [36] було культивовано термостабільну бактерію *Brevibacillus formosus* на середовищі з колоїдним хітином. Даний мікроорганізм синтезує хітиназу з активністю - 1,56 од/мл. Вченими із Польщі [37], які з термостабільної *Maltophilia Stenotrophomonas* отримали хітиназу з активністю 2,1 од/мл. Цистеїн в даному випадку стимулює активність ферменту.

Роботи [38,39] присвячені синтезу хітиназ деякими представниками роду *Serratia*. В якості джерела вуглецю використовують колоїдний хітин. Було простежено залежність активності ферменту від температури і рН. Іншою групою вчених [40] також було використано в якості джерела вуглецю колоїдний хітин. Дослідники пропонують використовувати синтезовані хітинази для утилізації хітиновмісної сировини.

Найвища активність хітинази була виявлена після додавання 5% хітинового

порошку, тоді як при додаванні глюкози, сорбіта, сахарози, целюлози або крохмалю вона практично не змінювалася. Активність хітіназибула знижена при додаванні глюкози, GlcNAc, GlcN або крохмалю одночасно до середовища, але не пригнічувалася при додаванні сорбіту, сахарози або целюлози [41].

Saccharothrix yanglingensis Hhs.015, новий тип рідкісного актиноміцету, був виділений з коренів огірка. Chi6769 очищали афінною хроматографією HisTrap HP з оптимальним рН 7,0. Аналіз ферментативного гідролізу показав, що Chi6769 здатний гідролізувати хітин до (GlcNAc) 3, (GlcNAc) 2 і GlcNAc. (GlcNAc) [42]. Загальна характеристика бактеральних продуцентів ферменту хітіназа у *табл.1.1*

Характеристика бактерій, як продуцентів хітиназ

Продуцент	Джерело вуглецю	Хітинолітична активність, од/мл	Сфери застосування ферменту	Література
Хітинолітичні ферменти з низькою активністю				
<i>A. lacus</i> SWCS-3.14, <i>S. plymuthica</i> SWSY3.47, <i>A. salmonicida</i> SWSY-1.411 <i>A. salmonicida</i> SWSY-1.31	Колоїдний хітин	1,4	Додають до препаратів, які використовуються для біоконтролю патогенних гибів	[13]
		2,0		
		2,2		
		2,1		
<i>Streptomyces griseus</i> (MTCC 9723)	Колоїдний хітин	2,13	Додають до протигрибкових препаратів	[15]
SYBC-H1 <i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i>	Колоїдний хітин	4,6	Додають до протигрибкових препаратів	[16]
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM8785	Колоїдний хітин	5,11	Утилізація хітиновмісних відходів	[17]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Колоїдний хітин	0,048	Додають до препаратів для боротьби з шкідниками	[19]

Продуцент	Джерело вуглецю	Хітинолітична активність, од/мл	Сфери застосування ферменту	Література
<i>Paenibacillus</i> Sp. TKU042	Глюкоза	0,76	Додають до протигрибкових препаратів	[22]
<i>Paenibacillus ehimensis</i> MA2012	Сахароза	0,38	Додають до складу протигрибкових препаратів	[23]
<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBC-H1	Інулін	0,5	Використовується для гідролізу хітину до N-ацетил-D-глюкозаміну	[25]
<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBC-H	Глюкоза	0,4	Використовується для гідролізу хітину до N-ацетил-D-глюкозаміну	[27]
<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-9602	Колоїдний хітин	0,96	Додавання до пестицидних засобів	[29]
<i>Paenicibacillus barengoltzii</i> CAU904	Гліколевий та колоїдний хітин	1,2	Розкладання хітинвмісної сировини	[31]
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM878	Колоїдний хітин	1,5	Розкладання хітинвмісної сировини	[32]
<i>Brevibacillus formosus</i>	Колоїдний хітин	1,56	Розкладання хітинвмісної сировини	[36]
<i>Maltophilia Stenotrophomonas</i>	Колоїдний хітин	2,1	Використовується для гідролізу хітину до N-ацетил-D-глюкозаміну	[37]

Продуцент	Джерело вуглецю	Хітинолітична активність, од/мл	Сфери застосування ферменту	Література
<i>Serratia marcescens</i> PRNK-1	Колоїдний хітин 0,5 %	4,7	Додають до фунгіцидних засобів для інгібування росту гіфів <i>Rhizoctonia solani</i> і <i>Fusarium oxysporum</i>	[38]
<i>Serratia proteamaculans</i> 568	Колоїдний хітин 0,5 %	1,75	Для інгібування росту гіфів <i>Rhizoctonia solani</i> і <i>Fusarium oxysporum</i>	[39]
<i>Aeromonas Schubertii</i>	Колоїдний хітин	0,08	Додають до фунгіцидних засобів для інгібування росту грибів	[41]
<i>Saccharothrix</i> <i>Yanglingensis</i> Hhs.015	Крохмаль	5,8	Додають до протигрибкових препаратів	[42]
Хітинолітичні ферменти з високою активністю				
<i>Salinivibrio</i> sp. BAO-1801	Колоїдний хітин	16	Додають до препаратів, які використовуються для біоконтролю патогенних гібів	[14]
<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBCH1	Колоїдний хітин	9,6	Розкладання хітиновмісної сировини	[18]

Продуцент	Джерело вуглецю	Хітинолітична активність, од/мл	Сфери застосування ферменту	Література
<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBC-H1	Інулін	13,6	Використовується для гідролізу хітину до N-ацетил-D-глюкозаміну	[26]
<i>Serratia marcescens</i> JPP1	Глюкоза	23,09	Використовується для гідролізу хітину до N-ацетил-D-глюкозаміну	[40]
<i>Bacillus licheniformis</i> LHH100	Колоїдний і гліколевий хітин	7,8	Розкладання хітинвмісних відходів	[33]
<i>Bacillus licheniformis</i> AT6	Колоїдний хітин	8,5	Використовується для гідролізу хітину до N-ацетил-D-глюкозаміну	[34]

1.2. Синтез хітиназ грибами

Гриби це одні із найбільш вивчених продуцентів хітинолітичних ферментів. Галимзяною та співавторами було вивчено можливість грибів роду *Trichoderma*, виділених з різних екосистем, синтезувати хітинази. Більшість з отриманих ферментів пропонується додавати до складу препаратів: пестицидів та біодобрив [43].

Термостабільні ферменти з термофільних мікроорганізмів мають численні промислові, медичні, екологічні та біотехнологічні застосування завдяки їх високій стабільності до температури і рН. Нідерландськими вченими було отримано термостабільну хітиназу Ch1 завдяки грибу *Myceliophthora thermophila* C1. Хітинази Ch1 демонструє високу термостабільність при 40 - 55 ° С. Хітинази Ch1 володіє широкою субстратної специфічністю і перетворює хітин, хітозан, модифікований хітозан в олігосахариди. На активність хітинази Ch1 сильно впливають ступінь деацетилювання (DDA), молекулярна маса (Mw) і модифікація бічного ланцюга хітозану [44].

Thermomyces lanuginosus продукує велику кількість хітиназ, з яких хітинази I і II успішно очищені. Молекулярно-динамічне моделювання показало, що стабільність цих ферментів підтримується навіть при більш високій температурі [45].

Єгипетськими вченими завдяки *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988, було отримано хітиназу. Хітиназу очищали в три етапи, що включають осадження сульфату амонію, іонообмінну хроматографію DEAE-целюлози та гель-хроматографію сефакрил S-300. Mn^{2+} і Zn^{2+} іони призводять до підвищення активності хітинази. Тоді як іони Fe^{2+} та Cu^{2+} сильно гальмують активність хітинази [46].

У роботах [47-50] було культивовано гриби *Metarhizium anisopliae*, які синтезували два типи хітиназ: екзохітиназу та екзохітиназу. В якості джерела вуглецю використовують колоїдний хітин. При детальному вивченні було

з'ясовано, що активність синтезованих ферментів вища в порівнянні з хітиназами синтезованими грибами роду *Trichoderma*.

Починаючи з 2009 року в літературних джерелах [51-53] виділили різних представників роду *Aspergillus*, які синтезувати хітинази. Завдяки ферменту синтезованого грибом морського походження *Aspergillus griseoaurantiacus* КХ010988 [52] отримали олігосахариди, які володіють антибактеріальною і антиоксидантною активностями. Показано, що Mn^{2+} і Zn^{2+} призводять до підвищення активності хінази. Тоді як іони Fe^{2+} та Cu^{2+} сильно гальмують її. У роботі [53], під час досліджень було з'ясовано, що алозамідин проявляє себе як інгібітор хітинази синтезованої *Aspergillus fumigatu*.

У 2017 році Індійським вченим вдалося виділити новий штамм-продуцент термофільної хітинази *Humicola grisea* ITCC 10 із ґрунту напівпустої пустинної області Раджастхана. Тонкошарова хроматографія показала, що фермент може ефективно гідролізувати колоїдний хітин з утворенням хітоолігосахаридів. Виробництво хітіназів з *H. grisea* та оптимізація економічного виробництва середовища збільшують використання ферменту для великомасштабного виробництва біоактивних хітоолігосахаридів [54].

Китайськими вченими було культивовано ниткоподібного гриба *Isaria fumosorosea*, хітиназа якого є перспективним засобом для боротьби з комахами [55]. Деякі гриби виробляють гідролізуючі ферменти — хітинази, щоб подолати унікальні захисні механізми комах. Крім того, моніторинг виробництва грибкових ферментів в залежності від часу, джерел поживних речовин або інших факторів може сприяти встановленню оптимальних умов росту і збору для окремих ізолятів з метою досягнення максимальної активності біоконтролю. Гідролізований хітин, що складаються з N-ацетилглюкозаміну поглинається як поживні речовини для росту та реконструкції власної клітинної стінки [56].

В роботі [57] хітиназу синтезовану *Thermomyces lanuginosus* запропоновано, як альтернативу використанню хімічних фунгіцидів. Даний

фермент синтезований грибом має численні промислові, медичні, екологічні та біотехнологічні застосування завдяки високій стійкості до температури і рН.

Декілька наукових робіт присвячені інсектицидним властивостям хітиназ, які синтезуються *Beauveria bassiana* [58-60]. Результати в цих роботах показали, що отримані ферменти згубно діють на попелицю і *Myzus persicae*. Спостерегається залежність синтезу хітинази від рН, оптимальним для наступних представників став 5,5 рН. Загальна характеристика хітиназ синтезованих грибами представлена у *табл.1.2*

Характеристика синтезу хітиназ грибами

Продуцент	Джерело вуглецю	Хітинолітична активність, од/мл	Сфери застосування ферменту	Література
Низькоактивні хітинази				
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Колоїдний хітин	0,56	Деградація хітину комах	[47]
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Колоїдний хітин	Ендохітиназа - 1,2 Екзохітиназа - 0,75	Деградація хітину комах	[48]
<i>Aspergillus nidulans</i>	Колоїдний хітин	0,3	Деградація хітину комах	[51]
<i>Beauveria bassiana</i> BbK4B3	Пептон 1%	0,15	Додають до фунгіцидів для пригнічення росту <i>Myzus persicae</i>	[58]
<i>Beauveria bassiana</i> SFB-205	Глюкоза 1 %	0,915	Додають до складу пестицидів для знешкодження попелиці	[59]
Високоактивні хітинази				
<i>Myceliophthora thermophila</i> C1	Хітин, хітозан	3,5	Хітинази Chi1 може бути використана для валоризації хітину і для виробництва хітин- і хітоолігосахаридов в промисловому масштабі	[44]

Продуцент	Джерело вуглецю	Хітинолітична активність, од/мл	Сфери застосування ферменту	Література
<i>Aspergillus griseoaurantiacus</i> КХ010988	Хітин	1,2	Отримання хітоолігосахаридів	[46]
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Колоїдний хітин	1,728	Біоконтроль комах шкідників	[50]
<i>Humicola grisea</i> ITCC 10	Хітин	2,39	Отримання хітоолігосахаридів	[54]
<i>Aspergillus griseoaurantiacus</i> КХ010988	Колоїдний хітин	11	Отримання олігосахариду з антибактеріальною та антиоксидантною активностями	[52]

1.3. Синтез хітиназ рекомбінантними мікроорганізмами

Зараз створена велика кількість рекомбінантних *E. Coli*, які синтезують хітинази з високою хітинолітичною активністю.

Китайськими вченими (Zhang A із співавторами) було взято ген, що кодує хітиназу (Cmchi1) синтезовану *Chitinolyticbacbac meiyuanensis* SYBC-H1 і експресовано в клітину *E. coli* BL21 (DE3).

В результаті хітиназу (Cm Chi1) синтезовану рекомбінантною *E. coli* BL21 очищають за допомогою афінної хроматографії, після чого фермен хітиназа проявляє хітинолітичну активність - 1,5 од/мл. Отриману хітиназу використовують для отримання *N*-ацетил-*D*-глюкозамина. Гідролітичні властивості та хороша адаптація до оточуючого середовища вказують на те, що CmChi1 володіє відмінним потенціалом у промисловому виробництві *N*-ацетил-*D*-глюкозамина (GlcNAc) [61].

GlcNAc виявляє високу біологічну активність, яка знаходить широке застосування у багатьох областях, таких як харчова, фармацевтична, біомедицина та хімічна промисловість. Як правило, *N*-ацетил-*D*-глюкозамина отримують шляхом кислотного гідролізу хітину при високій температурі [62].

У останньому році дослідники надають більшої уваги ферментативному виробництву GlcNAc. Тому що цей підхід є :

- екологічно чистий;
- з високим виходом GlcNAc;
- м'який виробничий проц [62].

Через це хітин-руйнуючі ферменти використовуються для виробництва *N*-ацетил-*D*-глюкозамина у промисловому масштабі.

Хітинази синтезовані *E. coli* BL21 представляють собою групу ферментів, які включають ендохітиназу та екзохітиназу [63].

Іншими вченими із Японії (*Huang L* із співавторами) було проведено експресію в *E. coli* ген, який кодує хітиназу синтезовану *Chitiniphilus shinanonensis* SAY3(T). Для з'ясування хітинолітичної активності ферменту з

геномної бібліотеки було виділено 15 генів (*chiA-chiO*), що кодують хітин-руйнуючі ферменти. Отримані хітинази відіграють важливу роль в деградації нерозчинного хітину і відповідають за інгібуючий вплив на ріст грибів (*Trichoderma reesei*) [64]. За допомогою отриманої хітинази також можна отримувати GlcNAc та його олігомери з нативного хітину.

Вченими із університету Ніхон, Японія було отримано два штамми (BL21 (DE3) та HMS174 (DE3)) *E. coli*, які несуть рекомбінантну плазмиду експресії хітазини pVP-Chi, що містить ген хітинази *Vibrio parahaemolyticus*. Ці трансформовані *E. coli* продукують велику кількість хітиназ, які гідролізують хітин із утворенням ді-N-ацетилхітобіози (GlcNAc) 2 за наявності ізопропіл-1-тіо-β-D-галактопіранозиду (IPTG) і секретує фермен у свою культуральну рідину за допомогою сигнального пептиду [65].

Lobo MD із співавторами займалися експресією та ефективною секрецією функціональної хітинази з *Chromobacterium violaceum* в *E. coli*. Секретовану хітиназу очищали за допомогою афінної хроматографії на хітиновому матриксі. Оптимальний рН при якому активності буде максимальною - 5,0, а температура до 60 ° C [66].

Вченими із Корейської народної республіки було експресовано в *Escherichia coli* гени хітинази з *Bacillus*. Було взято хітиназу В (*chiB*) і хітиназу MY75 (*chiMY75*) з *B. thuringiensis* і *B. licheniformis*. Фермент *chiMY75* під час досліджень показав вищу хітинолітичну активність - 4,2 од/мл ніж хітиназа *chiB* - 1,4 од/мл. Під час дослідження було виявлено цис-активний (DRS) елемент, що негативно діє на експресію гетерологічних генів хітинази *Bacillus* в *E. Coli*. Для цього DRS частково або повністю вилучають [67].

Вченими із Китаю була виділена із ґрунту нова хітин-деградуюча бактерія - *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1. У своєму дослідженні вони займалися експресією генів хітинази із *C. meiyuanensis* SYBC-H1 в клітини *E. Coli*. Оптимальна активність хітинази спостерігалася при температурі 40 ° C і рН 6,5. Присутність іонів металів Fe (3+), Fe (2+) і Zn (2+) інгібує активність хітинази,

тоді як Na^+ і K^+ підвищує її активність. У цілому, результати показали, що хітиназа із замінюючими біохімічними властивостями придатна для біоконверсії відходів хітину. В кінці досліджень Активність хітинази склала 0,38 од/мл [68].

Іншими вченими із Китаю було здійснено маніпуляції з геном хітинази (PbChi70) з морською бактерії *Paenicibacillus barengoltzii*. Його експресували в *E. coli*. PbChi70 виявляє максимальну активність при рН 5,5 і 55 ° С. Він виявляв субстратну специфічність до колоїдного хітину, гліколевому хітину, порошкоподібного хітину і N-ацетилхітоолігосахаридів зі ступенем полімеризації вище трьох. Хітинолітична активність фермента — 0,1 од/мл [69].

Вчені із Іспанії взяли ген хітинази із археона *Halobacterium salinarum* СЕСТ 395 і експресували у *E. coli*. Синтезована хітиназа демонструє високу хітинолітичну активність при рН (6-8,5) і температури (25-45 ° С). Активність ферменту стимулювали завдяки іонаам металів Mg (+2), K (+) і Ca (+2), натомість Mn (+2) — інгібував ріст. Фермент гідролізує p-NP- (GlcNAc) 3, p-NP- (GlcNAc), кристалічний хітин та колелоїдний хітин. Максимальна хітинолітична активність — 0,51 од/мл [70].

Китайський вченими було виділено гени хітинах *ExrCHI31* і *exrCHI32* з *Limonium bicolor* і експресовано їх *E. Coli*. Була виміряна активність хітиназ на клітинну стінку різних мікроорганізмів. Оптимальні умови реакції для *inrCHI31* склали 5 ммоль/л Mn (2⁺) при 40° С і рН 5,0 з активністю 0,772 од/мл з використанням клітинної стінки *Alternaria alternata* в якості субстрату. Оптимальним умовою для *inrCHI32* було 5 ммоль/л Ba (2⁺) при 45 ° С і рН 5,0 з активністю 0,792 од/мл з використанням клітинної стінки *Valsa sordida*. Оптимальні умови реакції *exrCHI31* склали 5 ммоль/л Zn (2⁺) при 40 ° С і рН 5,0, а активність склала 0,921 од/мл з використанням клітинної стінки *Alternaria alternata* в якості субстрату. Одночасно оптимальні умови для *exrCHI32* склали 5 ммоль/л K⁺ при 45 ° С і рН 5,0, з клітинною стенею *V. sordida* в якості субстрату, і активність склала 0,897 од/мл. Для вивчення властивостей

разних хітіназ гени що їх кодують були експресовані в *E.coli* та дрожжах. Ген хітінази зячменю був експресований у *E.coli*, фермент виявив протигрибкову активність широкого спектра дії проти різних фітопатогенів, включаючи *Botrytis cinerea* (гниття табаку), *Pestalotia theae* (листова пляма чаю), *Bipolaris oryzae* (обесцвітання зерна рису), *Curvularia lunata* (п'ятнистість клеверу) та *Rhizoctonia solani* (гниття рису) [71]. Загальна характеристика рекомбінантних мікроорганізмів, які синтезують фермент хітіназа представлена у *табл.1.3*

Характеристика синтезу хітиназ рекомбінантними мікроорганізмами

Мікроорганізм з якого взято ген, що кодує хітиназу	Мікроорганізм в який експресовано ген хітинази	Джерело вуглецю	Хітинолітична активність, од/мл	Сфери застосування ферменту	Література
<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBC-H1	<i>E. coli</i>	Глюкоза	1,5	Отримання <i>N</i> -ацетил- <i>D</i> -глюкозамина	[61]
<i>Chitinophilus shinanonensis</i> SAY3(T)	<i>E. coli</i>	Хітин	5,3	Інгібує ріст грибів (<i>Trichoderma reesei</i>)	[64]
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>	Хітин	3,5	Отримання <i>N</i> -ацетил- <i>D</i> -глюкозамина	[65]
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>E. coli</i>	Хітин	1,37	Отримання <i>N</i> -ацетил- <i>D</i> -глюкозамина	[66]
<i>B. thuringiensis</i> <i>B. licheniformis.</i>	<i>E. coli</i>	Хітин	4,2 1,4		[67]

Мікроорганізм з якого взято ген, що кодує хітиназу	Мікроорганізм в який експресовано ген хітинази	Джерело вуглецю	Хітинолітична активність, од/мл	Сфери застосування ферменту	Література
<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBC-N1	<i>E. coli</i>	Хітин	0,38	Утилізація хітиновмісних відходів	[68]
<i>Paenicibacillus barengoltzii.</i>	<i>E. coli</i>	Хітин	0,1	Отримання N-ацетил-D-глюкозамина	[69]
<i>Halobacterium salinarum</i> CECT 395	<i>E. coli</i>	Хітин	0,51	Інгібує ріст грибів	[70]
<i>Limonium bicolor</i>	<i>E. coli</i>	Хітин	0,772-0,92	Інгібує ріст <i>Alternaria alternata</i> , <i>Valsa sordida</i>	[71]

РОЗДІЛ 2. ВИДІЛЕННЯ ХІТИНАЗ З ВОДОРОСТЕЙ ТА ШЛУНКІВ РИБ, МОЛЮСКІВ

Хітинази можуть отримувати не лише за допомогою мікроорганізмів. Велика частина робіт присвячена виділенню хітиназ із шлунку птахів, риб і тварин. Наприклад, у роботі [72] дослідниками було виділено фермент із шлунку червоної риби-скорпіона *Scorpaena scrofa*. Дана хітиназа проявила інсектицидну дію проти *Callosobruchus maculatus*, що вказує на можливість використання її в біотехнологічних стратегіях боротьби з комахами. Hg^{2+} і Hg^+ повністю інгібували активність ферменту. Схожі результати були отримати вченими *Ikeda* із співав.[73], які виділили хітиназу із желудка срібного горбиля. Фермент проявляв широку субстратну специфічність щодо розкладання α -хітину з панциря креветок і крабів і β -хітину з пера кальмара.

Іншою групою вчених було виділено хітиназу з рожевих водоростей *Chondrus verrucosus*. На активність ферменту, як і в більшості роботах мали серйозний вплив рН та температура. Дію виділеного ферменту досліджували на гліколевому хітині з якого було отримано промислово цінний N-ацетил-D-глюкозаміну [74].

Китайськими вченими (*Wang J* із співавторами) вперше було отримано два типи високоактивних хітиназ, які вони виділили із білої креветки *Echopalaemon carinicauda*. Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} Cu^{2+} в даному випадку стимулювали активність отриманого фермента. Хітиназу очищали за допомогою хроматографії на іонній смолі. Фермент виявився термостабільнішим ніж інші ферменти виділені з ракоподібних та молюсків [77]. За допомогою виділених хітиназ було отримано хітоолігосахариди, які можна використати для інгібування росту пухлин, лікування астми, підвищення міцності кісток, попередженню малярії.

НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
		Кривець Т.Ю.			Розділ 2. Виділення хітиназ з водоростей та шлунків риб, молюсків	Літ.	Арк.	Акрівшів
		Слободян О.П.						
						Кафедра БТМ²⁹		
		Пирог Т.П.						

В інших роботах [75,76] також були розглянуті хітинази виділені із креветок, але вони мали низку недоліків: невисока хітинолітична активність, не термостабільні. За для підвищення активності, вчені експресували ген який кодує хітиназу в *Escherichia coli*. Загальна характеристика організмів з яких виділено хітинази представлена у *табл.2.1*

Характеристика організмів з яких виділено хітиназ

Організм, з якого виділено хітиназу	Хітин, який гідролізує	Хітинолітична активність, од/мл	Сфери застосування ферменту	Література
Червона риби-скорпіон <i>Scorpaena scrofa</i>	Колоїдний хітин, гліколевий хітин, гліколевий хітозан	4,7	Інсектицид для боротьби з комахами	[72]
Срібний горбиль <i>Pennahia argentatus</i>	α -хітину, β -хітину	2,8	Розкладання хітину до N-ацетил-D-глюкозаміну	[73]
Рожеві водорості <i>Chondrus verrucosus.</i>	Гліколевий хітин	3,5	Розкладання хітину до N-ацетил-D-глюкозаміну	[74]
Біла креветка <i>Echopalaemon carinicauda</i>	Колоїдний хітин	2,3	Отримання хітоолігосахаридів	[75]

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА СИНТЕЗ І

АКТИВНІСТЬ ХІТИНАЗ

Китайськими вченими було ідентифіковано два гена CHI, що кодують синтез хітинази у бактерії SYBC-N1 *Chitinolyticbacter meiyuanensis*. Оптимальна температура для активності хітинази становила 39 ° С. Експертиза їх діяльність при температурі від 28 до 49 ° С виявила, що вона дуже термостабільна, і зберігає майже половину своєї активності (46,5%) при 30 ° С протягом 120 год інкубації. Оптимальна активність хітинази CHI2 досягалася при температурі 39 ° С і рН 6,5. Присутність іонів металів Fe (3+), Fe (2 +) і Zn (2+) пригнічує активність хітинази CHI2, а Na⁺ і K⁺ сприяють її активності. Висока стабільність хітинази CHI2 при температурі 39 ° С і рН 6,5 робить його хорошим кандидатом для біотехнологічних застосувань, пов'язаних з утилізацією хітиновмісної сировини [78].

Іншими китайськими вченими було також проведено роботи з аеробною мезофільною бактерією *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBCN1, яка здатна руйнувати хітин. Ріст цього штаму спостерігалось між 10 і 41 ° С та між рН 3,5 та 9,5 [79].

Дана стаття повідомляє про експресію ендохітинази (ChiA) із штаму *Bacillus licheniformis* DSM8785 в *E. coli*. Рекombінантний ChiA може ефективно перетворювати колоїдний хітин до N-ацетилглюкозаміну та хітобіози при рН 4,0, 6,0 та 9,0 при 50 ° С та зберігати свою активність до цих днів у цих умовах, що дозволяє припустити, що цей фермент придатний для утилізації хітинових відходів. Термічну стабільність ферменту визначали шляхом інкубації зразків ферменту в 100 мМ фосфатного буфера, рН 6,0 при різних температури в межах від 0 до 100 ° С протягом 30 хв [80].

					НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кривець Т.Ю.			Розділ 3. Вплив умов культивування на синтез і активність хітиназ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Слободян О.П.						
Реценз.						Кафедра БТМ 32		
Н. Контр.								
Загверд.		Пирог Т.П.						

Saccharothrix yanglingensis Hhs.015, новий тип рідкісного актиноміцету, був виділений з коренів огірка. Chi6769 очищали афінною хроматографією HisTrap HP з оптимальним рН 7,0. Аналіз ферментативного гідролізу показав, що Chi6769 здатний гідролізувати хітин до (GlcNAc) 3, (GlcNAc) 2 і GlcNAc. (GlcNAc). Очищений Chi6769 був найактивнішим при рН 7,0 у 50 мМ PBS-буфері і був стабільним в межах рН 4,0–7,0, зберігаючи більше ніж 60% його максимальної активності. Оптимальна температура Chi6769 був 49 ° С. Період напіввиведення ферменту при 50 ° С становив 90 хв. [81].

Термостабільні ферменти з термофільних мікроорганізмів мають численні промислові, медичні, екологічні та біотехнологічні застосування завдяки їх високій стабільності до температури і рН. Нідерландськими вченими було отримано термостабільну хітиназу Chi1 завдяки грибу *Myceliophthora thermophila* C1. Хітинази Chi1 демонструє високу термостабільність при 40 - 55 ° С. Хітинази Chi1 володіє широкою субстратної специфічністю і перетворює хітин, хітозан, модифікований хітозан в олігосахариди. На активність хітинази Chi1 сильно впливають ступінь деацетилювання (DDA), молекулярна маса (Mw) і модифікація бічного ланцюга хітозану [82].

Єгипетськими вченими завдяки *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988, було отримано хітиназу. Хітиназу очищали в трьох етапи, що включають осадження сульфату амонію, іонообмінну хроматографію DEAE-целюлози та гель-хроматографія сефакрил S-300. Mn²⁺ і Zn²⁺ іони призводять до підвищення активності хітинази. Тоді як іони Fe²⁺ та Cu²⁺ сильно гальмують активність хітинази. Термічну стабільність хітинази досліджували, і дані показали, що активність хітинази була стабільною, коли нагрівали при температурі до 40 ° С протягом 15 хв. Хітиназа втратила 40% активності при нагріванні до 60 ° С протягом 60 хв [83].

У роботі [84] показано, що Mn²⁺ і Zn²⁺ призводять до підвищення активності хінази. Тоді як іони Fe²⁺ та Cu²⁺ сильно гальмують її. Під час

досліджень було з'ясовано, що алозамідин проявляє себе як інгібітор хітинази синтезованої *Aspergillus fumigatu*.

В іншій праці [85] хітиназу синтезовану *Thermomyces lanuginosus* запропоновано, як заміну хімічних фунгіцидів. Даний фермент синтезований грибом має численні промислові, медичні, екологічні та біотехнологічні застосування завдяки високій стійкості до температури і рН. Взагалі молекулярні маси грибової хітинази були в діапазоні між 30 і 200 кДа і рН в межах від 4,0 до 7,0. Оптимальна температура для грибової хітинази коливається в межах від 20 до 40 ° С. На активність ферменту значно впливають іони металів. Зазвичай Mg^{+2} , Ca^{+2} , Na^{+} і K^{+} діють як активатор грибової хітинази, а іони важких металів, такі як Hg^{+2} , Ag^{+} , Fe^{+2} і Cu^{+2} мають значну гальмівну дію.

Бразильськими вченими *Lobo MD* із співавторами займалися експресією та ефективною секрецією функціональної хітинази з *Chromobacterium violaceum* в *E. coli*. Активність ферменту докорінно залежить від умов культивування. Оптимальний рН для його активності становив 5,0, і фермент зберігав ~ 32% своєї активності при нагріванні до 60 ° С протягом 30 хв. [86].

Ще одні вчені проводили дослідження з хітиназою синтезованою бактерією *S.meiyuanensis* SYBC-N1. Оптимальна активність хітинази спостерігалася при температурі культивування 40 ° С і рН 6,5. Присутність іонів металів Fe (3+), Fe (2+) і Zn (2+) інгібує активність хітинази, тоді як Na^{+} і K^{+} підвищує її активність. Дана хітиназа також використовується для утилізації хітиновмісної сировини [87].

Іншими вченими із Китаю було здійснено маніпуляції з геном хітинази (PbChi70) з морською бактерії *Paenicibacillus barengoltzii*. PbChi70 виявляє максимальну активність при рН 5,5 і 55 ° С, але може бути стабільною навіть при 60 ° С. Унікальні ферментативні властивості хітинази можуть зробити його хорошим кандидатом на виробництво (GlcNAc) 2. [88].

Вчені із Іспанії взяли ген хітинази із археона *Halobacterium salinarum* СЕСТ 395 і експресували у *E. coli*. Синтезована хітиназа демонструє високу хітинолітичну активність при рН (6-8,5) і температури (25-45 ° С). Активність ферменту стимулювали завдяки іонаам металів Mg^{+2} , K^{+} і Ca^{+2} , натомість Mn^{+2} — інгібував ріст [89].

Китайський вченими було виділено гени хітинах *ExrCH131* і *exrCH132* з *Limonium bicolor* і експресовано їх *E. Coli*. Була виміряна активність хітиназ на клітинну стінку різних мікроорганізмів. Оптимальні умови реакції для *inrCH131* склали 5 ммоль/л Mn (2^{+}) при 40° С і рН 5,0 з активністю 0,772 од/мл з використанням клітинної стінки *Alternaria alternata* в якості субстрату. Оптимальним умовою для *inrCH132* було 5 ммоль/л Ba (2^{+}) при 45 ° С і рН 5,0 з активністю 0,792 од/мл з використанням клітинної стінки *Valsa sordida*. Оптимальні умови реакції *exrCH131* склали 5 ммоль/л Zn (2^{+}) при 40 ° С і рН 5,0, а активність складала 0,921 од/мл з використанням клітинної стінки *Alternaria alternata* в якості субстрату. Одночасно оптимальні умови для *exrCH132* склали 5 ммоль/л K^{+} при 45 ° С і рН 5,0, з клітинною стіною *V. sordida* в якості субстрату, і активність складала 0,897 од/мл. Для вивчення властивостей різних хітиназ гени що їх кодують були експресовані в *E.coli* та дрожжах. Ген хітинази зячменю був експресований у *E.coli*, фермент виявив протигрибкову активність широкого спектра дії проти різних фітопатогенів, включаючи *Botrytis cinerea* (гниття тютюну), *Pestalotia theae* (листова пляма чаю), *Bipolaris oryzae* (обесцвітання зерна рису), *Curvularia lunata* (п'ятнистість клеверу) та *Rhizoctonia solani* (гниття рису) [90]. Загальна характеристика впливу умов культивування на синтез та активність хітиназ представлена у *табл.3.1*

Характеристика синтезу хітиназ рекомбінантними мікроорганізмами

Продуцент	Оптимальні умови культивування	Джерело вуглецю	Хітинолітична активність, од/мл	Сфери застосування ферменту	Література
SYBC-H1 <i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i>	39 °C pH 6,5	Колоїдний хітин	4,6	Додають до протигрибкових препаратів	[78]
<i>Saccharothrix yanglingensis</i> Hhs.015	49 °C pH 7	Крохмаль	5,8	Додають до протигрибкових препаратів	[81]
<i>Chromobacterium violaceum</i>	60 °C pH 5	Колоїдний хітин	1,37	Отримання <i>N</i> -ацетил- <i>D</i> -глюкозамина	[86]
<i>C.meiyuanensis</i> SYBC-H1	40 °C pH 6,5	Колоїдний хітин	0,38	Утилізація хітиновмісних відходів	[87]
<i>Paenicibacillus barengoltzii</i>	55 °C pH 5,5	Хітин	0,1	Отримання <i>N</i> -ацетил- <i>D</i> -глюкозамина	[88]
<i>Halobacterium salinarum</i> CECT 395	25-45 °C pH 6-8,5	Хітин	0,51	Інгібує ріст грибів	[89]
<i>Limonium bicolor</i>	40 °C pH 5 45 °C pH 5	Хітин	0,772-0,92	Інгібує ріст <i>Alternaria alternata</i> , <i>Valsa sordida</i>	[90]

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Хітин є одним з широко поширених біополімерів. Його модифікація і деградація в природі відбуваються завдяки різним хітинолітичним ферментам, які широко представлені в живих організмах і виконують різні функції. Вони беруть участь в процесі линьки у комах і деградації кутикули у ракоподібних. В даний час виділено і охарактеризовано велике число хітинолітичних ферментів. Вони знаходять широке застосування в біотехнології, сільському господарстві та медицині. Хітинази дуже зручні інсектициди і фунгіциди [91]. Зараз широкого інтересу набуло застосування хітиназ для утилізації багатих хітином матеріалів, таких як панцири морепродуктів для виробництва хітиноолігосахаридів і N-ацетил- β -D-глюкозаміну для харчової промисловості, у виробництві кормів, для отримання ферментних препаратів, біофунгіцидів, для хімічних потреб [91].

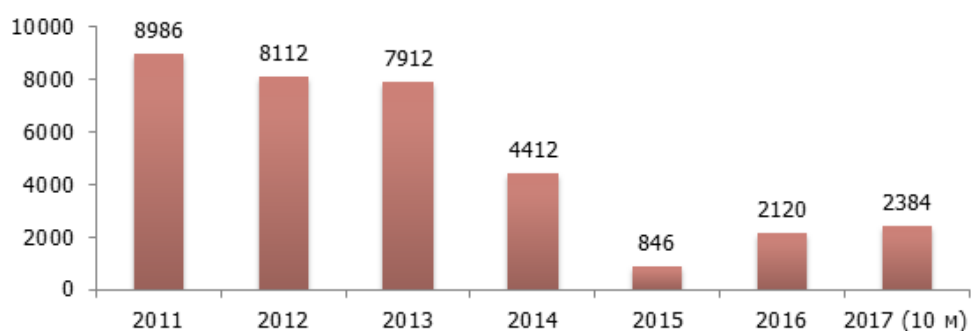


Рис.4.1. Динаміка імпорту ракоподібних в 2011-2017 рр., тонн [92]

НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Кривець Т.Ю.</i>			Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску продукту мікробного синтезу	Літ.	Арк.	Акрвішів
Перевір.		<i>Слободян О.П.</i>						
Реценз.		Після того як Україна ввела частину квот Чорного моря,						
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						

значно зменшився видобуток водних біоресурсів. Незважаючи на кризу, споживання і вилов ракоподібних в Україні за останні роки почав збільшуватися. Так як біоресурси українських морів і водойм не можуть в повній мірі задовольнити попит внутрішнього ринку на морепродукти тому є місце імпорту. Згідно даних компанії Pro-Consulting ринок ракоподібних, які були виловлені та імпортовані в Україні станом на 2016 рік склав:

- виловлених - 9951 тонн;
- імпортованих — 2120 тонн;

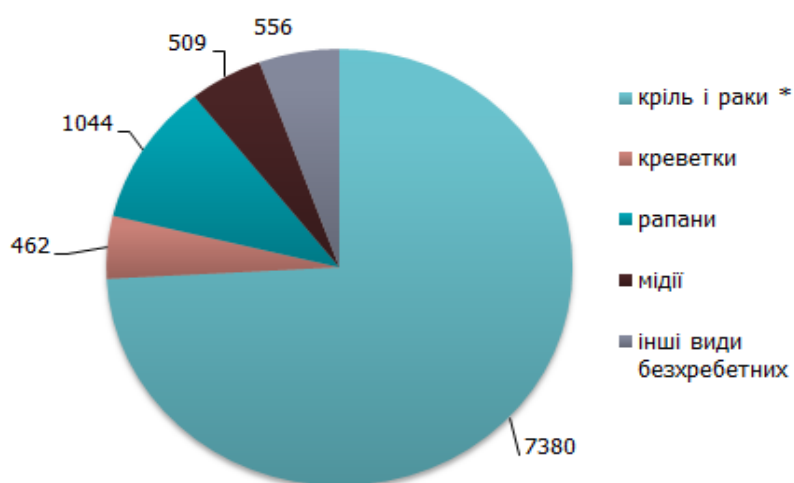


Рис.4.2. Структура водних біоресурсів в Україні в 2016 році, тонн [92]

50 % від загальної маси ракоподібних, які було вжито в 2016 році склали відходи їх переробки:

1) 9951 тонн ракоподібних (виловлених в Україні) + 2120 тонн ракоподібних (імпортованих в Україну) = 12071 тонн;

2) $12071 * 0,5 = 6035,5$ тонн хітиновмісних відходів.

Отже, використання хітинолітичних ферментів для розкладання хітиновмісних відходів, які утворюються після переробки ракоподібних є єдиним і перспективним методом утилізації. Продукти гідролізу хітину в подальшому

використовуються в різних галузях: сільському господарстві, медицині, біотехнології.

4.1. Потреба у цільовому продукті

Специфічна активність щодо хітину притаманна ферментам хітиназам. Хітин є одним з широко поширених біополімерів. Його модифікація і деградація в природі відбуваються завдяки різним хітинолітичним ферментам, які широко представлені в живих організмах і виконують різні функції. На сьогодні на ринку України не представлено засобу для розкладання хітину. Тому хітиназа є єдиним способом утилізації хітиновмісної сировини. На сьогодні існує велика кількість продуцентів хітинолітичних ферментів: бактерії, гриби, рекомбінантні мікроорганізми. Найперспективнішими із вище згаданих мікроорганізмів є бактерії.

Таблиця 4.1

Порівняння хітиназ, синтезованих різними мікроорганізмами

Приклад	Представник	Активність од/мл	Література
Ферментний препарат на основі хітиназ, синтезованих бактеріями	<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBC-H1	13,6	[26]
	<i>Bacillus licheniformis</i> AT6	8,5	[34]
Ферментний препарат на основі хітиназ, синтезованих грибами	<i>Aspergillus griseoaurantiacus</i> KX010988	11	[46]
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1,728	[48]
Ферментний препарат на основі хітиназ, синтезованих рекомбінантними мікроорганізмами	<i>E. coli</i> , в яку експресовано ген, що кодує синтез хітинази, виділений з <i>Chitinophilus shinanonensis</i> SAY3(T)	5,3	[93]

	<i>E. coli</i> , в яку експресовано ген, що кодує синтез хітинази, виділений з <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3,5	[65]
--	---	-----	------

Отже, на ринку України представлені різні ферментні препарати на основі хітиназ, які синтезуються різними організмами.

Станом на 2017 рік в Україні за рік виловлюється 12,071 тонн ракоподібних: 9951 тонн виловлених в Україні ракоподібних + 2120 тонн імпортованих в Україну ракоподібних. Після переробки ракоподібних залишається 50 % відходів. Отримані відходи подрібнюють, проводять екстракцію панцировмісної сировини (ПВС), дезамінують ПВС, депротинують, промивають водою і сушать [94]. До отриманого порошку хітину додають ортофосфатну кислоту для набухання на 2 години. Після чого хітин збільшується в розмірі в 5 раз — 30177,5 л набухлого хітину. Для розкладання 1 мл хітину необхідно 1 мл ферменту [95].

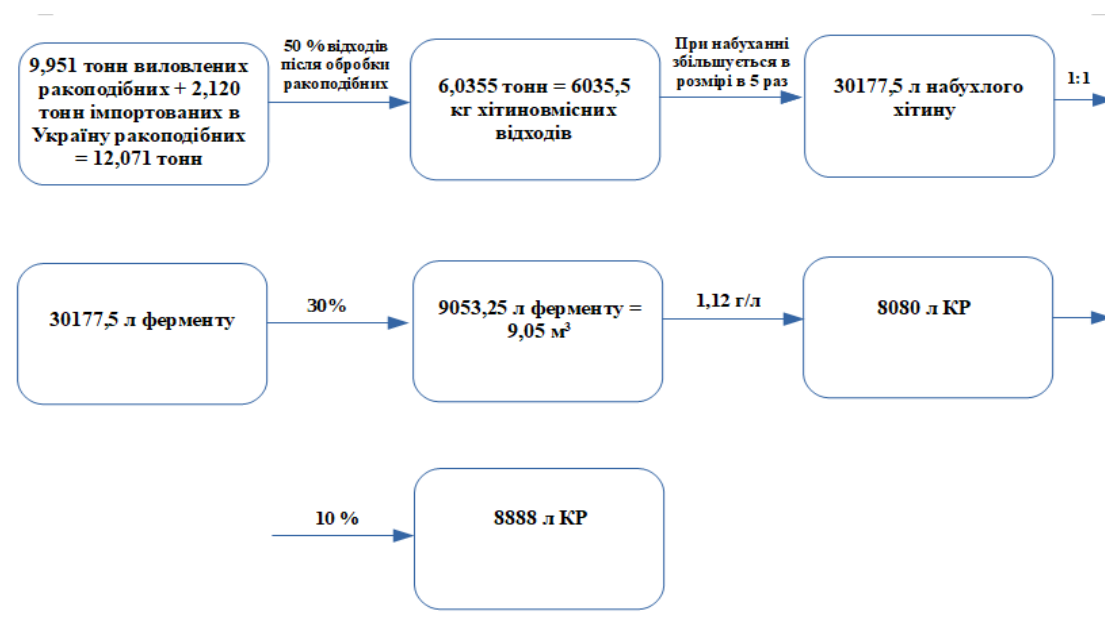


Рис.4.3. Узагальнена схема розрахунку культуральної рідини для біосинтезу ферменту бактерією *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1

Для загальної потреби в бактеріальній хітиназі берем 30%, інші 70 % покривають аналоги (ферменти синтезовані іншими мікроорганізмами): $30177,5 * 0,3 = 9053$ л ферменту.

4.2. Розрахунок потужності виробництва

Враховуючи вище наведені дані за рік нам потрібно отримати 9053 л ферменту.

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд = 270).

Розрахуємо тривалість циклу:

$$T_{\text{ц}} = T_{\text{к}} + T_{\text{пф}} = 72 + 8 = 80 \text{ (год)}$$

де $T_{\text{ц}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу $T_{\text{к}}$ - 72 год та час підготовки ферментера до роботи $T_{\text{пф}}$ — 8 год.

Кількість ферменту за цикл, л/цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{гп}} \cdot T_{\text{ц}} / T_{\text{рд}} \cdot 24 = 9053 \cdot 80 / 270 / 24 = 111,8 \text{ (л/цикл)}$$

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{гп}} / G_{\text{цк}} = 9053 / 111,8 = 81 \text{ (циклів)}$$

4.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Розрахувавши, скільки цільового продукту потрібно отримати за цикл ферментації (111,8 л/цикл), можемо розрахувати об'єм ферментера. Приймаємо $K_1 = 1,1$ - коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій, $R_{\text{кр}} = 1,12$ г/л - концентрація продукту в культуральній рідині, кількість втрат приймаємо 10 % (Есп).

Кількість культуральної рідини ($V_{\text{кр}}$) буде становити:

$$V_{\text{кр}} = K_1 (G_{\text{цк}} / (R_{\text{кр}} (1 - \text{Есп}))) = 1,1 \times 111,8 / (1,12 \times (1 - 0,1)) = 122 \text{ л/цикл}$$

Приймаємо коефіцієнт заповнення ферментера 0,55.

Розрахуємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 122 / 0,55 = 222 \text{ л}$$

Приймаємо геометричний об'єм ферментера 250 л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / V_{\text{ф}} = 122 / 250 = 0,5, \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

4.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 122$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати при біосинтезі, які становлять 10...20 % (приймаємо 10 %). Таким чином кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом з урахуванням втрат становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 122 / (1 - 0,1) = 135,6 \text{ л,}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 135,6$ л.

Приблизний геометричний об'єм ферментера при вибраному коефіцієнті заповнення ($K_{зап} = 0,55$) складе:

$$V_{гф} = V_{роб.1} / K_{зап} = 135,6 / 0,55 = 246,5 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф1} = 250$ л, та перевіряємо обраний коефіцієнт заповнення :

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф1} = 135,6 / 250 = 0,54, \text{ що не перевищує заданого}$$

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

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{а}) = 135,6 / (1 + 0,1) = 123,3 \text{ л,}$$

де $X_{а} = 0,1$ – частка, кількість посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 135,6 - 123,3 = 12,3 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву ферментера $V_{пм2} = 12,3$ л.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{ф}) = 12,3 / (1 - 0,1) = 13,7 \text{ л,}$$

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

Кількість поживного середовища в інокуляторі з поправкою на інокулят у

10%(Xф) буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1 + Xа) = 13,7/(1 + 0,1) = 12,5 \text{ л,}$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 13,7 - 12,5 = 1,2 \text{ л}$$

Вирощування посівного матеріалу проводять у колбах $V=750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб для одержання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм2}/(V_{колб} \times K_{зк}) = 1200/(750 \times 0,2) = 8 \text{ качалочних колб.}$$

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 250 л з коефіцієнтом заповнення 0,55 буде проходити в один етап, а саме вирощування продуцента у колбах на качалці (8 колб по 750 мл).

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування та перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Модифікація і деградація хітина в природі відбуваються завдяки різним хітинолітичним ферментам, широко представленим в живих організмах.

Важливе науково-практичне значення мають результати, присвячені використанню бактерії *C. meiyuanensis* SYBC-H1 для синтезу хітинази, яку використовують для утилізації хітиновмісних відходів, які утворюються після переробки ракоподібних. Заявлений штам синтезує високоактивну хітиназу — 13,6 од/мл. Даний мікроорганізм стійкий до антибіотиків.

Продуцентами хітинолітичних ферментів можуть бути гриби, бактерії, рекомбінантні мікроорганізми. Серед найпродуктивніших мікроорганізмів є: *C. meiyuanensis* SYBC-H1 [26], *Stenotrophomonas maltophilia* N4 [37], *Bacillus pumilus* MCB-7 [88].

З табл. 5.1 видно, що бактерія *S. maltophilia* N4 стійка до антибіотиків, але при коливанні температури культивування вона стає чутливою. Також *S. maltophilia* N4 має патогенний характер для людей з ослабленим імунітетом. Хітиназна активність ферменту 2,1 од/мл.

Бактерія *B. pumilus* MCB-7 синтезує позаклітинний фермент з активністю - 3,36 од/мл. Хітиназа проявляє антимікробні властивості щодо *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Ceratorhiza hydrophila* та *Fusarium oxysporum*.

Інша бактерія *C. meiyuanensis* SYBC-H1 є однією із найпродуктивніших продуцентів ферменту хітиназа. Хітинолітична активність склала 13,6. Бактерія росте на дешевому поживному середовищі.

НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кривець Т.Ю.			Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрівшів
Перевір.		Слободян О.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
						Кафедра БТМ		
						44		

Культивування пробіотичних штамів здійснювали в періодичних умовах на качалках при температурі 26° С.

Порівняльна характеристика продуцентів хітинази

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Активність ферменту, од/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> N4	КН ₂ РО ₄ - 3 К ₂ НРО ₄ - 3 MgSO ₄ - 0,5 NaCl - 2 FeCl ₃ - 0,005 соєвий пептон 2,5 дріжджовий екстракт 1,5 колоїдний хітин - 6	48	2,1	pH = 6.8 t = 28 °C 120 об/хв	Jankiewicz, U., & Brzezinska, M. S. Purification, characterization, and gene cloning of a chitinase from <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> N4. <i>Journal of Basic Microbiology</i> . 2015. 55(6), 709–717
<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBC-H1	Інулін -3,5 сечовина - 4 хітиновий порошок - 4 КН ₂ РО ₄ - 0,7, К ₂ НРО ₄ · 3Н ₂ О - 0,3, MgSO ₄ - 0,5	72	13,6	pH = 7 t = 26 °C 250 об/хв	Zhang, A., Gao, C., Chen, K., Wei, C., & Ouyang, P. Enhanced chitinase production by <i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBC-H1 using staged pH control. <i>The Journal of General and Applied Microbiology</i> , 2016. 62(3), 126–131.

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Активність ферменту, од/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Bacillus Pumilus</i> MCB-7	Колоїдний хітин - 10, пептон - 5, екстракту дріжджів - 5, KH ₂ PO ₄ - 1 MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,1	72	3,4	pH = 7 t = 37 °C 150 об/хв	Rishad, K. S., Rebello, S., Shabanamol, P. S., & Jisha, M. S. Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel <i>Bacillus Pumilus</i> MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. <i>Pesticide Biochemistry and Physiology</i> , 2017, 137, 36–41.

На наступному етапі на основі аналізу даних, наведених у *табл.5.1*, розраховуємо вартість поживних середовищ, використовуваних для вирощування найактивніших біологічних агентів (*табл.5.2*).

Таблиця 5.2

Порівняльна характеристика продуцентів хітиназ та ціни на компоненти поживного середовища

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації *
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> N4	КН ₂ РО ₄ — 3;	52	0,16	3.
	колоїдний хітин - 10	40	0,4	1.
	К ₂ НРО ₄ - 3;	78	0,23	4.
	МgSO ₄ - 0,5;	5,7	0,003	3.
	NaCl - 2;	14,2	0,03	3.
	FeCl ₃ - 0,005;	70	0,0004	5.
	соєвий пептон - 2,5;	30	0,1	1.
	дріжджовий екстракт 1,5;	1632	2,5	2.
	Вартість 1 л середовища — 3,4 грн			
<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBC-H1	Хітиновий порошок - 4	40	0,16	1.
	Інулін -3,5	270	0,95	3.
	КН ₂ РО ₄ - 0,7,	52	0,036	3.
	К ₂ НРО ₄ · 3Н ₂ О - 0,3,	1,5	0,005	1.
	МgSO ₄ - 0,5	5,7	0,003	3.
	сечовина - 4	8	0,032	4.
	Вартість 1 л середовища — 1,186 грн			
<i>Bacillus Pumilus</i> MCB-7	Колоїдний хітин - 10	40	0,4	1.
	пептон - 5,	720	3,6	3.
	екстракту дріжджів - 5,	1632	8,16	2.

	KH ₂ PO ₄ - 1	52	0,052	3.
	MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,1	65	0,007	3.
Вартість 1 л середовища — 12,22 грн				

Примітка.* - Ціна наведено станом на січень 2020 р.

1. <https://russian.alibaba.com>; 2. <http://agar.com.ua>, 3. <https://prom.ua>,
4. <https://flagma.ua>, 5. <https://kiev.flagma.ua>.

Аналізуючи дані, наведені в *табл.5.2*, можна засвідчити, що середовища для культивування *C. meiyuanensis SYBC-H1* (1,186 грн) є найдешевшим, а середовище для *B. Pumilus* МСВ-7 є дорожчим більше ніж в 10 раз (12,22 грн).

Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховували умовну вартість 1 мг ферменту (*табл.5.3*).

Таблиця 5.3

Умовна вартість ферменту синтезовану при культивуванні *Bacillus Pumilus* МСВ-7, *Stenotrophomonas maltophilia* N4, *Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1*

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Активність ферменту, од/мл	Умовна вартість 1 од активності цільового продукту, грн/од	Тривалість культивування, год	Активність ферменту за годину, од/год
<i>Bacillus Pumilus</i> МСВ-7	12,22	3,4	370x10 ⁻⁵	72	0,05
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> N4	3,4	2,1	162x10 ⁻⁵	48	0,04
<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1</i>	1,186	13,6	8,72x10 ⁻⁵	72	0,2

Узагальнивши всі дані, наведені в *табл.5.1*, *табл.5.2*, *табл.5.3*, можна зробити висновок, що умовна вартість 1 од ферменту за культивування *Bacillus Pumilus* МСВ-7 є майже в десятки раз дорожча (370x10⁻⁵ грн/од) за інші

мікроорганізми. Тому доцільніше використовувати для отримання ферменту хітинази бактерію *Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1*, так як умовна вартість одиниці цільового продукту є найнижчою ($8,72 \times 10^{-5}$ грн/од), отже, біосинтез в такому випадку є найбільш економічно вигідним.

5.2. Обґрунтування вибору технології культивування та типу ферментера

Кінцевим продуктом процесу біосинтезу є хітинолітичні ферменти, що використовуються для утилізації хітиновмісних відходів, які утворюються після переробки ракоподібних. Хітинази набувають все більшої уваги завдяки широкому спектру біотехнологічних застосувань, таких як поводження з відходами ракоподібних, генерація протопластів грибів, виробництво одноклітинного білка, виробництво N-ацетил-bD-глюкозаміну (GlcNAc) та його похідних, біоконтроль грибкових захворювань рослин [88].

Після завершення процесу біосинтезу в культуральній рідині окрім ферменту містяться ще продукти метаболізму, біомаса продуцента та залишки поживного середовища.

Варто враховувати, що процес біосинтезу може ускладнюватися нестабільністю (лабільністю) ферменту, який втрачає свою активність через ряд змін у навколишніх умовах.

Обов'язковим при культивуванні є дотримання триступеневої стратегії контролю рН. Відносно низький рН на ранній стадії бродіння є вигідним для росту клітин, тоді як вищий рН може підтримувати сильний ріст клітин та утворення хітинази на середній та пізніх стадіях. Тому необхідно використовувати поетапний контроль рН для досягнення максимального значення хітиназної активності.

Триступенева стратегія контролю рН:

- I ступінь, за якої рН підтримують на рівні 6,6 спочатку 12 год;
- II ступінь - рН збільшують до 7,8 і витримують при цьому значенні рН 12–48 год;

- III ступінь - рН підвищують до 8,4 і витримується так при цьому значення до кінця ферментації.

Отримання хітинази складається з наступних стадій:

1. Центрифугування культуральної рідини
2. Концентрування хітинази
3. Очищення ферменту

Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1 - високоефективна хітинолітична бактерія, яка виділена із ґрунту. Штам виявляв сильну хітинолітичну активність і представляв собою грамнегативну, вигнуту, паличкоподібну бактерію. Культивування *C. meiyuanensis* SYBC-H1 відбувалося в умовах глибинного культивування у періодичних умовах з використанням середовища: інуліну - 3,5, сечовина - 4, порошок хітина - 4, KH_2PO_4 - 0,7, K_2HPO_4 - $3\text{H}_2\text{O}$ - 0,3, MgSO_4 - 0,5 и рН 7,0. Процес культивування проводили на качалці в колбах на 500 мл за 250 об / хв при температурі 26 ° С [26].

Для того, щоб уникнути контамінації і полегшити процеси виробництва культивування проводять в періодичних умовах, в ферментері створюється надлишковий тиск. Асептичні умови забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, аераційного повітря [87,88].

Тип ферментера для культивування мікроорганізмів обирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища та економічних міркувань. Обраний продуцент (*C. meiyuanensis* SYBC-H1) являється облігатним аеробом, тому біореактор для його вирощування повинен бути оснащений системою подачі повітря (барботер). Також ферментер повинен бути оснащений пристроями для вимірювання і регулювання температури і особливо рН середовища, датчиками для вимірювання розчиненого кисню, а також пристроїв для подачі чистого кисню і вуглекислого газу. Повинні бути наявні резервуати та трубопроводи для зберігання компонентів живильного середовища, води, пару, повітря і насоси для їх безперервної подачі в ферментер [43].

Для встановлення та підтримки оптимальної для даного продуцента температури у ферментері необхідною є наявність електричного нагрівного елемента, теплової сорочки що складається з двох кожухів, а охолодження відбувається за допомогою водопровідної води [44].

У ферментері використовують турбінну мішалку, адже чим ближче до дна апарата встановлена мішалка, тим менша нижня циркуляційна зона.

Одним із головних вимог до ферментера є збереження стерильності в процесі культивування, тому він повинен бути герметичним. Стерилізація обладнання біореактора і трубопроводів здійснюється термічним шляхом “гострої” пари.

5.3. Обґрунтування стадій підготовки повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці ($H \sim 10$ м). Висота виробничої будівлі становить 5 м і для того, щоб запобігти потраплянню забруднюючих часточок в повітрязбірник, його необхідно розмістити на відстані 2 м від даху будівлі. Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри) та індивідуальних фільтрів (фільтрів високої ефективності). Індивідуальні фільтри встановлюють перед ферментером, посівним апаратом та інокулятором. Головні фільтри мають в своєму складі набивне волокно і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється приблизно 95% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Культивування *C. teiyuanensis* SYBC-N1 проводять на середовищі наступного складу г/л: інуліну - 3,5, сечовина - 4, порошок хітина - 4, K_2HPO_4 - 0,7, K_2HPO_4 - $3\text{H}_2\text{O}$ - 0,3, MgSO_4 — 0,5. Джерелом вуглецю виступає порошок хітину.

Розділяємо поживне середовище на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Порошок хітину, інулін, сечовина, (стерилізація 30 хв. при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ та тискові 0,15 МПа)

Композиція Б: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 — $3\text{H}_2\text{O}$ (стерилізація 40 хв. при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ та тискові 0,15 МПа).

Композиція В: MgSO_4 (стерилізація 40 хв. при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ та тискові 0,15 МПа).

5.5. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Кінцевим продуктом біосинтезу є фермент хітиназа, який використовується для утилізації хітиновмісних відходів, тому ступінь його очищення буде не висока.

По завершенню біосинтезу в культуральній рідині окрім цільового продукту містяться продукти метаболізму, залишки поживного середовища та біомаса продуцента. Для того, щоб одержати хітиназу з максимальною хітинолітичною активністю необхідно використовувати методи, які допоможуть зменшити втрати ферменту та його активності на стадіях виділення та очищення. Проведення цих стадій процесу обумовлено низкою труднощів пов'язаних по-перше з тим, що хітиназа є - лабільним ферментом, який може втрачати свої властивості під впливом найрізноманітніших факторів, а по-друге з втратою активності під впливом певних змін зовнішніх умов.

Виділення і очищення хітиази включає такі етапи:

1. Відділення біомаси *Chitinolyticbacter Meiyuanensis* SYBC-N1 від культуральної рідини.

2. Дезінтеграція клітин;

3. Віддокремлення частин клітин від ферменту (центрифугування);

4. Концентрування ферменту (ультрафільтрація);

5. Осадження ферменту;

6. Сушіння ферменту

7. Наповнення, маркування, пакування

Основними методами відділення біомаси бактерій *C. Meiyuanensis* SYBC-H1 від культуральної рідини є фільтрування, флотація та центрифугування.

Флотація — спосіб розділення сумішей твердих дрібних частинок, що належать різним речовинам, а також виділення крапель дисперсної фази з емульсій, заснований на їх різній змочуваності і здатності накопичуватися на поверхні розділу фаз [98]. Використання даного методу для відділення клітин продуцента (*C. Meiyuanensis* SYBC-H1) від культуральної рідини є недоцільним, тому що він призначений більше для згущення більших та важчих клітин дріждів та мікроміцетів. Також важливим недоліком даного методу є невисокий ступінь очищення ферменту.

Фільтрування - це процес проходження розчину чи суспензії через пористу перегородку (мембрану) за різницею тиску з обох боків мембрани, причому розмір профільтрованих часточок обмежується діаметром пор [99]. Проходження цього процесу на вакуум-фільтрах бактеріальних суспензій пов'язане з великими перешкодами, а саме малим розміром клітин, великої кількості домішок мікрочастинок та високою в'язкістю суспензій [100].

Хоча фільтрування є менш енергоємним процесом, але воно має ряд недоліків: проблеми в ретельному промиванні та осушуванні осаду; невелика площа фільтрування і значна вартість; віддаленість розподільної головки від поверхні фільтрування, через що відбувається затримка фільтрату і промивних вод в середині барабана, що ускладнює їх окреме виведення.

Найбільш доцільним у технології виробництва хітинази є використання метод *сепарування* - процес розділення змішаних об'ємів сумішей різної густини, емульсій, суспензій твердих часток або краплинок в газі. Рушійною силою є відцентрова сила. Незважаючи на певні недоліки: висока вартість, енергоємність та складна конструкція, даний метод має ряд переваг:

- безперервність процесу;
- висока продуктивність;

- високий ступінь очищення культуральної рідини від біомаси.

Сепарація можлива, якщо розчин має відмінності в характеристиках компонентів у суміші: розмірах або формі твердих частинок, їх масах, густині, коефіцієнтів тертя, міцності, пружності, змочуваності поверхні, магнітної сприйнятливості, електропровідності, радіоактивності [99].

Розміри бактерій *S. Meiyuanensis* SYBC-N1 0,5-2 x 0,5-0,9 мкм [102].

Враховуючи вище сказане, для відокремлення клітин бактерій *S. Meiyuanensis* SYBC-N1 від культуральної рідини будемо застосовувати повністю герметична система сепарації МВРХ 810Н. Даний апарат використовується для відділення зважених частинок (біомаси) з розмірами 0,5 - 500 мкм з рідини (культуральної рідини), що має більш низьку щільність. Вміст сухих речовин зазвичай знаходиться в діапазоні 0,1-20 %. Основними областями застосування даного апарату є сепарація бактерій, продуктів ДНК, ферментів, клітинних культур і вакцин [101].



Рис.5.1. Промисловий сепаратор МВРХ 810 [101]

Система МВРХ 810Н задовольняє різні галузеві стандарти:

- Сепаратор встановлюється на фіксованій рамі з трубопроводами для технологічних рідин і продуктів.
- Для підтримки гігієни використовуються кламповане з'єднання.

- Система управління з PLC і HMI, з можливістю підключення (через Profibus або Ethernet) до центральної системи управління.
- Можливість автоматичної мийки на місці (CIP).
- Автоматичне регулювання подачі розчину за допомогою магнітного витратоміра і регулюючого клапана.
- Доступна розширена документація, що підтверджує cGMP. Перед відправкою проводиться тестування FAT.

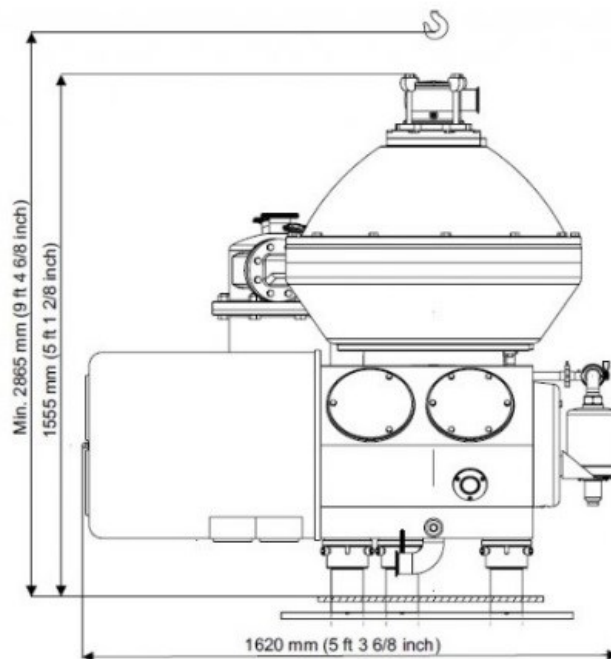


Рис.5.2. Промисловий сепаратор MVRX 810 [101]

Сепаратор MVRX 810Н має такі особливості:

1. Повністю герметична конструкція забезпечує мінімальне дотичне напруження, відсутність кисню, низьке енергоспоживання і низький рівень шуму.
2. Регульований обсяг вивантаження забезпечує вивантаження твердої фази з високим вмістом сухої речовини, зводячи втрати продукту до мінімуму.
3. Висока продуктивність за рахунок особливої конструкції ротора.

4. Оптимізований відповідно до системи СІР.
5. Всі контактуючі з продуктом поверхні і кільця ущільнювачів відповідають правилам FDA або правилами USP класу IV.
6. Регульована швидкість для полегшення оптимізації продуктивності.
7. Система охолодження, що включає охолоджувальну сорочку для корпусу ротора і ємності для збору твердої фази, а також осередок охолодження для ємності з мастилом.
8. Всі контактуючі з продуктом поверхні виготовлені з висококласної нержавіючої сталі.
9. Комплект для моніторингу з датчиками ротора, швидкості, вібрації і робочого тиску води [101].

Таблиця 5.4

Технічні показники сепаратора MBPX 810H

Показники	Значення
Максимальна пропускна здатність	600 л/год
Температура лінії середовища	0-100 ° C
Обсяг ротора	15 л
Швидкість ротора	6250 об./Хв.
Максимальне прискорення	8624 g
Встановлена потужність двигуна	15/18,5 кВт
Споживана потужність при продуктивності 600 л/год	12,5 кВт
Протока охолоджуючої води для ущільнення	120-160 л/год
Висота	1555 мм
Ротор	310 кг
Об'єм	4-5 м ³

Виробник даного сепаратора - компанія Bio Techno Group, яка знаходиться в Росії, місто Москва, вул.Дорожня, 60 б.

Основними сферами застосування апарату є сепарація бактерій, продуктів РДНК, ферментів, клітинних культур і вакцин. Сепаратор МВРХ 810Н також можливий для промислових процесів ферментації, де мікробні клітини застосовуються для виробництва кислот, хімікатів, палива і т.д [101].

Внутрішньоклітинний фермент хітиназу виділяють за допомогою руйнування (дезінтеграції) клітин. Для руйнування клітин застосовуються різні методи: механічні, фізичні, хімічні, біологічні й ензиматичні. Іноді для досягнення дезінтеграційного ефекту вдаються до сильних і надсильних впливів. Іноді застосування одного методу не дає бажаного результату. У такому разі клітини мікробів обробляють комплексно [103].

Фізичні способи дезінтеграції більш економічні, ніж хімічні і біолого-ферментативні, тому що для їх не використовуються дорогі реактиви і ферментні препарати. Але вони можуть негативно впливати на якість продукту. Перспективним для дезінтеграції мікроорганізмів-продуцентів вважається використання іммобілізованих ферментів [103].

Ферментативні методи гідролізу пептидогліканів клітинних стінок бактерій є більш м'якими у порівнянні із хімічними. Для руйнування пептидогліканів бактеріальних клітинних стінок доцільно використовувати мурамідази та протеази, здатні розщеплювати пептидні зв'язки в його структурі. У деяких роботах для ферментативної деструкції бактерій використовують лізоцим, що володіє мурамідазною активністю, кислі та лужні травні протеази самотійно, або у їхній комбінації з фізичними методами впливу [104].

Враховуючи, що послідовність амінокислот у складі пептидогліканів клітинних стінок бактерій є досить специфічною, доцільним є вивчення їх деструкції із залученням протеаз рослинного походження, які мають більш

широкий спектр субстратної специфічності, порівняно з травними протеазами [104]. Серед небажаних процесів, що можуть відбуватися після дезінтеграції клітин, – протеоліз власними клітинними протеазами цільового ферменту. Цей процес може відбуватися навіть при підтриманні низької температури, особливо при очищенні ферменту, оскільки після видалення супутніх білків фермент стає єдиним субстратом протеази. Інактивацію протеаз здійснюють обробкою клітинного екстракту специфічними інгібіторами-комплексонами (ЕДТА, о-фенантролін, оксихінолін), солями ртуті або срібла [99].

Для фізичної дезінтеграції ферменту хітиназа спочатку біомасу бактерій *S. Meiyuanensis* SYBC-H1 піддаємо обробці ультразвуком для чого використовуємо ультразвукову ванну TUS-180ST з робочою частотою 25, 35 та 40 кГц, тривалість обробки варіюється, після ультразвукової обробки, здійснюємо обробку папаїном [104].

Наступним після дезінтеграції є етап відокремлення фрагментів клітинних стінок. Використовуються для цього методи – фільтрування, центрифугування, відстоювання, флотацію тощо.

Під час відділення ферменту (хітинази) на фільтр-преси виникає ряд ускладнень: накопичення осаду, що знижує швидкість проходження процесу; низький ступінь механізації (вивантаження осаду відбувається вручну) - це не дозволяє забезпечити дотримання санітарно-гігієнічних вимог; клітини продуцента мають малі розміри, а сама суспензія має досить високу в'язкість та велику кількість домішок різного розміру. Для того щоб покращити фільтрування суспензію необхідно попередньо обробляти щоб відбулась коагуляція клітин в результаті якої відбувається утворення пластівців, які будуть легше фільтруватись. Але при виділенні хітинази використовувати коагуляцію недоцільно, тому що це буде негативно впливати на активність та якість ферменту.

Флотація — це метод, який найчастіше використовується при виробництві кормових дріжджів. Недоліками цього методу є: невисокий ступінь очищення ферменту; згущення більших та важчих клітин дріжджів та мікроміцетів.

Саме тому при виділенні хітинази найбільш доцільним буде використання методу центрифугування. Не зважаючи на те, що даний метод є дороговартісним, але він має ряд суттєвих переваг:

1. вища швидкість розділення; більша рушійна сила;
2. вища ефективність розділення.

Найбільш досконалими по конструкції вважаються центрифуги зі шнековим вивантаженням осаду[100].

Шнекова центрифуга ОГШ-631К-06 застосовується на міських і локальних промислових очисних спорудах для зневоднення осаду стічних вод, також у хімічній промисловості для розділення різних суспензій [105].



Рис.5.3. Шнекова центрифуга ОГШ-631К-06 [105]

Технічні показники центрифуги ОГШ-631К-06 [105]

№	Показники	Значення
1.	Матеріал ротора	сталь 12Х18Н10Т
2.	Діаметр ротора внутрішній, мм	630
3.	Частота обертання ротора, с (об/хв), макс	2665
4.	Радіус зливу, мм, (змінний)	205; 210; 220
5.	Потужність двигуна, кВт	75
7.	Кількість віброізоляторів, шт.	12
8.	Вертикальна динамічне навантаження на будівельну конструкцію, Н, не більше:	480

У біотехнології найчастіше для концентрування використовують: вакуум-випарювання або ультрафільтрація.

Вакуум-випарювання проводять при нейтральних значеннях рН розчину. При значеннях рН розчину менше 4,5 і більше 8,2 активність ферментів розпочинає знижуватися вже при нагріванні розчину вище 35°C. При рН = 6 цей же ефект спостерігається при температурі вище 50°C.

Переваги:

- простоту,
- швидкість,
- ефективність та легкість випарювання органічного розчинника.

Проте при використанні методу вакуум-випарювання знижується температура кипіння розчину, що дозволяє швидко проводити видалення вологи з розчинів термолабільних речовин. Великого поширення в промисловості займають випарні апарати, які нагріваються водяною парою, оскільки водяній парі властива висока питома теплота конденсації та високий коефіцієнт тепловіддачі [100].

Втрата активності ферменту хітиназа в такому процесі може досягати 5-20%, тому використання даного методу є неефективним.

Метод *ультрафільтрація* – це метод фільтрування через мембрани з розміром пор 0,1 мкм. Цей спосіб має ряд переваг, тому що проводиться в "м'яких" умовах, а саме це забезпечує менший відсоток зниження активності хітинази. На практиці процес ультрафільтрації проводять в циркуляційних апаратах періодичної дії. У ході проведення процесу ультрафільтрації в залежності від властивостей одержуваного ферменту розчин постійно охолоджується до температури 4–15 °С.

Серед недоліків є: забивання пор мембрани осадами або адсорбованими молекулами, що призводить до зниження продуктивності мембранного апарату в часі. Останнє вимагає періодичного проведення промивки матеріалу мембрани. Для того щоб запобігти забиванню пор мембрани осадами передбачено використовувати циркуляційний насос, що забезпечує лінійну швидкість потоку рідини через мембрану близько 2–5 м/с. При таких швидкостях спостерігається значний гідравлічний опір. Для його зниження на практиці застосовують дві конструкції мембранних апаратів: трубчасті мембранні апарати і проточні з плоскими мембранними елементами, що встановлюються паралельно основному потоку.

Ще одним недоліком ультрафільтрації є низька швидкість процесу. Цей недолік може бути частково усунений при застосуванні анізотропної мембрани, яка складається з тонкого непористого гелевого шару, який нанесено на мікропористу підкладку товщиною 0,1...1 мкм. Сьогодні для ультрафільтрування і зворотного осмосу використовують поки тільки мікропористі анізотропні та ізотропні – мембрани.

Проте за допомогою ультрафільтрації вдається одночасно проводити процеси концентрування і очищення ферменту хітиназа. Крім того, здійснюване концентрування супроводжується очищенням від баластних низькомолекулярних домішок і збільшенням активності ферменту в 100 – 150 разів.

Зважаючи на ряд переваг, для концентрування хітинази обираємо метод

ультрафільтрації. Для даного процесу обираємо ультрафільтраційну пілотну систему MF-801.



Рис.5.4 Ультрафільтраційна система MF-801 [106]

Ультрафільтраційна система за рахунок великої поверхні мембран і міцної структури матеріалу (поліетилсульфон, полівінілідендіфторид) забезпечує поділ розчинів без втрат і відділення чистого фільтрату від суспензій [106].

Переваги:

- багатofункціональність – один пристрій для концентрування, обміну буфера і видалення низькомолекулярних домішок (солей, праймерів, незв'язаних міток);
- швидкість – встановлена вертикально мембрана мінімізує забруднення і забезпечує високу швидкість концентрування

Таблиця 5.6

Типи мембран для ультрафільтраційної системи

Тип мембрани	Поріг відсікання, кДа	Застосування
ХТ	1	Видалення фарбників, концентрування антибіотиків, білків та поліпептидів

VT	3	Концентрування антибіотиків, білків та поліпептидів
MT	5	Концентрування сироваткових білків і виробничих ізолятів, концентрування ферментів
ST	10	Концентрування ферментів
MK	30	Концентрування молока
BN	50	Очистка росолів (виробництво сирів)
FR	800	Знежирювання
V6	500	Електростатичне фарбування

Система ультрафільтрації УФ-801 повинна бути оснащена мембраною типу ST, тому що вона задовольняє процес виробництва: з порогом відсікання 50 кДа; дозволяє відокремлювати низькомолекулярні речовини, що не є потрібними для подальшого виробництва.

Переважає більшість промислово важливих ферментів є водорозчинними білками. Розчинність білка визначається розподілом гідрофобних і гідрофільних залишків на поверхні молекули. Змінюючи деякі властивості білкових розчинів (температуру, іонну силу, рН, додавання нейтральних солей, водорозчинних органічних сполук або інших інертних речовин), можна вплинути на гідратний або сольватний шар і викликати агрегацію білкових молекул і випадання їх в осад [99].

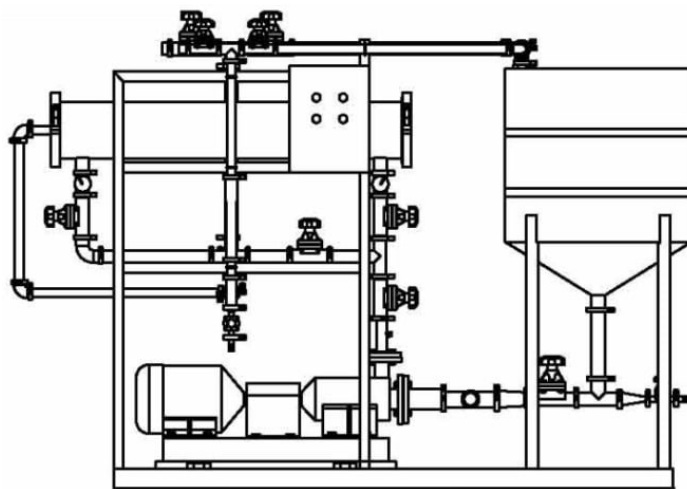


Рис. 5.5. Система ультрафільтрації УФ-801 [106]

Осадження ферментів органічними розчинниками. Ефект процесу осадження білків пов'язаний з тим, що при наявності органічного розчинника знижується активність води. Молекули води, розміщені на гідрофобних ділянках поверхні ферменту (білка), заміщуються на молекули органічного розчинника. При цьому розчинність білків знижується та відбувається агрегування і осадження білкових молекул [99].

Органічний розчинник, який використовують для осадження, повинен повністю змішуватися з водою і не зв'язуватися з ферментом. Найбільш широко для осадження ферментів використовуються:

1. *Етиловий спирт.* Недоліки: велика витрата етилового спирту, необхідність його ректифікації та низький вихід ергостерину;
2. Вилучення за допомогою *петролейного ефіру.* Недоліком є застосування цього методу тільки в лабораторних умовах через високу вартість ефіру (62 грн/кг);
3. Екстракція дихлоретаном або бензолом. Недоліком цього методу є токсичність реагентів;
4. Ізопропіловий спирт [100].

Найбільш перспективним вважається осадження ферментів *ізопропанолом* при його концентрації (52 –53%). Розчини деяких іонів може мати стабілізуючу дію на фермент [99].

Проте даний спосіб має важливий недолік – не всі ферменти витримують обробку спиртом або ацетоном. При осадженні органічними розчинниками вони денатуруються і в результаті втрачають свою активність. Щоб уникнути процесів денатурація і інактивація ферментів при осадженні їх з розчину органічними розчинниками, потрібно цю дію проводити при низькій температурі, близької до температури замерзання суміші даного розчинника з водою.

Осадження ферментів за допомогою *вибіркової денатурації.* Цей спосіб виділення підходить лише для стабільних ферментів, які зберігають стійкість за

екстремальних умов. Наприклад, глюкозоізомерази, яка витримує температуру до 90-95°C. Суть цього методу полягає в тому, що за екстремальних значень рН відбувається денатурація нецільових білків, а цільовий фермент залишається в розчині [107].

Дуже поширеним методом для очищення ферментів є *висолювання*. Цей процес в основному залежить від ступеня гідрофобності білкової молекули. На гідрофобних ділянках молекули білка при контакті з водою відбувається утворення шару, що складається з орієнтованих молекул води. При іммобілізації води молекулами небілкової природи вони починають взаємодіяти і відбувається їхня агрегація. Відомо, що іони солей гідратуються, і при додаванні значної кількості солі відбувається зв'язування води, при цьому білок частково звільняється від води і створюються умови для агрегації білкових молекул [99].

При осадженні ферментів із складної суміші різноманітних білків має місце явище соосадження. Проте при висолюванні можна досягти не лише осадження всього комплексу ферментів, але і його фракціонування. Для висолювання в основному використовуються нейтральні солі лужних металів. Висолюючий ефект різних іонів залежить від їх іонної сили. Для висолювання можуть бути використані сульфат амонію, сульфат натрію, сульфат цинку і хлористий натрій. Найчастіше використовують сульфат амонію, рідше - хлористий натрій [99].

Висолювання зазвичай проводиться за допомогою сірчанокислового амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, що додається до досліджуваного розчину в зростаючих кількостях. Розчин спочатку насичують сірчанокислим амонієм, припустимо, до 20% від повного насичення. Після цього випадає певна частина білків і ферментів, а осад відокремлюють в центрифугі. Для подальшого очищення ферментів використовуються різні види хроматографії: адсорбційна, іонообмінна, афінна, розподільна.

При *адсорбційній* хроматографії розділення засноване на різній адсорбованості компонентів аналізованої суміші на адсорбенті. Ці властивості в основному визначаються молекулярною структурою з'єднань. Речовина з вищим коефіцієнтом розподілу пересувається по поверхні адсорбенту з більшою швидкістю. Розділення цим методом проводиться в результаті взаємодії речовини з такими адсорбентами як: силікагель, сефадекс, оксид алюмінію. Вони мають на своїй поверхні певні активні центри [108].

Недоліками адсорбційної хроматографії є розклад чутливих до каталізу сполук, та їх незворотна сорбція.

Розподільна хроматографія заснована на фракційному розділенні суміші, компоненти якої мають різні коефіцієнти розподілу між двома розчинниками, що не змішуються. Як носій, переважно застосовують силікагель, рідше крохмаль, клітковину, тому що вони володіють невеликою адсорбцією до багатьох речовин [109]. Розподільна хроматографія проводиться на колонках (газорідинна і колоночна хроматографія) чи на спеціальному хроматографічному папері (розподільна хроматографія на папері) [96]. Недоліком даного методу є те, що при висхідному варіанті проявлення відбувається дуже довго, до місяця й більше без помітного розмивання плям, а при низхідному варіанті проявлення хроматограми відбувається швидко (кілька годин).

Метод афінної хроматографії заснований на тому, що в якості сорбенту застосовують нерозчинний ліганд ферменту (субстрат, інгібітор, кофактор і ін.), Тобто сорбція проводиться за рахунок специфічних сил спорідненості, що лежать в основі біологічної функції ферменту. Застосування сорбентів на основі цих лігандів дозволяє в порівнянні зі звичайними типами сорбентів: іонообмінні смоли. Метод афінної хроматографії може бути застосований також для фракціонування продуктів хімічної модифікації ферментів і для вивчення фізико-хімічних властивостей фермент-лігандних комплексів [110]. Недоліком

даного методу є: складність у знаходженні ліганду, який би міг впізнати потрібний фермент і зняти його з сорбенту.

В основі *іонообмінної* хроматографії лежить зворотний стехіометричний обмін іонів, що містяться у хроматографічному розчині, на рухомі іони, які входять до складу речовин, що називаються іонітами, або іонообмінниками. Вибір іонообмінного сорбенту (іоніту) для очищення білків в значній мірі залежить від ізоелектричної точки білка – pI [111]. Іонообмінна хроматографія, що є різновидом рідинної хроматографії, заснована на еквівалентному обміні іонів розчину на іони твердої фази.

Переваги методу:

- висока ефективність очищення;
- автоматизація процесу;
- можливість поєднуватися з іншими фізико-хімічними методами;
- можливість проведення якісного та кількісного аналізу.

Найпоширенішими адсорбентами білків є різні іонообмінними: гелі фосфату кальцію, гелі гідроксиду алюмінію і різноманітні афінні адсорбенти.

В іонообмінниках білки зв'язуються за допомогою електростатичних сил, що виникають між зарядженими поверхнями білків і щільними кластерами заряджених груп самого іонообмінника. Після адсорбції потрібного білка на колонці здійснюється його елюція.

Недоліки першого метода - при недостатньо високій буферній місткості різка зміна рН в процесі елюції приводить до поганого розділення суміші білків і інших речовин. Для елюції ферментів другим методом достатньо широко використовують сольові градієнти, звичайно хлориди калію або натрію. У присутності іонів солі сила притягіння між вільним білком і адсорбентом послаблюється і білки починають рухатися до виходу з колонки [99].

За допомогою *гель-фільтрації*, або хроматографії на молекулярних ситах, можна розділяти речовини з різними молекулярними масами. При цьому

випадку насадка колонки складається з частинок гелю з певним діаметром пор. Якщо розмір молекул більший від діаметра пор, то вони не можуть дифундувати в гель і швидко проходять через колонку, тоді як молекули меншого розміру проникають у гель і тому рухаються повільніше [114].

Технологія проведення хроматографії

Білкові фракції, які наносимо на колонку (2,5×40 см) з аніонообмінником TSK DEAE 650 (M) (“Toyosoda”, Японія). Елюцію проводимо тим же буфером в градієнті хлориду натрію від 0 до 1М.

Встановлення молекулярної маси очищеної хітинази в нативних умовах проводимо гель-фільтрацією на колонці (1,5×25 см) з Sepharose 6B (“Pharmacia”, Швеція), врівноваженій 0,01М Трис-НСl буфером (рН 7,5). На колонку наносимо 1 мл розчину ферменту. Елюцію проводимо тим же буфером, швидкість елюції складала 0,3 мл/хв.

Для розрахунку молекулярної маси будували калібрувальну криву, використовуючи білки-маркери (“Pharmacia”, Швеція): бичачий сироватковий альбумін (67,0 кДа), пероксидаза (44,2 кДа), протеїназа К (28,9 кДа), трипсин (24,0 кДа), лізоцим (14,5 кДа) [112].

Для проведення іонообмінної хроматографії використовуватимемо автоматизовану хроматографічну система Prochrom Varicol® Multicolumn.



Рис.5.6. Хроматографічна система Prochrom Varicol® Multicolumn [113]

Опис:

- Оптимальна конструкція забезпечує безперервну роботу 24/7 завдяки ретельному відбору і тестування надійних і перевірених компонентів;
- Високоєфективні системи градієнтного і ступеневого елюювання, що відповідають вимогам PAT (керівництво по технологіям аналізу процесів FDA), а також інтелектуальне програмне забезпечення для збору фракцій;
- Висока ефективність і вихід продукту завдяки чудовій відтворюваності технологічного процесу;
- Надійність вимірювальних приладів і "відкрита конструкція" (забезпечує легкий доступ до частин) для скорочення витрат на обслуговування, і таким чином, зниження експлуатаційних витрат;
- Перевірене і інтуїтивно зрозуміле програмне забезпечення для більш простого запуску, навчання та кваліфікації на місці [113].

У багатоколонній безперервній хроматографії одна довга колона замінена послідовно встановленими 4-6 коротшими колонами, оптимізуючи тим самим використання нерухомої фази. У них відбувається збір тільки чистих фракцій; залишилися змішані фракції повторно циркулюють через колони.



Рис.5.7. Хроматографічна система Prochrom Varicol® Multicolumn [113]

5.6. Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту (упаковки)

Сушіння ферментних препаратів має за мету отримати стабільні для

зберігання ферменті препарати. Тому в якості товарної форми випуску найкраще підходить ліофільно висушений фермент. В такому стані він зберігається тривалий час без зміни свої властивостей та активності.

Для зневоднення ферментних розчинів і осадів використовують вакуум-сушильні шафи, розпилювальні та сублімаційні установки. При висушуванні ферментмісних матеріалів виникають ряд труднощів, пов'язаних з високою термолабільністю ферментів [117].

У вакуум-сушильних шафах висушування проходить в тонкому шарі при температурі близько 30 °С і осматичному тиску близько 136 Па. Тривалість сушіння залежить від кінцевого тиску в камерах, товщині слою, структурі висушеного осаду, температури теплоносія. Недоліком методу є: значні втрати ферменту; часто висушений препарат потрібно досушувати, що збільшує втрати [117].

Сублімаційна сушка. Цей процес для ферментних препаратів проводять при глибокому вакуумі. Матеріал на початку сушки віддає частину вологи, охолоджується і самозаморожується. Потім в сушку подається теплота, лід випаровується минаючи стадію рідини. Зазвичай процес сублімаційної сушки починається із заморожування поверхні продукту при температурі мінус 20 — мінус 30 °С. Швидкість заморожування термолабільних матеріалів суттєво впливає на активність ферментів [117].

Сублімаційне (ліофільне) сушіння використовують для зневоднення живих мікроорганізмів, деяких видів ферментів та інших термолабільних продуктів. Принцип дії ґрунтується на випаровуванні води із замороженого стану, оминаючи рідкий агрегатний стан. Підведення тепла до матеріалу, що сушиться, здійснюють контактом порівняно теплою поверхнею або радіаційним шляхом. Більшу частину часу сушіння матеріал знаходиться при температурі -15...-30°. Оскільки процес ведуть при дуже низьких тисках (15...150 Па), то на матеріал не діє не тільки тепло, але й кисень повітря.

У фазі самозаморожування виділяється 10-15% вологи продукту. Це

підвищує економічність сублімаційного сушіння. Вимерзає волога швидко і рівномірно, кристали льоду виходять невеликих розмірів і не викликають істотних руйнувань тканин.

Сублімаційні сушки бувають періодичної та безперервної дії. В останні роки все більшої уваги викликають сублімаційні сушки безперервної дії.

Процес висушування ферментних осадів в сушаарці включає три стадії:

1. Заморожування осаду;
2. випарювання льоду;
3. видалення залишкової вологи.

Тривалість сублімаційної сушки залежить від температури, товщини слою замороженого матеріалу, розрідження в камері, температури теплоносія та фізико-хімічних властивостей слоїв висушеного матеріалу [117].

Для виробництва ліофільно висушеної хітинази будемо використовувати пілотну ліофільну сушку LP20R. Пілотна ліофільна сушарка з можливістю задавати індивідуальну програму сушіння в автоматичному режимі. Відображення всіх функцій кожної системи на дисплеї в кольорі і в реальному часі. Сушарка має 6 полиць загальною площею 1 м².



Рис.5.8. Пілотна ліофільна сушка LP20R. [115]

Пілотна ліофільна (сублімаційна) сушка LP20R, призначена для монтажу в чистих приміщеннях при виробництві фармацевтичних і ветеринарних

лікарських препаратів.

Програмована ліофільна сушарка, обсяг конденсора 20 л

- Габарити 1700×1138×1905 мм;
- Корисні полки 5шт. + 1 рухома полка, нержавіюча сталь 304;
- Розміри полиць 400×500×17.5 мм;
- Точність підтримки температури на полицях ± 1 ° С, а температурний інтервал полиць від -40 ° С до + 75 ° С;
- 5 лотків із сталі 304 розмірами 400×500×40 мм;
- Температура конденсора нижче ніж -75°C;
- 2 компресора × по 3 к.с. кожен, в каскадному режимі;
- Система моніторингу і контролю за допомогою контролера з сенсорним монітором та автоматичний нагрів з контролем вакууму і сушки;

Ліофільно висушений фермент будемо пакувати в поліетиленові герметичні пакети по 1 кг. Фасування здійснюватимемо за допомогою пакувальної машини ZVF-200. Ця машина складається з апарату для наповнення шнека, однієї вертикальної пакувальної машини, одного розточувального елеватора, одного конвеєра, одного повітряного компресора та однієї платформи.

Цей апарат особливо підходить для дозування та упаковки порошкових виробів. За допомогою нього можна проводити дозування порошку, виготовлення пакетів, упаковку, герметизація, друк серії і номера партії, назви та виробника. Апарат обладнаний перемикачем високого рівня та статичним витяжним пристроєм та пиłosосом, що ефективно задовольняє повну автоматизацію процесу упаковки порошкоподібної хітинази [116]. Дозування: 100 г; швидкість наповнення: до 5 шт/хв, ширина плівки катушки: 420 мм, товщина плівки: 0,04-0,12 мм;

Основні характеристики пакувальної машини ZVF-200

1. Оснащений захистом безпеки, що відповідає вимогам управління

- безпекою фірми; високоточним датчиком температури для точного контролю температури.
2. Обладнаний PLC Servo System та пневматичну систему керування та сенсорним екран, який дозволяє керування приводом, максимізувати точність, надійність і інтегрований рівень контролю всієї машини;
 3. Ця машина завершує процедуру упаковки вимірювання, завантаження матеріалів, упаковки поліетиленових пакетів, друкування дат,



Рис.5.9. Пакувальна машина ZVF-200 [116]

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена у табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт, виробничого біосинтезу хітиназу та післяферментаційних робіт

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування робочого розчину Біомою	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20 — 200 об/хв), сталь н/ж . Виробник: «Промвіт» (Україна) ¹
P-2	Реактор-змішувач для приготування робочого розчину Стеріоксу	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (15-250 об/хв), нержавіюча сталь марки 316L. Виробник: “Біотехно” (Росія) ²
Д – 4 , Д – 15, Д – 25, Д – 28, Д – 50, Д – 3, Д – 22	Об'ємно ваговий дозатор		Дозатор виробництва НВП "Техноаги" призначений для дозування сипких та рідких продуктів. Точність зважування становить 0,1%

					НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 6. Специфікація обладнання			Літ.	Арк.	Акрівшів
Розроб.		<i>Кривець Т.Ю.</i>								
Перевір.		<i>Слободян О.П.</i>								
Реценз.										
Н. Контр.										
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>			Кафедра БТМ75					

Продовження табл. 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-5 ПЗ-29	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник марки - А1И 020.000-01, Виробник: ООО «НПЦ Вектор-Кондвент». Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних домішок
Ф-6	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр ФВП-56-48-G4. Фільтруючий матеріал – поліестерове волокно, швидкість фільтрування – 2 м/с, E = 75 %. Виробник: «General filter» (Італія). ²
К-7	Компресор	1	Винтовой компрессор Atlas Copco GX7 10FF/400B 3ф 50Гц, потужність 14 л/с, робочий тиск 1 МПа (Швеція) ⁵
Т-8	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Systemair PGK. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ⁶

Продовження табл. 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Р-9	Ресивер	1	Ресивер вертикальний РВ 230/10, об'єм 230 л, робочий тиск 1 МПа, виробник - Бежецький завод АСО (Росія). ⁷
Т-10	Телообмінник нагрівач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. 70 Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ¹
Ф-11	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр Airpol. Фільтруючий матеріал – нержавіюча стальна сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁸
Ф-12 Ф-18	Індивідуальний фільтр очистки повітря	2	Фільтри (Р) –SRF N. Фільтруючий матеріал – фторопласт, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 99,9999 %. Виробник: «Donaldson» (США). ⁸
Н-13 Н-19 Н-21 Н-24 Н-27 Н-40 Н-41 Н-43 Н-45 Н-47 Н-49 Н-52 Н-54 Н-57 Н-60	Насос	15	Герметичні насоси серії FMB. Відцентрові герметичні насоси з магнітним приводом. Продуктивність - від 15 до 70 л/хв. ¹

Продовження табл. 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Н – 38	Насос шестиренчатий	1	Шестиренчатий насос, пропускна здатність-82л/хв, максимальний тиск 250 бар, вага-15 кг. Виробник: "Автогидравлика" (Україна)
Р-14	Реактор-змішувач	1	Реактор -змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20 1000 об/хв). Виробник: «Промвіт» (Україна) ⁸
Ф-16	Ферментер (інокулятор)	1	Біореактор об'ємом 20 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20 - 1000 об/хв). Виробник: «САРТОКАРАТ». (Росія) ⁵
Ф-17	Ферментер	1	Біореактор на 250 л, оснащений лопатевою мішалкою. Виробник: завод "ЮВС" ⁶
Р-20	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (15-250 об/хв), нержавіюча сталь марки 316L. Виробник: "Біотехно" (Росія) ⁹
Р-23	Реактор-змішувач для приготування солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (5-150 об/хв), сталь н/ж 316h AISI. Виробник " Віо ВLU (Україна)" ⁷
Р-26	Реактор-змішувач для приготування MgSO ₄	1	Реактор -змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20 1000 об/хв). Виробник: «Промвіт» (Україна) ⁸

Продовження табл. 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Ф-30	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр CFM. Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволка, швидкість фільтрування – 2 м/с, E = 75 %. Виробник: «General filter» (Італія). ¹
В-31	Вентилятор	1	З нержавіюча сталь марки 316L
Ф-32	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Фільтр (P) –GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча стальна сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). ²
Т-33	Теплообмінник-холоджувач	1	Охолоджувач повітря Systemair PGK. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ³
Т-34	Телообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція). ³
Ф-35	Високоєфективний	1	Фільтри (P) –SRF N. фільтр Фільтруючий матеріал – фторопласт, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 99,9999 %. Виробник: «Donaldson» (США) ²

Продовження табл. 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
П-36	Парогенератор	1	Парогенератор Титан-150. Температура насиченої пари: 105-165°C, споживана потужність: 53 кВт Виробник: “Ростзип” (Росія) ⁴
З-37	Збірник культуральної рідини	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20 — 200 об/хв), сталь н/ж . Виробник: «Промвіт» (Україна) ⁵
С-39	Герметична система сепарації	1	Герметична система сепарації МВРХ 810Н. Геометрична місткість 15 л. Протока min / max: 600 л/год. Виробник: “Віо Techno Group” (Росія) ⁷
УВ-40	Ультразвукова ванна	1	Ультразвукова ванна TUS-180ST. Геометрична місткість 53 л. Частота очистки 25, 35, 40 кГц. Матеріал : нержавіюча сталь SS304. Виробник: ”Титан Техникс “ (Україна) ⁸
З-42	Збірник-змішувач	1	Збірник змішувач з робочим об'ємом 50 л. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: “ Віо Techno Group” (Росія) ⁷
Ц-44	Шнекова центрифуга	1	Шнекова центрифуга ОГШ-631К-06. Матеріал: сталь 12Х18Н10Т. Виробник: Сумське НПО ім. М.В.Фрунзе, ПАО, (Україна) ⁹

Продовження табл. 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
УФ-46	Ультрафільтраційна система	1	Ультрафільтраційна пілотна система MF-801. Тип мембрани ST (для концентрування ферментів). Поріг відсікання 50 кДа; m=380 кг; Розмір: 2100*850*1790. Матеріал – нержавіюча сталь 316L. Виробник: “Віо Техно Груп” (Росія) ⁷
З-48	Збірник для концентрату	1	Реактор -змішувач об'ємом 20 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20 - 1000 об/хв). Виробник: «Промвіт» (Україна) ⁵
Ц-51	Фільтруюча центрифуга	1	Центрифуга Rousselet Robatel RC50. Помір барабана: 500*320мм, швидкість барабана регулюється від 225-5000 об/хв.; фільтруюча площа 0,5 м ² ; V=34 л. Виробник: “Віо Техно Груп” (Росія) ⁷⁷
З-53	Збірник для розчинення ферментного комплексу	1	Реактор -змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20 - 1000 об/хв). Виробник: «Промвіт» (Україна) ⁵
ІХ-55	Іонообмінна хроматографічна колонка	1	Хроматографічну система Prochrom Varicol® Multicolumn. Виробник: “Віо Техно Груп” (Росія) ⁷

Закінчення табл. 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
З-56	Збірник для очищеного ферментного комплексу	1	Реактор -змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20 - 1000 об/хв). Виробник: «Промвіт» (Україна) ⁵
Л-58	Ліофільна сушка	1	Пілотна ліофільна сушка LP20R має 6 полиць. Розміром 400×500×17.5 мм. Відстань між полицями 60 мм. Температурний інтервал полиць від -40 ° С до + 75 ° С. Виробник: “ Біо Techno Group” (Росія) ⁷
П-59	Пакувальна машина	1	Пакувальна машина ZVF-200. Швидкість: до 5 шт/хв. Виробник: “ІАРАСК” (Китай) ¹¹

Примітка: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел:

1. www.debem.com.ua (Насоси, «Debem»),
2. <http://www.air-filter.com.ua> («General filter», фільтри для повітря);
3. <http://www.emea.donaldson.com> («Donaldson» фільтри для повітря),
4. <http://www.ventmagazin.ru> , <http://www.dalgakiran.com.ua> («Далгакиран компресор Україна», обладнання для підготовки повітря),
5. <http://sartorius.com.ua> («САРТОКАРАТ», інокулятор)
6. <http://www.uvsrom.ru> (завод “ЮВС”, ферментер)
7. http://www.alsi.ua/index.php?page=menu_new_brunswick&id=626 (Биореактор BioBLU);
8. <http://promvit.com.ua> («Промвіт», ємінісне обладнання)

9. <https://biotechno.ru> (Біотехно)
10. <http://www.air-filter.com.ua> («General filter», фільтри для повітря);
11. <http://www.emea.donaldson.com> («Donaldson» фільтри для повітря);
12. <http://www.ventmagazin.ru> , <http://www.dalgakiran.com.ua> («Далгакиран компрессор Украина», обладнання для підготовки повітря),
13. http://rostzip.ru/?utm_source (“ Ростзип” парогенератор для підготовки повітря);
14. <http://promvit.com.ua> («Промвіт», ємінісне обладнання);
15. www.debem.com.ua (Насоси, «Debem»),
16. <https://biotechno.ru/catalog/filtruyushchie-tsentrifugi/universalnayafiltruyushchaya-tsentrifuga-rousselet-robotel-rc40/>(«BioTechnoGroup» сепаратор);
17. <https://titan-ultrasonic.com.ua> («Титан Техникс», ультразвукова ванна);
18. <http://www.oborud.info> (__Сумське НПО ім. М.В.Фрунзе, шнекова центрифуга);
19. <http://phct.ru/> («Agilent Technologies», гель-фільтруюча хроматографічна колонка);
20. <https://uk.rmapack.com> («ІАРАСК», пакувальна машина)

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виробництва хітинази включає допоміжні роботи (підготування мийних засобів, підготовка вентиляційного та аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (вирощування інокуляту в колбах на качалках, інокуляторі та ферментері; виробничого біосинтезу; відділення біомаси сепаратором; дезінтеграція клітин; ультрафільтрація ферментного комплексу; осадження ферментного комплексу сульфатом амонію; центрифугування осадженого ферментного комплексу, очищення ферменту хітиназа за допомогою іонообмінної хроматографії; ліофільне сушіння та пакування ферменту хітинази).

Проведення допоміжних робіт (ДР):

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва проводиться за вимогами нормативних документів, в яких описані всі правила виробництва та контроль якості продукції.

ДР 1.1 Підготовка персоналу

При влаштуванні на роботу та щорічно персонал, який безпосередньо зайнятий у виробництві мікробіологічних препаратів, повинен пройти медичний огляд, пройти систематичне навчання щодо санітарно-гігієнічних вимог, а також дотримуватися правил особистої гігієни.

Кожен працівників виробничого цеху повинен бути забезпечений щонайменше 3 комплектами санітарного огляду, заміна одягу проводиться щоденно і у міру забруднення. Працівники перед початком роботи повинні одягти чистий санітарний одяг, підібрати волосся під хустинку або ковпак,

НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Кривець Т.Ю.</i>			Розділ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрівшів
Перевір.		<i>Слободян О.П.</i>						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						
						Кафедра БТМ ₈₄		

зняти з себе прикраси, змити лак з нігтів, ретельно вимити руки теплою водою з милом і продезінфікувати їх.

Організація та функціонування відповідної системи якості й належне виробництво лікарських засобів залежать від людей. Тому необхідна достатня кількість кваліфікованого персоналу для вирішення всіх завдань, які знаходяться й сфері відповідальності виробника. Кожен співробітник повинен чітко розуміти індивідуальну відповідальність, яка має бути документована. Весь персонал повинен знати принципи GMP, що стосуються його діяльності, а також пройти первинне і подальше навчання відповідно до його обов'язків, включаючи інструктаж з виконання гігієнічних вимог.

ДР 1.2. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів

Всі мийні, дезінфікуючі розчини і суміші готують співробітники, призначені начальником цеху, ділянки, підрозділу за наказом. Розчини готують в емальованому посуді або в бутлях з товстого темного скла. Посуд, де зберігаються розчини, обов'язково повинен бути щільно прикритим кришкою або корком. Приготування розчинів проводиться у спеціальній кімнаті, що прилягає до санвузла. Бажано, щоб це була темна чи не дуже світла кімната, стіни та підлога її вистелені кахлями, також є раковина для миття рук.

ДР 1.2.1. Підготовка дезінфікуючого розчину Біомой

Для миття ємнісного обладнання використовують розчин мийнодезінфікуючого засобу «Біомой» 0,3% концентрації. Миття обладнання відбуватиметься вручну. Для того, щоб приготувати 0,3% розчину через кришку реактора розмішувача додаємо 0,06 л концентрату Біомой і 49,94 л води питної. Вмикаємо перемішувач, швидкість оберту мішалки 100 об/хв, перемішуємо 20 хвилин до розчинення. Концентрація робочого розчину $C = 0,3\%$.

ДР 1.2.2. Підготовка дезінфікуючого розчину Стеріоксу

Для приготування Стеріоксу необхідно розбавити концентрований препарат водою до потрібної концентрації. Для того, щоб приготувати 0,005%

розчину через кришку реактора-змішувача додаємо 0,13 л концентрату Стеріоксу і 99,87 л води питної. Вмикаємо перемішувач, швидкість обертання мішалки 100 об/хв, перемішуємо 20 хв.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

Прибирання та дезинфекція виробничих приміщень проводиться в гумових рукавичках та чоботах і при необхідності в респираторі. Обробку приміщень проводять за допомогою протирання мийно-дезинфікуючим розчином або розпилюючи його за допомогою пристрою з аерозольними насадками.

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень

Миття підлоги проводять один раз на робочий день, використовуючи розчин мийно-дезинфікувального засобу (від ДР 1.2.2). Цим же розчином протирають ззовні всю комунікацію і апаратуру; килимки при вході у всі приміщення намочують. Через 3 місяці необхідно змінити дезинфікуючий засіб. Наступним будемо використовувати Дезактін. Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль ($KУО < 800/см^2$).

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень

Миття стін, вікон та дверей проводять раз на 7 днів або за вимоги мікробіолога при виявленні мікробної контамінації, використовуючи розчин мийно-дезинфікувального засобу (від ДР 1.2.2). Комунікації і апаратуру протирають ззовні. Стелі, вікна, двері, стелю обробляють за допомогою зрошення з гідропульта. Потім оброблене приміщення необхідно залишити на 20-30 хв. Після цього все протирають чистою серветкою. Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль ($KУО < 300/см^2$).

ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій

Для миття обладнання та комунікацій застосовують мийно-дезинфікуючий розчин препарату “Біомой”(від ДР. 1.2.1) підігрітого до температури 80 °С. Миття здійснюють протягом 1 год при перемішуванні. Відпрацьований розчин

після миття йде на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 16.2). Для ополіскування в апарати по комунікаціях подається питна вода до заповнення 50% об'єму апаратів, вмикають перемішуючий пристрій. Після зливу вода направляється на 26 стадію знешкодження відходів (до ЗВ 16.2).

ДР 1.4.2. Технічний огляд

Технічний огляд проводиться після миття та ополіскування ємкісного обладнання проводять з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 2. Підготовка повітря

ДР 2.1 Підготовка аераційного повітря

При виробничому біосинтезі одним із найважливіших завдань є одержання великої кількості стерильного повітря, який необхідний для аерації під час культивування та вентеляції ділянок виробничого приміщення.

ДР 2.1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту на висоті 10 м, де стабільна концентрація мікроорганізмів.

ДР 2.1.2 Попередня очистка повітря (грубе очищення)

На стадії попереднього очищення видаляється основна маса великих частинок пилу 5-10 мкм. Використовується фільтр ФВП-56-48-G4, фільтруючий матеріал якого – поліестерове волокно. Повітря пропускають через фільтр грубої очистки (Ф-6), де воно очищається від пилу та інших механічних до ступеня очищення $E = 75 \%$

ДР 2.1.3. Компресування повітря

Стиснення повітря проводиться у компресорі (К-7) під тиском 0,4 МПа, при температурі 220-250°C.

ДР 2.1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Повітря охолоджують до температури 25 – 30°C в теплообміннику-

охолоджувачі. Повітря подається в ресивер для акумуляції та стабілізації термодинамічних показників. Ресивер має конденсато-відвідний канал. Вирівнюється тиск і пульсація потоку, вологість встановлюється на рівні $W = 60 - 70 \%$.

ДР 2.1.5. Нагрівання повітря

Для того щоб забезпечити надійної роботи головного і індивідуального фільтрів, повітря нагрівають до температури до 50°C ($W = 50 \%$) в теплообміннику-нагрівачі (Т-10).

ДР 2.1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря надходить у головний фільтр Airpol. Всередині нього розміщені сітки, між якими укладені фільтруючий матеріал – багат шарове мікрОВОлокно. Ступінь очищення становить 95%.

ДР 2.1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед подаванням в апарат повітря проходить очищення в фільтрах індивідуальної очистки Wopeso A 7014. Ступінь очищення становить 99,999%.

ДР 2.2. Підготовка вентиляційного повітря

Підготовка вентиляційного повітря здійснюється за допомогою системи вентиляції і кондиціонування повітря, яка призначена для підтримки внутрішнього мікроклімату, заданих параметрів тиску, заданого класу чистоти.

ДР 2.2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря із температурою 20°C та вологістю 60-90 % забирають вентилятором через забірну шахту на висоті 10 м, де стабільна концентрація мікроорганізмів.

ДР 2.2.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря пропускають через фільтр грубої очистки (Ф-30), де воно очищається від пилу та інших механічних до ступеня очищення $E = 75\%$. На стадії попереднього очищення видаляється переважна частина великих частинок пилу 5-10 мкм. Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволка.

Цей фільтр знижує кількість контамінантів та запобігають забрудненню вентелятора.

ДР 2.2.3. Головне тонке очищення повітря

Повітря пропускають через фільтр ABS 90С (Ф-32), фільтруючим матеріалом якого є мікроскловолокно. Даний фільтр забезпечує ступінь очищення $E = 95\%$.

ДР 2.2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Повітря охолоджують до температури 25°C в теплообміннику-охолоджувачу (Т-33). Вологість встановлюється на рівні $W = 60 - 70 \%$.

ДР 2.2.5. Нагрівання повітря

Для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів охоложене повітря у теплообміннику-нагрівачу (Т-34) підігривають до температури 35°C ($W = 50 \%$).

ДР 2.2.6. Очищення повітря на вискоефективних фільтрах

Повітря очищається в фільтрах вискоефективного очищення (Ф-35) до $E=99,999 \%$ безпосередньо перед випуском в чисте приміщення.

ДР 2.2.8. Зволоження вентиляційного повітря

У відповідності з технологічними вимогами до створення і підтримання в чистих приміщеннях штучних кліматичних умов, а саме відносної вологості 30-60% і температури 30°C , проводиться зволоження повітря стерильною парою, яка готується в парогенераторах. Для охолодження повітря в теплий період використовуються компресорно-конденсаторні блоки.

ДР 3. Підготовка розчинів титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування 10% розчину сірчаної кислоти

Для 137 л поживного середовища необхідно приготувати 276 мл 10% розчину сірчаної кислоти. Розчин сірчаної кислоти використовують нестерильним.

Для приготування у колбу об'ємом 250 мл вносять 208 мл води питної та

при постійному перемішуванні додають 68 мл 42% розчину сірчаної кислоти.

Готовий розчин направляється до ТП 5.5., ТП 6.1.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація 10% розчину NaOH

Необхідно приготувати 276 мл 10% розчину гідроксиду натрію. Для цього у колбу об'ємом 500 мл вносять 27,6 г кристалічного гідроксиду натрію, додають 248,4 мл води питної, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа, протягом 40 хв.

Готовий розчин направляється до ТП 5.5., ТП 6.1.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 1200 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 1200 мл поживного середовища наведено в табл. 4.1

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1200 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 1200 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Інулін	3,5	4,2	А	614
Сечовина	4	4,8		
Хітиновий порошок	4	4,8		
Вода	-	600,2		
КН ₂ РО ₄	0,7	0,84	Б	401
К ₂ НРО ₄ · 3Н ₂ О	0,3	0,36		

Вода	-	400		
MgSO ₄	0,5	0,6	В	185
Вода	-	184,4		

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 4,2 г інуліну, 4,8 г сечовини та 4,8 г хітинового порошку. Наважки поміщають у колбу об'ємом 750 мл, за допомогою мірного циліндра на 1000 мл додають 600,2 мл дистильованої води, і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,84 г калій дигідрофосфату і 0,36 г кристалогідрату калій гідрофосфату. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, за допомогою мірного циліндра на 500 мл додають 400 мл дистильованої води, і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,6 г магній сульфату. Наважки поміщають у колбу об'ємом 250 мл, за допомогою мірного циліндра на 200 мл додають 184,4 мл дистильованої води, і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 12,5 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 12,5 л поживного середовища наведено в табл. 4.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 12,5 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація г/л	Вміст компонента у 12,5 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Інулін	3,5	43,75	А	6
Сечовина	4	50		
Хітиновий порошок	4	50		
Вода	-	5,856		
K_2HPO_4	0,7	8,75	Б	4,5
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,3	3,75		
Вода	-	4,487		
MgSO_4	0,5	6,25	В	2
Вода	-	1,994		

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 43,75 г інуліну, 50 г сечовини та 50 г хітинового порошку. Наважки поміщають реактор змішувач на 10 л і за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 5,856 л дистильованої води.

Для проведення стерилізації в сорочку інокулятора подають пару і нагрівають апарат до температури 80-90 °С, гостру пару подають безпосередньо в апарат до досягнення температури 112 °С витримуючи упродовж 30 хв.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 8,75 г калій дигідрофосфату і 3,75 г кристалогідрату калій гідрофосфату. Наважки поміщають у колбу об'ємом 5 л, за допомогою мірного циліндра на 5 л додають 4,487 л дистильованої води, і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою

пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 6,25 г магній сульфату. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, за допомогою мірного циліндра на 2 л додають 1,844 л дистильованої води, і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 4.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у ферментері на 250 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 123,3 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 123,3 л поживного середовища наведено в табл. 4.3.

Таблиця 4.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування

123,3 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація г/л	Вміст компонента у 123,3 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Інулін	3,5	431,55	А	60
Сечовина	4	493,2		
Хітиновий порошок	4	493,2		
Вода	-	58,58		
КН ₂ РО ₄	0,7	86,31	Б	45
К ₂ НРО ₄ · 3Н ₂ О	0,3	36,99		
Вода	-	44,876		
МgSO ₄	0,5	61,65	В	18,3
Вода	-	18,24		

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 431,55 г інуліну, 493,2 г сечовини та 493,2 г хітинового порошку. Наважки поміщають в реактор-змішувач на 100 л і за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 58,58 л дистильованої води.

Для проведення стерилізації в сорочку збірника подають пару і нагрівають апарат до температури 80-90 °С, гостру пару подають безпосередньо в апарат до досягнення температури 112 °С витримуючи упродовж 30 хв.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 86,31 г калій дигідрофосфату і 36,99 г кристалогідрату калій гідрофосфату. Наважки поміщають реактор-змішувач об'ємом 50 л і за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 44,876 л дистильованої води. Для проведення стерилізації в сорочку збірника подають пару і нагрівають апарат до температури 80-90 °С, гостру пару подають безпосередньо в апарат до досягнення температури 131 °С витримуючи упродовж 40 хв.

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 61,65 г магній сульфату. Наважки поміщають реактор змішувач об'ємом 20 л і за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 18,24 л дистильованої води. Для проведення стерилізації в сорочку збірника подають пару і нагрівають апарат до температури 80-90 °С, гостру пару подають безпосередньо в апарат до досягнення температури 131 °С витримуючи упродовж 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *C. teiuanensis* SYBC-N1 зберігають у пробірках зі скошеним агаризованим МПА у холодильнику при температурі 4 °С. Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Усі роботи за колекційною культурою проходять строго в

стерильних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури C. teiyuanensis SYBC-H1 на агаризованому середовищі

Робочу культуру штаму-продуцента отримують розсівами колекційної культури на чашки Петрі із агаризованим м'ясо–пептонним середовищем в асептичних умовах. Культуру на чашці Петрі вирощують при температурі 37°C протягом 36 год.

ТП 5.3. Вирощування робочої культури C. teiyuanensis SYBC-H1 на агаризованому середовищі

Ізольовані колонії від ТП 5.2 в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим середовищем. Одна ізольована колонія засівається в одну окрему пробірку. Для пересіву використовують колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 36 год при температурі 37°C.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу об'ємом 2 л із 614 мл розчину композиції А (від ДР 4.1.1) в асептичних умовах в лабораторії вносять 401 мл розчину композиції Б (від ДР 4.1.2) та 185 мл розчину композиції В (від ДР.4.1.3). Після проводимо мікробіологічний контроль поживного середовища на відсутність мікроорганізмів. Після перевірки на відсутність мікробіоти, розчин розливають по 200 мл в вісім стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл. Далі у пробірку з робочою культурою *C. teiyuanensis* SYBC-H1, вирощену на м'ясопептонному агарі, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалці (n = 320 об/хв) при 37 °C упродовж 72 год. Під час культивування відбирають пробу для здійснення

мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Після завершення вирощування кожен колбу перевіряють на відсутність сторонньої мікробіоти, у разі позитивного результату (лише мікроорганізм-продуцент) в асептичних умовах інокулянт з 5 колб переносять в стерильну засівну колбу об'ємом 2 л, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

В інокулятор, об'ємом 20 л (Ф-16) через засівну колбу в асептичних умовах вносять 6 л композиції А (від ДР 4.2.1), 4,5 л композиції Б (від ДР 4.2.2.) та 2 л композиції В (від ДР 4.2.3). Перед подачею посівного матеріалу поживне середовище в інокуляторі (Ф-16) доводять розчином 6 % розчином NaOH (від ДР 3.2) за допомогою стерильної засівної колби на 50 мл при ввімкненому перемішувачу пристрої до значення рН 8,0. Після проводимо мікробіологічний контроль поживного середовища на відсутність мікроорганізмів. Потім в асептичних умовах за допомогою стерильної засівної колби вносять посівний матеріал (від ТП 5.4) у інокулятор (ФР-16). Включають перемішувач пристрій, вмикають аерацію, в рубашку інокулятора подають пару (для підтримання температури культивування). Культивування здійснюють при $t=37^{\circ}\text{C}$ впродовж 72 год. Кожні 4-6 години відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 250 л

У ферментер об'ємом 250 л (Ф-17) з композицією А (ДР 4.3.1) вносять розчин композиції А від збірника (Р-20). Потім із збірників (Р-23) і (Р-27) розчин солей. У рубашку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C та вмикають перемішувач пристрій. Проводимо мікробіологічний контроль поживного середовища на відсутність мікроорганізмів. Перед додаванням посівного матеріалу (від ТП. 5.5)

приготовлене поживне середовище доводять 6 % розчином NaOH (від ДР 3.2) при ввімкненому перемішувачу пристрої до рН = 8,0. Далі з інокулятора (Ф-16) за допомогою стисненого повітря перекачують посівний матеріал (від ТП 5.5) у ферментер (ФР-17). Вмикають перемішування та аерацію, в рубашку ферментера подають пару (для підтримування температури культивування). Біосинтез здійснюють при температурі 37 °С впродовж 72 год. У процесі культивування, кожні 4-6 год, відбирають проби для здійснення мікробіологічного контролю та контролю показників росту та синтезу.

ТП 7. Відділення біомаси

ТП 7.1. Сепарування культуральної рідини

Відділення біомаси бактерій *C. Meiyuanensis* SYBC-H1 від культуральної рідини відбудеться у сепараторі MBPX 810 (С-39). Культуральну рідину з біомасою із збірника (З-37) за допомогою відцентрового насоса (Н-38) подають в сепаратор, де буде проходити відділення. В сепараторі відбувається розділення твердої і рідкої фаз. Повністю герметична система сепарації MBPX 810Н використовується для відділення зважених частинок (біомаси) з розмірами 0,5 - 500 мкм з рідини (культуральної рідини), що має більш низьку щільність.

ТП 8. Дезінтеграція клітин

ТП 8.1. Обробка біомаси ультразвуком

Для фізичної дезінтеграції хітинази бактерії *C. Meiyuanensis* SYBC-H1 спочатку піддають обробці ультразвуком. Біомасу за допомогою відцентрового насоса (Н-60) з сепаратора (С-39) подають в ультразвукову ванну TUS-180ST (УВ-40) з робочою частотою 25, 35 та 40 кГц.

ТП 8.2. Обробка біомаси папаїном

Після ультразвукової обробки біомасу бактерій *C. Meiyuanensis* SYBC-H1 з ванни за допомогою насоса (Н-41) переносять в збірник-змішувач (З-42) де здійснюють обробку ферментом папаїном, який повністю гідролізують пептидоглікани клітинних стінок бактерій.

ТП 9. Виділення ферменту

ТП 9.1. Центрифугування дезінтегрованої біомаси

Відділення ферменту від дезінтегрованої біомаси відбувається за допомогою шнекової центрифуги (Ц-44) при 5000 об/хв протягом 15 хв при температурі 4°C для запобігання саморозогріву. Після чого супернатант за допомогою насосу (Н-45) до ультрафільтраційної системи (УФ-46), а відцентрифуговані залишки клітин подають на знешкодження відходів (ЗВ 16.1).

ТП 10. Концентрування ферменту

ТП 10.1. Ультрафільтрація ферментного комплексу

Супернатант від ТП 5.1. надходить до ультрафільтраційної системи (УФ-46) для відокремлення низькомолекулярних та баластних речовин через мембрани типу ST із порогом відсікання 50 кДа. Процес протікає під тиском $0,4 \pm 0,02$ МПа. Після чого фермент подають у збірник для концентрату (З-48) за допомогою насосу (Н-47) для осадження сульфатом амонію, а фільтрат подається на знешкодження відходів до (ЗВ 16.2).

ТП 11. Осадження ферментного розчину

Ферментний розчин від ТП 6.1 осаджують сульфатом амонію до 90 % насичення в збірнику для концентрату (З-48). Суміш витримують 12-16 год при температурі 4°C після чого її відправляють за допомогою насосу (Н-49) на центрифугування до центрифуги (Ц- 51).

ТП 12. Центрифугування осадженого ферментного комплексу

Розділення осаду від рідини відбувається за допомогою центрифугування в фільтруючій центрифугі (Ц-51) при 5000 об/хв впродовж 30 хв. Після цього супернатант подається на знешкодження відходів (ЗВ 13.1), а відцентрифугований осад за допомогою насосу (Н-52) – на іонообмінну колонку.

ТП 13. Іонообмінна хроматографія

Об'єднані білкові фракції наносять на колонку з аніонообмінником TSK DEAE 650 (M), який закупається. Елюцію проводять 0,01 М Трис-НСІ буфером в градієнті хлориду натрію від 0 до 1М. Після очищення хітиназний комплекс подають в збірник для очищеного ферментного комплексу (З-56).

ТП 14. Ліофільне сушіння

Очищений хітиназний комплекс поміщають в ліофільну сушарку LP20R (Л-58), яка має 6 полиць. Заморожування продукту проводять при -40°C , а сушіння при $+75^{\circ}\text{C}$. Процес протікає у вакуумі при 13 ± 1 Па.

НМП 15. Наповнення, маркування та пакування ферменту

Наповнення, пакування та маркування проводиться в пакувальній машині ZVF-200 (П-59) одночасно. Ця машина завершує всю процедуру упаковки, вимірювання маси (1000 г), завантаження матеріалів, упаковки в поліетиленові пакети, друкування дат. На упаковку гарячим тисненням наноситься серія, термін придатності препарату. Маркування поліетиленових пакетів роблять чорною фарбою та зазначають назву продукту, його активність, номер партії, термін зберігання, організацію виробника.

ЗВ 16. Знешкодження відходів

ЗВ 16.1 Знешкодження твердих відходів

На знешкодження подаються залишки відцентрифугованих залишків клітин від ТП 9.1. На сьогодні існує чотири методи знешкодження твердих відходів: біотермічний, поховання, компостування і спалювання. Одним із найбільш застосовуваних для знешкодження та утилізації твердих промислових відходів є термічні методи. Спалювання здійснюють у високотемпературних хімічних реакторах – печах. Найбільшої популярності набули циклонні печі і печі зваженого шару завдяки енергійному перемішуванню твердого матеріалу з повітрям.

ЗВ 16.2 Знешкодження рідких відходів

На знешкодження подаються залишки робочих мийно-дезінфікуючих розчинів від ТП 1.4.1, фільтрат від ТП 10.1, супернатант від ТП 12. Дезінфікуючі розчини належать до 3 і 4 класу небезпеки, тому поховання та скидання в каналізацію забороняється, тому їх збезводнюють до пастоподібної консистенції.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

Упродовж культивування періодично відбирають проби культуральної рідини (раз в 4 год).

Мікробіологічний контроль проводиться за допомогою посіву проб культуральної рідини на агаризовані середовища для виявлення сторонніх мікроорганізмів. Для виявлення бактерій використовуємо середовище з м'ясо пептонним агаром (МПА). Для більш швидкого виявлення сторонніх мікроорганізмів здійснюють мікроскопіювання (метод "роздавлена крапля").

Препарат готують на предметному склі попередньо знежиреному. Після нанесення на скло маленької краплі культуральної рідини, його накривають накривним скельцем і мікроскопіюють з об'єктивом 40x без імерсійної системи та 90x з імерсійною системою.

8.2. Визначення хітиназної активності

Хітинолітичну активність визначали в культурах клітин, вирощених в рідкому середовищі з хітином протягом 30 діб, флуориметричним методом по кількості вивільнюючого 4-метілumbеллі-ферона (4-МУ) за допомогою набору реагентів для визначення хітиназної активності. Для визначення типу хітинолітичної активності ферментів, що беруть участь в гідролізі хітину і його похідних, використовували такі флуоресцентно мічені хітоолігосахариди:

- 4-МУ- β -DN, N['],
- N[']-тріацетіл-хітотріозу (субстрат для визначення активності ендохітинази),
- 4-МУ- β -DN,
- N[']-ді-ацетил-хітобіозід (для визначення хітибіозидазної активності);

НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Кривець Т.Ю.</i>			Розділ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрвішів
Перевір.		<i>Слободян О.П.</i>						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>						
						Кафедра БТМ 101		

- 4-МУ-N-ацетил- β -D-глю-козамін (для визначення активності β -N-ацетилглюкозамінідази).

Осад клітин отримують шляхом центрифугування 40 мл культури при 8000 об./хв протягом 10 хв при 4 ° С на центрифусі Eppendorf 5810R. До осаду додають 0.4 мл 50 мМ фосфатного буфера (рН 6.0). Клітини руйнують за допомогою ультразвукового гомогенізатора Bandelin Sonopuls HD 2200 протягом 10 хв при 50% потужності прибору. Отримані лізати клітин розділяли центрифугуванням (12000 об./хв протягом 20 хв) на фракції супернатанта і осаду; супернатант відділяють, а до осаду додають 100мМ фосфатного буферу (рН 6) в обсязі, рівному обсягу супернатанта.

Ферментативну активність вимірюють в наступних фракціях досліджуваних культур: (1) культуральної рідини без клітин, (2) фракції незруйнованих клітин, (3) фракції зруйнованих ультразвуком клітин і (4) і (5) фракція супернатанта і осаду, отриманих центрифугування зруйнованих клітин. Час інкубації досліджуваного зразка з флуоресцентно міченим субстратом становило 30 хв. Інтенсивність флуоресценції продуктів реакції вимірювали на флуориметрі Люмекс Флюорат 02. Панорама при довжині хвилі поглинання 360 нм і випускання 450 нм. За одну одиницю хітинолітичної активності бреть кількість ферменту, що вивільняє 1 нмоль 4-МУ субстрату за 1 хв. [117].

8.3. Визначення ферментативної активності.

Активність хітинази оцінювалася спектрофотометричним методом за сумарною кількістю розчинних редуруючих цукрів в гідролізаті. До 0,5 мл 1%-ної суспензії колоїдного хітину в 0,1 М натрій-ацетатному буфері, рН 5,0, додавали 0,3 мл розчину ферменту. Суміш інкубували 10 хв при 40 °. Реакцію зупиняли додаванням 0,75 мл ДНСК-реагенту (10 г NaOI-I, 10 г динітросаліцилової кислоти, 2 г фенолу, 0,5 г Na₂S O₃ і 200 г натрій-калій-виннокислого на 500 мл). Забарвлення формувалося в процесі подальшої інкубації проби при 100 ° протягом 10 хв. Після центрифугування (8 тис. об./хв, 10 хв) в супернатанті вимірювали поглинання. За одиницю активності брали

кількість ферменту, необхідне для утворення 1 мкМ NAG в 1 хв при 40 °.

Хітозаназну активність хітинази визначали по хітозану (ступінь N-ацетилювання дорівнює 18%) при рН 5,0 (0,1 М натрій-ацетатний буфер) і при рН 6,4 (0,1 М фосфат-цитратний буфер). Кількість розчинних редуруючих цукрів оцінювалося з ДНСК-реагентом, як описано вище.

Активність хітинази по відношенню до розчинних хітосахаридів вимірювали за методикою Рейсіг і співавт [118].

8.4. Контроль чистоти виробничих приміщень

Чистоту стін і підлоги виробничих приміщень контролюють мікроскопуванням проб, взятих у такий спосіб здирання частини забрудненої поверхні, зразок який здерли поміщають у пробірку із стерильною водою, добре збовтують готують препарат і дивляться під мікроскопом без фарбування або з фарбуванням мазків метиленовим синім.

Для кількісного обліку мікроорганізмів користується трафаретом і стерильним змоченим ватним тампоном і в подальшому висівають на щільні середовища в чашках Петрі. Перед взяттям проби трафарет змочують спиртом, обпалюють і накладають на досліджувану поверхню. Обмежену площу промивають змоченим тампоном, після чого тампон опускають у ту саму пробірку, занурюють у воду, що залишилася або фізіологічний розчин і добре перемішують.

Висівають 0,1 см³ змиву на м'ясо-пептоновий агар. Визначають загальну кількість мікроорганізмів після термостатування за 30°C впродовж 48 годин. Загальне мікробне обнасінення виробничих поверхонь не повинно перевищувати 100 КУО/см² [119].

8.5. Визначення концентрації амінного азоту.

Визначення проводять мідним способом. Суть даного методу полягає у тому, що до визначеної кількості досліджуваного розчину, який містить суміш амінокислот і пептидів, приливають при слаболужній реакції надлишок

суспензії фосфорнокислої міді у боратному буфері, в результаті чого після збовтування розчин переходять мідні солі більшості амінокислот.

Техніка визначення

10 мл фільтрату культуральної рідини наливають у мірну колбу на 25 мл і додають одну – дві краплі тимолфталейну і по краплях 1 н. розчин гідроксиду натрію до появи блідо-синього забарвлення. Після цього у колбу додають 10 – 15 мл суспензії ортофосфату міді у боратному буфері, потім доводять вміст колби до мітки дистильованою водою. Добре збовтують і фільтрують через складчастий фільтр з малопористого фільтрувального паперу або центрифугують.

Фільтрат повинен бути прозорий, бо за наявності навіть маленьких частинок осаду завищується кінцевий результат.

5 – 10 мл фільтрату відбирають у конічну колбу чи у фарфорову чашку, туди додають 0,25 – 0,5 мл 80% оцтової кислоти та 0,2 – 0,4 г калій йодиду. Йод, що виділився, відтитровують 0,01 н. розчином тіосульфату натрію, додаючи в кінці титрування 1 – 4 краплі крохмалю до зникнення синього забарвлення. Паралельно проводять контрольний дослід, де замість досліджуваного досліду беруть дистильовану воду[121].

8.6. Кількісне визначення білка на основі біуретової реакції

Принцип методу. Метод ґрунтується на властивості білків у лужному середовищі давати з біуретовим реактивом синьо-фіолетове забарвлення. Поява такого забарвлення зумовлена наявністю у молекулі білка пептидних зв'язків, які утворюють за даних умов мідно-натрієвісолеподібні комплекси. Інтенсивність забарвлення залежить від кількості цих зв'язків, а тому і від кількості білка в розчині, а також від кількості біуретового реактива. Тому при додаванні визначеної кількості реактива, ступінь забарвленості буде прямо пропорційна концентрації білка в розчин. Інтенсивність забарвлення

визначають фотоелектроколориметрі.

Хід роботи. У п'ять пробірок наливають по 2 мл стандартних розчинів білка різної концентрації, наприклад 1, 2, 3, 4, 5 %-ні розчини. У шосту пробірку наливають 2 мл дослідного розчину білка, в сьому – 2 мл дистильованої води (контроль). Потім у всі пробірки додають по 8 мл біуретового реактиву. Вміст пробірок перемішують і через 30 хв на фотоелектроколориметрі визначають оптичну густину (екстинкцію) при червоному світлофільтрі.

Як контроль використовують пробу з дистильованою водою. Результати перших п'яти проб використовують для побудови калібрувального графіка. На осі абсцис відкладають значення концентрації стандартних розчинів білка, на осі ординат – відповідні їм значення оптичної густини D . Одержані точки з'єднують прямою лінією. Визначивши значення 45 оптичної густини дослідного розчину білка, з калібрувальним графіком знаходять його концентрацію [122].

8.7. Визначення вмісту вологи

Визначення вмісту вологи буде проводитися за допомогою аналізатора вологості Radwag MA 110.R

Принцип визначення вмісту вологи за допомогою вологоміра полягає у автоматичному вимірюванні маси порошку ферменту хітиназа перед, під час та після висушування зразка сушаркою. За результатами зважування визначається вміст вологи у зразку, що був в ньому до початку процедури сушіння. Розрахунок вмісту вологи здійснюється вологоміром автоматично згідно наперед обраної користувачем формул, яка відображається на індикаторі вологоміра.

Показники:

- Дискреність визначення вологи - 0,001 %.
- Температура висушування в межах від 50-160 ° С.

- Максимальна вага досліджуваного зразку 110 г.
- Отримані результати відповідають вимогам GLP/GMP.

Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Санітарна підготовка виробництва				
ДР 1.1. Підготовка персоналу				
Км 1.1.2. Контроль санітарного стану персоналу	Руки персоналу	Мікробіологічний аналіз змиву	Після миття та дезінфекції рук	≤ 100 КУО/см ²
ДР 1.2. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів				
Кх, Кт.1.2.1. Приготування миючого розчину «Біомой»	Концентрація розчину «Біомой»	Об'ємно-ваговий метод	Під час приготування розчину	$C = 0,3$
Кх, Кт 1.2.2. Приготування дезінфікуючого розчину «Стеріокс»	Концентрація розчину «Стеріокс»	Об'ємно-ваговий метод	Під час приготування розчину	$C = 0,005$
ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень				
Км 1.3.1. Щоденне прибирання	Підлога, ручки і нижні частини дверей, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	КУО < 300/см ²
Км, Кт, 1.3.2.	Підлога, вікна, двері	Мікробіологічний	Після прибирання	КУО < 800/см ² , t=20-30

Геренальне прибирання	стіни, обладнання, чистота	аналіз змиву		хв
ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання				
Кт 1.4.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій	Мийний розчин, обладнання, температура робочого розчину, чистота	Годинник, технічний термометр	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	T = 70-80 °C, τ = 1 год, чисте обладнання
ДР 2 Підготовка повітря				
ДР 2.1 Підготовка аераційного повітря				
Кт 2.1.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 75 %
Кт 2.1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,4 МПа, t = 220-250 °C
Кт 2.1.4 Охолодження повітря	Охоложене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 25-30 °C, W = 60-70 %
Кт 2.1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	W = 50 %, T = 50 °C
Кт 2.1.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Превірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	E = 95%

ДР 2.2 Підготовка вентиляційного повітря				
Кт 2.2.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 75 %, тиск згідно паспорт
Кт 2.2.3. Тонке очищення повітря	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	E = 95 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.2.4. Охолодження повітря та видалення вологи	Охоложене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 25-30 °C, W=60-70 %
Кт 2.2.5. Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	W = 50 %, T= 35 °C
Кт 2.2.6. Очищення повітря на вискоєфективних фільтрах	Повітря на виході з вискоєфективного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у вискоєфективному фільтрі	E = 99,999 %, тиск згідно паспорт
Кт 2.2.7. Зволоження очищеного вентиляційного повітря	Ступінь зволоження, перепад тиску	Манометр технічний	Після зволоження повітря	W=30-60 %
ДР 3. Підготовка розчинів титрувальних агентів				
Кх 3.1. Приготування	Концентрація розчину	Хімічний метод	Концентрація	C = 10 %

10%-го розчину сірчаної кислоти	соляної кислоти		визначається після приготування розчину	
Кх, Кт, Км 3.2. Приготування та стерилізація 10% розчину NaOH	Тиск, час стерилізації, стерильність, концентрація розчину гідроксиду натрію	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний і хімічний контроль проводять після стерилізації	P=0,15 МПа (t = 131 °С), τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, С = 10 %
ДР 4. Підготовка та стерилізація поживного середовища				
ДР 4.1. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці				
Кт, Км 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, м/к після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

ДР 4.2. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

Кт, Км 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

ДР 4.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у ферментері на 250 л

Кт, Км 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2. Приготування і	Композиція Б, тиск, час стерилізації,	Манометр технічний, годинник, датчик рН,	Тиск визначається під час стерилізації,	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

стерилізація композиції Б	стерильність	мікробіологічний контроль	мікробіологічний контроль після стерилізації	
Кт, Км 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
ТП 5. Підготовка посівного матеріалу				
Кт, Км 5.4. Вирощування посівного матеріалу <i>S. meiyuanensis</i> SYBC-N1 в колбах на качалках	Посівний матеріал, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	n = 320 об/хв, τ = 72 год, відсутність сторонньої мікробіоти, рН=7, концентрація хітинази — 1,12 г/л
Кт, Км 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 20 л	Посівний матеріал, рН, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту в посівному апараті і в кінці процесу.	t = 37 °С, n = 320 об/хв, τ = 72 год, відсутність сторонньої мікробіоти, рН=7, концентрація хітинази — 1,12 г/л
ТП 6. Виробничий біосинтез				

Кт, Км 6.1 Виробниче культивування в ферментері на 250 л	Культуральна рідина, рН, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, активність ферменту	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль, ваговий метод	Під час вирощування культури в ферментері і в кінці процесу.	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 36$ год, відсутність сторонньої мікробіоти, концентрація хітинази — 1,12 г/л хітинолітична активність $U = 13,6$ од/мл.
ТП 7. Відділення біомаси				
Кт, Км ТП 7.1 Сепарування культуральної рідини	Швидкість сепарування, Відсутність сторонньої мікрофлори.	Тахометр, мікробіологічний контроль, хімічний метод	Під час сепарування	$C = 0,1-20\%$, $n=5000$ об/хв, відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 8. Дезінтеграція клітин				
Кт ТП 8.1 Обробка біомаси ультразвуком	Робоча частота ультразвуку	Апарат для вимірювання частоти ультразвуку	Під час процесу	25, 35 та 40 кГц
ТП 9. Виділення ферменту				
Кт ТП 9.1 Центрифугування дезінтегрованої біомаси	Швидкість перемішування, час, температура	Годинник, термометр, тахометр	Під час процесу	$n = 5000$ об/хв, $\tau = 15$ хв, $t = 4^{\circ}\text{C}$

ТП 10. Концентрування ферменту				
Кт ТП 10.1 Ультрафільтрація ферментного комплексу	Тиск, порог відсікання	Манометр технічний	Під час процесу	$P=0,4\pm 0,02$ МПа, $R=50$ кДа
ТП 11. Осадження ферментного розчину				
Кт, Кх ТП 11 Осадження ферментного розчину сульфатом амонію	Концентрація, температура, час	Годинник, термометр технічний	Під час процесу	$C=90\%$, $t=4^{\circ}\text{C}$, $T=12-16$ год
ТП 12. Центрифугування осадженого ферментного комплексу				
Кт ТП 12. Центрифугування осадженого ферментного комплексу	Час, швидкість перемішування	Годинник, тахометр	Під час процесу	$T=30$ хв, $n=5000$ об/хв
ТП 14. Ліофільне сушіння				
Кт, ТП 14. Ліофільне сушіння	Температура, час, тиск	Технічний термометр, годинник, манометр технічний	Під час процесу	$t_1=(-40) 2^{\circ}\text{C}$, $t_2=35\pm 2$ год, $P=13\pm 1$ Па.
ТП 15. Наповнення, маркування та пакування ферменту				
Кт НМП 15. Наповнення, маркування та	Наповнення, маркування, кількість пакетів в коробці	Візуальний контроль, ваги	Після процесу маркування та пакування	Назва підприємства, його адреса, назва продукту, термін

пакування ферменту				зберігання та спосіб використання, дата виготовлення, склад продукту, масою 100 г
--------------------	--	--	--	--

Висновки

1. В літературному огляді опрацьовано значний обсяг наукової вітчизняної та іноземної літератури щодо одержання ферменту хітиназа за допомогою різноманітних мікроорганізмів. Окрім культивування хітиназ мікроорганізмами в роботі розглянуто й інші способи отримання хітиназ, а саме за допомогою виділення ферменту зі шлунку риб, птахів та молюсків. Наведено також загальну характеристику ферменту і основні шляхи його застосування.
2. В результаті опрацювання літературних джерел обґрунтовано вибір продуцента *Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1*, який синтезує хітиназу з високою хітинолітичною активністю – 13,6 од/мл, та за рахунок секреції хітиназ здатний використовувати хітин як єдине джерело вуглецю.
3. Встановлено оптимальна умова для синтезу *Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1*, які забезпечує вихід хітинази з високою активністю – 13,6 од/мл. Такими умовами є: використання при культивуванні триступеневої стратегії контролю рН.
4. Розроблено технологічну та апаратурні схеми отримання цільового продукту під час культивування штаму *Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1* на суміші хітину, сечовини та інуліну.

Апробіція

1. *Т.Ю. Кривець, О.П. Слободян.* Применение хитиноподобных ферментов // 71-й научно-технической конференции учащихся, студентов и магистрантов, посвященной 90-летию БГТУ (м. Минск 20-25 квітня 2020 р.) - с.5
2. *Т.Ю. Кривець, О.П. Слободян.* Культивування *BACILLUS SUBTILIS* для одержання пробіотичного імуномодулятора ветеринарного призначення // Програма та тези матеріалів VIII Міжнародної науково-технічної конференції (м. Київ 5-6 листопада 2019 р.) – К.: НУХТ, 2019. – 451 с.
3. *Кривець Т.Ю., Слободян.* Перспективи отримання хітиноподібних ферментів // Матеріали 86-ї міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів “ Наукові здобутки молоді — вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті” (м. Київ, 2-3 квітня 2020р.).

Список використаної літератури

1. Шубаков А.А., П. Кучерявых П.С. Хитинолитическая активность мицелиальных грибов. Прикладная биохимия и микробиология, 2004, том 40, № 5, с. 517-519, УДК 577.151.54:577.152.3:57.083.132
2. Журавлева Н.В. Лукьянов П.А. Хитинолитические ферменты: источники, характеристика и применение в биотехнологии. Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2004.
3. Boiler, T. (1986) in Chitin in Nature and Technology (Muzzarelli, R., Jeuniaux, C., and Gooday, G.W., eds.), Plenum Press: New York, London, pp. 223-230.
4. Carin, P., and Chel, I. (1989) FEMS Microbiol. EcoL, 62, 201-208.
5. Gooday, G.W. (1986) in Chitin in Nature and Technology (Muzzarelli, R., Jeuniaux, C., and Gooday, G.W., eds.), Plenum Press: New York, London, pp. 241-262.
6. Fukamizo, T., and Kramer, K.J. (1985) Insect. Biochem., 15, 1-7.
7. Cody, R.M. (1989) Curr. Microbiol., 19, 201-205.
8. Monreal, J., and Rees, E.T. (1968) Canad. J. Microbiol., 15, 689-696.
9. Romaguera, A., Menge, U., Breves, R., and Dlekman, H. (1992) J. Bacteriol., 174, 3450-3454.
10. Worlman, A.T., Somerville, C.C., and Colwell, R.R. (1986) Appl: Envir. Microbiol., 52, 142-145.
11. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A5%D1%96%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%B0%D0%B7%D0%B0>
12. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.bionet.nsc.ru/razrabotki/prikladnyie-razrabotki/biopreparaty/novyie-sredstva-zashhityi-selskoxozyajstvennyix-rastenij/bakterialnaya-xitinaza.html>
13. Tran, D. M., Sugimoto, H., Nguyen, D. A., Watanabe, T., & Suzuki, K.

Identification and characterization of chitinolytic bacteria isolated from a freshwater lake. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2018. 82(2), 343–355. doi:10.1080/09168451.2017.1422969

14. Le, B., & Yang, S. H. Characterization of a chitinase from *Salinivibrio* sp. BAO-1801 as an antifungal activity and a biocatalyst for producing chitobiose. *Journal of Basic Microbiology*. 2018. doi:10.1002/jobm.201800256

15. M. Rabeeth, A. Anitha, Geetha Srikanth. Purification of an Antifungal Endochitinase from a Potential Biocontrol Agent *Streptomyces griseus*. *Pak J Biol Sci*. 2011. 14 (16), 788-97. doi: 10.3923/pjbs.2011.788.797

16. Hao, Z., Wu, H., Yang, M., Chen, J., Xi, L., Zhao, W., ... Huang, Q. Cloning, Expression and 3D Structure Prediction of Chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. 17(6), 825. doi:10.3390/ijms17060825

17. Songsiriritthigul, C., Lapboonrueng, S., Pechsrichuang, P., Pesatcha, P., & Yamabhai, M. Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. *Bioresource Technology*, 2010. 101(11), 4096–4103. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.036

18. Hao, Z., Cai, Y., Liao, X., Liang, X., Liu, J., Fang, Z., ... Zhang, D. *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1T, Gen. Nov., sp. Nov., a Chitin-Degrading Bacterium Isolated From Soil. *Current Microbiology*, 2011. 62(6), 1732–1738. doi:10.1007/s00284-011-9921-5

19. Suganthi, M., Senthilkumar, P., Arvinth, S., & Chandrashekhara, K. N. Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2017. 63(4), 222–227. doi:10.2323/jgam.2016.11.001

20. Itoh, T., & Kimoto, H. Bacterial Chitinase System as a Model of Chitin Biodegradation. *Targeting Chitin-Containing Organisms*. 2019. 131–151. doi:10.1007/978-981-13-7318-3_7

21. Frederiksen, R. F., Paspaliari, D. K., Larsen, T., Storgaard, B. G., Larsen, M.

H., Ingmer, H. Leisner, J. J. Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology*. 2013. 159(Pt_5), 833–847. doi:10.1099/mic.0.051839-0

22. Doan, C., Tran, T., Nguyen, V., Nguyen, A., & Wang, S.-L. Conversion of Squid Pens to Chitosanases and Proteases via *Paenibacillus* sp. TKU042. *Marine Drugs*, 2018. 16(3), 83. doi:10.3390/md16030083

23. Seo, D.-J., Lee, Y.-S., Kim, K.-Y., & Jung, W.-J. Antifungal activity of chitinase obtained from *Paenibacillus ehimensis* MA2012 against conidial of *Collectotrichum gloeosporioides* in vitro. *Microbial Pathogenesis*, 2016. 96, 10–14. doi:10.1016/j.micpath.2016.04.016

24. Kumar, A., Kumar, D., George, N., Sharma, P., & Gupta, N. (2018). A process for complete biodegradation of shrimp waste by a novel marine isolate *Paenibacillus* sp. AD with simultaneous production of chitinase and chitin oligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 263–272. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.024

25. Hao Z, Cai Y, Liao X, Zhang X, Fang Z, Zhang D. Optimization of nutrition factors on chitinase production from a newly isolated Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H. *Braz J Microbiol*. 2012 Jan;43(1):177-86. doi: 10.1590/S1517-838220120001000019

26. Zhang, A., Gao, C., Chen, K., Wei, C., & Ouyang, P. (2016). Enhanced chitinase production by Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1 using staged pH control. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 62(3), 126–131. doi:10.2323/jgam.2016.01.003

27. Alei Zhang, Yumei He, Guoguang Wei, Jie Zhou, Weiliang Dong, Kequan Chen, Pingkai Ouyang. Molecular characterization of a novel chitinase CmChi1 from Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1 and its use in N-acetyl-D-glucosamine production. *Biotechnol Biofuels*. 2018; 11: 179. doi: 10.1186/s13068-018-1169-x.

28. Busby, J. N., Landsberg, M. J., Simpson, R. M., Jones, S. A., Hankamer, B., Hurst, M. R. H., & Lott, J. S. Structural Analysis of Chi1 Chitinase from *Yen-Tc*: The

Multisubunit insecticidal ABC Toxin Complex of *Yersinia entomophaga*. *Journal of Molecular Biology*, 2012. 415(2), 359–371. doi:10.1016/j.jmb.2011.11.018;

29. Hong Ni, H., Zeng, S., Qin, X., Sun, X., Zhang, S., Zhao, X., ... Li, L. Molecular Docking and Site-directed Mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* Chitinase to Improve Chitinolytic, Synergistic Lepidopteran-larvicidal and Nematicidal Activities. *International Journal of Biological Sciences*, 2015. 11(3), 304–315. doi:10.7150/ijbs.10632.

30. Qin, X., Xiang, X., Sun, X., Ni, H., & Li, L. Preparation of nanoscale *Bacillus thuringiensis* chitinases using silica nanoparticles for nematicide delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016. 82, 13–21. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.10.030

31. Fu, X., Yan, Q., Wang, J., Yang, S., & Jiang, Z. Purification and biochemical characterization of novel acidic chitinase from *Paenicibacillus barengoltzii*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016. 91, 973–979. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.050

32. Songsiriritthigul, C., Lapboonrueng, S., Pechsrichuang, P., Pesatcha, P., & Yamabhai, M. Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. *Bioresource Technology*. 2010. 101(11), 4096–4103. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.036

33. Laribi-Habchi, H., Bouanane-Darenfed, A., Drouiche, N., Pauss, A., & Mameri, N. Purification, characterization, and molecular cloning of an extracellular chitinase from *Bacillus licheniformis* strain LHH100 isolated from wastewater samples in Algeria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015. 72, 1117–1128. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.10.035

34. Aounallah, M. A., Slimene-Debez, I. B., Djebali, K., Gharbi, D., Hammami, M., Azaiez, S. Tabbene, O. Enhancement of Exochitinase Production by *Bacillus licheniformis* AT6 Strain and Improvement of N-Acetylglucosamine Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016 181(2), 650–666. doi:10.1007/s12010-016-2239-9

35. Slimene, I. B., Tabbene, O., Gharbi, D., Mnasri, B., Schmitter, J. M., Urdaci, M.-C., & Limam, F. Isolation of a Chitinolytic *Bacillus licheniformis* S213 Strain Exerting a Biological Control Against *Phoma medicaginis* Infection. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015. 175(7), 3494–3506. doi:10.1007/s12010-015-1520-7
36. Meena, S., Gothwal, R. K., Krishna Mohan, M., & Ghosh, P. Production and purification of a hyperthermostable chitinase from *Brevibacillus formosus* BISR-1 isolated from the Great Indian Desert soils. *Extremophiles*, 2014. 18(2), 451–462. doi:10.1007/s00792-014-0630-4;
37. Jankiewicz, U., & Brzezinska, M. S. Purification, characterization, and gene cloning of a chitinase from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. *Journal of Basic Microbiology*. 2015. 55(6), 709–717. doi:10.1002/jobm.201400717;
38. Moon C , Seo DJ , Song YS , Hong SH1, Choi SH1, Jung WJ2. Antifungal activity and patterns of N-acetyl-chitooligosaccharide degradation via chitinase produced from *Serratia marcescens* PRNK-1. *Microb Pathokg*. 2017; 113:218-224. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.039.
39. Purushotham, P., Sarma, P. V. S. R. N., & Podile, A. R Multiple chitinases of an endophytic *Serratia proteamaculans* 568 generate chitin oligomers. *Bioresource Technology*. 2012. 112, 261–269. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.062
40. Wang, K., Yan, P., & Cao, L. Chitinase from a Novel Strain of *Serratia marcescens* JPP1 for Biocontrol of Aflatoxin: Molecular Characterization and Production Optimization Using Response Surface Methodology. *BioMed Research International*, 2014, 1–8. doi:10.1155/2014/482623
41. Chen, J.-K., Shen, C.-R., & Liu, C.-L. The Characteristics of Chitinase Expression in *Aeromonas schubertii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014. 172(8), 3827–3834. doi:10.1007/s12010-014-0798-1
42. Lu, Y., Wang, N., He, J., Li, Y., Gao, X., Huang, L., & Yan, X. Expression and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from a rare actinomycete, *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015. *Protein Expression and*

Purification, 2018. 143, 45–51. doi:10.1016/j.pep.2017.10.013

43. Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф., Кузьмина Л.Ю., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. Синтез хитиназ и целюлаз грибами рода *Trichoderma* – деструкторами растительного сырья, выделенными из различных источников. 2017. ISBN 978-5-9596-1348-8

44. Krolicka, M., Hinz, S. W. A., Koetsier, M. J., Joosten, R., Eggink, G., van den Broek, L. A. M., & Boeriu, C. G. Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1, a Thermostable Enzyme for Chitin and Chitosan Depolymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018. 66(7), 1658–1669. doi:10.1021/acs.jafc.7b04032

45. Khan, F. I., Bisetty, K., Singh, S., Permaul, K., & Hassan, M. I. *Chitinase from Thermomyces lanuginosus* SSBP and its biotechnological applications. *Extremophiles*, 2015. 19(6), 1055–1066. doi:10.1007/s00792-015-0792-8

46. Shehata, A. N., Abd El Aty, A. A., Darwish, D. A., Abdel Wahab, W. A., & Mostafa, F. A. Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. 107, 990–999. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.071

47. Anwar, W., Javed, M. A., Shahid, A. A., Nawaz, K., Akhter, A., Ur Rehman, M. Z., Haider, M. S. Chitinase genes from *Metarhizium anisopliae* for the control of whitefly in cotton. *Royal Society Open Science*. 2019. 6(8), 190412. doi:10.1098/rsos.190412

48. Staats, C. C., Kmetzsch, L., Lubeck, I., Junges, A., Vainstein, M. H., & Schrank, A. *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Biology*. 2013. 117(2), 137–144. doi:10.1016/j.funbio.2012.12.006

49. Niassy, S., Subramanian, S., Ekesi, S., Bargul, J. L., Villinger, J., & Maniania, N. K. Use of *Metarhizium anisopliae* Chitinase Genes for Genotyping and

Virulence Characterization. *BioMed Research International*, 2013, 1–9. doi:10.1155/2013/465213

50. Bhanu Prakash, G. V. S., Padmaja, V., Jami, S. K., & Kirti, P. B. Expression of chitinase genes of *Metarhizium anisopliae* isolates in lepidopteran pests and on synthetic media. *Journal of Basic Microbiology*. 2012. 52(6), 628–635. doi:10.1002/jobm.201100274

51. Pócsi, I., Leiter, É., Kwon, N.-J., Shin, K.-S., Kwon, G.-S., Pusztahelyi, T., Yu, J.-H. Asexual sporulation signalling regulates autolysis of *Aspergillus nidulans* via modulating the chitinase ChiB production. *Journal of Applied Microbiology*. 2009. 107(2), 514–523. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04237.x

52. Shehata, A. N., Abd El Aty, A. A., Darwish, D. A., Abdel Wahab, W. A., & Mostafa, F. A. Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. 107, 990–999. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.071

53. Lockhart, D. E. A., Schuettelkopf, A., Blair, D. E., & van Aalten, D. M. F. Screening-based discovery of *Aspergillus fumigatus* plant-type chitinase inhibitors. *FEBS Letters*. 2014. 588(17), 3282–3290. doi:10.1016/j.febslet.2014.07.015

54. Kumar, M., Brar, A., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2017). Production of chitinase from thermophilic *Humicola grisea* and its application in production of bioactive chitoooligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1641–1647. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.100

55. Huang, Z., Hao, Y., Gao, T., Huang, Y., Ren, S., & Keyhani, N. O. (2016). The *Ifchit1* chitinase gene acts as a critical virulence factor in the insect pathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5491–5503. doi:10.1007/s00253-016-7308-z

56. Cheong, P., Glare, T. R., Rostás, M., & Haines, S. R. Measuring Chitinase and Protease Activity in Cultures of Fungal Entomopathogens. *Microbial-Based Biopesticides*. 2016. 177–189. doi:10.1007/978-1-4939-6367-6_14
57. Khan, F. I., Bisetty, K., Singh, S., Permaul, K., & Hassan, M. I. Chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP and its biotechnological applications. *Extremophiles*. 2015. 19(6), 1055–1066. doi:10.1007/s00792-015-0792-8
58. Cheong PCH, Glare TR, Rostás M, Haines S, Brookes JJ, Ford S. Lack of involvement of chitinase in direct toxicity of *Beauveria bassiana* cultures to the aphid *Myzus persicae*. *J Invertebr Pathol*. 2019; 169:107276. doi:10.1016/j.jip.2019.107276
59. Kim JS, Roh JY, Choi JY, Wang Y, Shim HJ, Je YH. Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. *Fungal Biol*. 2010; 114(1):120-8. doi:
60. Kim JS, Je YH, Yu YM. Mass production of aphicidal *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with the parameter of chitinase. *J Microbiol Biotechnol*. 2011; 21(6):604-12. PMID: 21715967
61. 4. Zhang, A., He, Y., Wei, G., Zhou, J., Dong, W., Chen, K., & Ouyang, P. Molecular characterization of a novel chitinase CmChi1 from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1 and its use in N-acetyl-d-glucosamine production. *Biotechnology for Biofuels*. 2018. 11(1). doi:10.1186/s13068-018-1169-x;
62. Chen J-K, Shen C-R, Liu C-L. N-acetylglucosamine: production and applications. *Mar Drug*. 2010;8(9):2493–516. doi: 10.3390/md8092493.
63. Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;71(6):773–82. PMID: 16249876
64. Huang L, Garbulewska E, Sato K, Kato Y, Nogawa M, Taguchi G, Shimosaka M. Isolation of genes coding for chitin-degrading enzymes in the novel chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*, and characterization of a gene coding for a family 19 chitinase. *J Biosci Bioeng*. 2012; 113(3):293-9. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.10.018;

65. Minamoto, T., Takahashi, N., Kitahara, S., Shinozaki, Y., Hirano, T., Hakamata, W., & Nishio, T. Saccharification of β -Chitin From Squid Pen by a Fermentation Method Using Recombinant Chitinase-Secreting *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015. 175(8), 3788–3799. doi:10.1007/s12010-015-1547-9;
66. Lobo, M. D., Silva, F. D., Landim, P. G., da Cruz, P., de Brito, T., de Medeiros, S., Grangeiro, T. Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*. 2013. 13(1), 46. doi:10.1186/1472-6750-13-46;
67. Xiao, L., Liu, C., Xie, C., Cai, J., & Chen, Y. The direct repeat sequence upstream of *Bacillus* chitinase genes is cis-acting elements that negatively regulate heterologous expression in *E. coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2012. 50(6-7), 280–286. doi:10.1016/j.enzmictec.2012.02.001;
68. Hao, Z., Wu, H., Yang, M., Chen, J., Xi, L., Zhao, W., ... Huang, Q. Cloning, Expression and 3D Structure Prediction of Chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. 17(6), 825. doi:10.3390/ijms17060825;
69. Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Guo, Y., Liu, Z., & Jiang, Z. Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. *Food Chemistry*. 2016. 192, 1041–1048. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.092
70. García-Fraga, B., da Silva, A. F., López-Seijas, J., & Sieiro, C. Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CECT 395 in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. 98(5), 2133–2143. doi:10.1007/s00253-013-5124-2;
71. Liu, Z., Huang, Y., Zhang, R., Diao, G., Fan, H., & Wang, Z. Chitinase Genes *LbCHI31* and *LbCHI32* from *Limonium bicolor* Were Successfully Expressed in *Escherichia coli* and Exhibit Recombinant Chitinase Activities. *The Scientific World Journal*. 2013, 1–9. doi:10.1155/2013/648382

72. Laribi-Habchi H, Dziril M, Badis A, Mouhoub S, Mameri N. Purification and Characterization of a Highly Thermostable Chitinase from the Stomach of the Red Scorpionfish *Scorpaena scrofa* with Bioinsecticidal Activity toward Cowpea Weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2012. 76(9), 1733–1740. doi:10.1271/bbb.120344
73. Ikeda, M., Miyauchi, K., Mochizuki, A., & Matsumiya, M. Purification and characterization of chitinase from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus*. *Protein Expression and Purification*, 2009 65(2), 214–222. doi:10.1016/j.pep.2009.01.015;
74. Shiota K, Sato T, Sekiguchi J, Miyauchi K, Mochizuki A, Matsumiya M. Purification and Characterization of Chitinase Isozymes from a Red Algae, *Chondrus verrucosus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(12), 3091–3099. doi:10.1271/bbb.80141;
75. Proespraiwong P., Tassanakajon A., Rimphanitchayakit V. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: Phylogenetics, expression and activities. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. 2010;156:86–96. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.02.007.
76. Zhang J., Sun Y., Li F., Huang B., Xiang J. Molecular characterization and expression analysis of chitinase (Fcchi-3) from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Biol. Rep.* 2010;37:1913–1921. doi: 10.1007/s11033-009-9633-0.
77. Wang, J., Zhang, J., Song, F., Gui, T., & Xiang, J. Purification and Characterization of Chitinases from Ridgetail White Prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Molecules*. 2015. 20(2), 1955–1967. doi:10.3390/molecules20021955
78. Hao, Z., Wu, H., Yang, M., Chen, J., Xi, L., Zhao, W., ... Huang, Q. Cloning, Expression and 3D Structure Prediction of Chitinase from Chitinolytic bacter *meiyuanensis* SYBC-H1. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. 17(6), 825. doi:10.3390/ijms17060825
79. Hao, Z., Cai, Y., Liao, X., Liang, X., Liu, J., Fang, Z., ... Zhang, D. Chitinolytic bacter *meiyuanensis* SYBC-H1T, Gen. Nov., sp. Nov., a Chitin-

Degrading Bacterium Isolated From Soil. *Current Microbiology*, 2011. 62(6), 1732–1738. doi:10.1007/s00284-011-9921-5

80. Songsiriritthigul, C., Lapboonrueng, S., Pechsrichuang, P., Pesatcha, P., & Yamabhai, M. Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. *Bioresource Technology*, 2010. 101(11), 4096–4103. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.036

81. Lu, Y., Wang, N., He, J., Li, Y., Gao, X., Huang, L., & Yan, X. Expression and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from a rare actinomycete, *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015. *Protein Expression and Purification*, 2018. 143, 45–51. doi:10.1016/j.pep.2017.10.013

82. Krolicka, M., Hinz, S. W. A., Koetsier, M. J., Joosten, R., Eggink, G., van den Broek, L. A. M., & Boeriu, C. G. Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1, a Thermostable Enzyme for Chitin and Chitosan Depolymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018. 66(7), 1658–1669. doi:10.1021/acs.jafc.7b04032

83. Shehata, A. N., Abd El Aty, A. A., Darwish, D. A., Abdel Wahab, W. A., & Mostafa, F. A. Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. 107, 990–999. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.071

84. Lockhart, D. E. A., Schuettelkopf, A., Blair, D. E., & van Aalten, D. M. F. Screening-based discovery of *Aspergillus fumigatus* plant-type chitinase inhibitors. *FEBS Letters*. 2014. 588(17), 3282–3290. doi:10.1016/j.febslet.2014.07.015

85. Khan, F. I., Bisetty, K., Singh, S., Permaul, K., & Hassan, M. I. Chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP and its biotechnological applications. *Extremophiles*. 2015. 19(6), 1055–1066. doi:10.1007/s00792-015-0792-8

86. Lobo, M. D., Silva, F. D., Landim, P. G., da Cruz, P., de Brito, T., de Medeiros, S., Grangeiro, T. Expression and efficient secretion of a functional

chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*. 2013. 13(1), 46. doi:10.1186/1472-6750-13-46;

87. Hao, Z., Wu, H., Yang, M., Chen, J., Xi, L., Zhao, W., ... Huang, Q. Cloning, Expression and 3D Structure Prediction of Chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. 17(6), 825. doi:10.3390/ijms17060825;

88. Rishad, K. S., Rebello, S., Shabanamol, P. S., & Jisha, M. S. Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus Pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2017, 137, 36–41. doi:10.1016/j.pestbp.2016.09.005

89. García-Fraga, B., da Silva, A. F., López-Seijas, J., & Sieiro, C. Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CECT 395 in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. 98(5), 2133–2143. doi:10.1007/s00253-013-5124-2;

90. Liu, Z., Huang, Y., Zhang, R., Diao, G., Fan, H., & Wang, Z. Chitinase Genes *LbCHI31* and *LbCHI32* from *Limonium bicolor* Were Successfully Expressed in *Escherichia coli* and Exhibit Recombinant Chitinase Activities. *The Scientific World Journal*. 2013, 1–9. doi:10.1155/2013/648382

91. К.С. Рысакова, В.Ю. Новиков, В.А. Мухин, С.И. Овчинникова. Обнаружение хитинолитической активности в пищеварительных органах гидробионтов Баренцева моря. Вестник МГТУ, том 9, №5, 2006 г. Стр.785-790

92. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://pro-consulting.ua/ua/pressroom/koroleva-krevetok-s-ukrainskoj-propiskoj-podgotovlen-plan-sozdaniya-otechestvennoj-krevetochnoj-fermy>"

93. Huang L, Garbulewska E, Sato K, Kato Y, Nogawa M, Taguchi G, Shimosaka M. Isolation of genes coding for chitin-degrading enzymes in the novel

chitinolytic bacterium, *Chitinophilus shinanonensis*, and characterization of a gene coding for a family 19 chitinase. *J Biosci Bioeng* .2012; 113(3):293-9.[doi:10.1016/j.jbiosc.2011.10.018](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.10.018);

94. М. Д. Мукатова, Н. А. Киричко, Е. Н. Романенкова. Качественные характеристики хитина и хитозана, полученных из панцирьсодержащих отходов речных раков. *Вестник МГТУ*, том 18, № 4, 2015 г. УДК [604.2:577.114]:[664.959.5:639.28]

95. F. Shirazi, M. Kulkarni, M.V. Deshpande. A rapid and sensitive method for screening of chitinase inhibitors using Ostazin Brilliant Red labelled chitin as a substrate for chitinase assay. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254. 2006. [doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02117.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02117.x)

96. *Т.П. Пирог, Ю.М. Пенчук* Технології мікробного синтезу лікарських засобів: метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. напряму підготовки 6.051401 “Біотехнологія” ден. форми навч. - К.: НУХТ. 2014. - 59 с;

97. Оптимум. Компанія чесних цін. Ферментер Minifors для бактерій, грибів, джарджів [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://optimum-lab.ru/product/fermenter-minifors-dlja-bakterij-gribov-drozhzhej-25-i-infors>

98. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F>

99. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.slideshare.net/YuriPenchuk/7-75376046>

100. Харчова біотехнологія: метод. рекомендації до викон. курсов. пр. для студ. осві. ступеня “Бакалавр” спец. 162 “Біотехнології та біоінженерія” ден. форми навч. / уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. - К.: НУХТ, 2017. - 62 с.

101. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://biotechno.ru/catalog/promyshlennyye-separatory/promyshlennyu-separator-dlya-biotekhnologii-mbpx-810h/>

102. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
[https://www.semanticscholar.org/paper/Chitinolyticbacter-meiyuanensis-SYBC-NIT%2C-Gen.-sp.-Hao Cai/9c4c20e0a08e23d8552a7feb4133db2a16f1179f/figure/3](https://www.semanticscholar.org/paper/Chitinolyticbacter-meiyuanensis-SYBC-NIT%2C-Gen.-sp.-Hao%20Cai/9c4c20e0a08e23d8552a7feb4133db2a16f1179f/figure/3)

103. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Гера сименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Гера сименка. — К.: Фірма «ІНКОС», 2006. — 647 с. ISBN 966834734X

104. Капустян А. І., Черно Н. К. Комбіонований метод дезінтеграції мікробної біомаси. *Наукові праці*, Том 81, Випуск 2. УДК 602.4:[577.15:577.114.4]:635.342. 2016

105. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<http://www.oborud.info/product/jump.php?22619&c=1453>

106. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://biotechno.ru/catalog/pilotnaya/sistema-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-model-mf-801/>

107. Грачева, И. М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева, А.Ю. Кривова. – М. :Элевар, 2000. – 512 с.

108. Хроматографічні методи аналізу. Методичні вказівки для студентів, що навчаються за спеціальністю 133 Галузеве машинобудування, спеціалізації "Обладнання переробних і харчових виробництв" ОС Бакалавр - Таврійський державний агротехнологічний університет, 2019. – 20 с.

109. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://studfile.net/preview/4483630/page:13/>

110. Cherkasov, I. A. Affinity Chromatography of Enzymes. *Russian Chemical Reviews*, 41(10), 891–903. 1972. doi:10.1070/rc1972v041n10abeh002101

111. [Електронний ресурс] – Режим доступу:

https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/biofiziki/Library/ion-chrom_lek3.pdf

112. Мікробіол. журн., 2017, Т. 79, № 2 Н.А. Нідялкова, Л.Д. Варбанець, В.В. Шепелевич та ін. «Протеаза Streptomyces sp. 12: Очищення та властивості»
УДК 577.152.34:577.151.5

113. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://biotechno.ru/catalog/vydelenie-i-ochistka-produkta1/sistema-prochrom-varicol-multicolumn>

114. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://studfile.net/preview/5009386/page:26/>

115. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://biotechno.ru/catalog/lioifilnaia-sushka/pilotnaya-lioifilnaya-sushilka-lp20r/>

116. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://uk.rmapack.com/350g-powder-packaging-machine-vertical-form-fill-seal-80-bags-min.html>

117. Куличевская И.С., Наумов Д.Г., Иванов А.А., Ракитин А.Л. , Дедиш С.Н. Выявление хитинолитического потенциала у пресноводного планктомицета Planctomicrobium piriforme. Microbiology (Mikrobiologiya). 2019. Т. 88. № 4. С. 423-432. doi: 10.1134/S0026365619040074

118. Л.Л. Трачук, Т.М . Шемякина , Г.Г. Честухина , В .М . Степанов. Хитиназы BACILLUS CEREUS: выделение и характеристика. Биохимия. Т. 61, вып. 2. УДК 577.152.3

119. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР. Лабораторний практикум: навч. посіб. – К.: НУХТ, 2018. – 274 с.

120. Екологія біологічних систем (екологія мікроорганізмів): навчальний посібник / М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В. Бородай. – Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2014. – 248с.

121. Буценко Л.М., Красінько В.О. Технології мікробного синтезу лікарських засобів. – К.:НУХТ, 2011. – 75с.

122. М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай Екологія біологічних

систем навчальний посібник. - Вінниця: ТОВ "Нілан-ЛТД", 2014. - 248 с.