

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»  
Декан факультету  
Наталія ГРЕГІРЧАК  
(підпис) (ім'я та прізвище)

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

«  »    червня    2024 р.

«  »    червня    2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,  
промислова, харчова, природоохоронна»  
на тему: Біосинтез  $\alpha$ -амілази *Bacillus stearothermophilus*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 3

МАРУХІНА Вікторія Вячеславівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник БУЦЕНКО Людмила Миколаївна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач

(підпис)

Київ – 2024 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова,

харчова, природоохоронна»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МАРУХІНОЇ Вікторії Вячеславівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез  $\alpha$ -амілази *Bacillus stearothermophilus*

керівник роботи док.біол.наук, доц. БУЦЕНКО Людмила  
Миколаївна,

( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи Продукт:  $\alpha$ -амілаза.

Продукт: *Bacillus stearothermophilus*

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика препарату амілази. Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних середовищ. Техніко-економічне обґрунтування  $\alpha$ -амілази. Біосинтез  $\alpha$ -амілази. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Специфікація обладнання для виробництва  $\alpha$ -амілази. Опис технологічної схеми виробництва  $\alpha$ -амілази. Контроль виробництва  $\alpha$ -амілази. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема - 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема - 2 аркуші  
формату А1.

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика препарату амілази	01.03.24 – 06.03.2024	
2	Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних середовищ	07.03.24 – 14.03.2024	
3	Техніко-економічне обґрунтування $\alpha$ -амілази	15.03.24 – 22.03.2024	
4	Біосинтез $\alpha$ -амілази	23.03.24 – 29.03.2024	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.04.24 – 13.04.2024	
6	Специфікація обладнання для виробництва $\alpha$ -амілази	14.04.24 – 19.04.2024	
7	Опис технологічної схеми виробництва $\alpha$ -амілази	20.04.24 – 28.04.2024	
8	Контроль виробництва $\alpha$ -амілази	29.04.24 – 12.05.2024	
9	Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	13.04.24 – 17.05.2024	
10	Графічна частина	18.05.24 – 24.05.2024	
11	Оформлення роботи	25.05.24 – 28.05.24	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

МАРУХІНА Вікторія  
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

БУЦЕНКО Людмила  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу амілолітичного ферменту за використання генно-модифікованого штаму *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB, що росте на глюкозі з отриманням  $\alpha$ -амілази активністю 35 779,5 Од/мл. У даній кваліфікаційній роботі  $\alpha$ -амілазу пропонується використовувати як компонент тіста для виробництва хліба пшеничного.

Обрахована потужність виробництва становить 248,22 м<sup>3</sup> культуральної рідини за рік. Технологічна схема біосинтезу  $\alpha$ -амілази включає допоміжні роботи (підготовку стерильного аераційного повітря, приготування і стерилізація підживлювального розчину (мікроелементів та термолабільних компонентів), підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (п'ять стадій вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup> із коефіцієнтом заповнення 0,6).

У ході написання проекту було підібрано найбільш сучасні методи контролю виробництва  $\alpha$ -амілази, а також розроблено карту постадійного контролю з метою підвищення безпеки та уникнення контамінації протягом усього виробництва.

Як метод ідентифікації амілази представлено визначення її амілолітичної активності. Описано показники якості амілази – зовнішній вигляд, розчинність амілази, вміст білка, кількісний вміст, питома активність.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів та списку літератури із 85 найменувань. Загальний обсяг роботи – 111 сторінок. У даній роботі міститься 8 рисунків та 15 таблиць. Графічна частина включає технологічну (1 аркуш формату А1) та апаратурну схеми (2 аркуші формату А1).

**Ключові слова:** *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB,  $\alpha$ -амілаза, виробничий синтез, підживлювальний розчин, генно-модифіковані мікроорганізми, амілолітична активність, стічні води, утилізація.

## ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and hardware schemes for the biosynthesis of an amylolytic enzyme using a genetically modified strain of *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB, which grows on glucose to produce  $\alpha$ -amylase with an activity of 35,779.5 U/ml. In this qualification work,  $\alpha$ -amylase is proposed to be used as a dough component for the production of wheat bread.

The estimated production capacity is 248.22 m<sup>3</sup> of culture liquid per year. The technological scheme for the biosynthesis of  $\alpha$ -amylase includes auxiliary works (preparation of sterile aeration air, preparation and sterilization of nutrient solution (trace elements and thermolabile components), preparation and sterilization of culture media) and the technological process (five stages of growing seed and biosynthesis in a 10 m<sup>3</sup> fermenter with a filling factor of 0.6).

In the course of writing the project, the most modern methods of controlling the production of  $\alpha$ -amylase were selected, and a step-by-step control map was developed to improve safety and avoid contamination throughout the production process.

As a method of amylase identification, the determination of its amylolytic activity is presented. The quality indicators of amylase are described: appearance, solubility of amylase, protein content, quantitative content, specific activity.

The qualification work consists of an introduction, nine chapters and a list of 85 references. The total volume of the work is 111 pages. This work contains 8 figures and 15 tables. The graphic part includes technological (1 sheet of A1 format) and hardware diagrams (2 sheets of A1 format).

Keywords: *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB,  $\alpha$  amylase, production synthesis, nutrient solution, genetically modified microorganisms, amylolytic activity, wastewater, utilization

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТУ АМІЛАЗИ.....	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, СКЛАДУ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ.....	15
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ $\alpha$ -АМІЛАЗИ.....	25
3.1. Потреба в $\alpha$ -амілазі .....	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва $\alpha$ -амілази .....	27
3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера.....	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу з метою проведення біосинтезу $\alpha$ -амілази .....	30
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ $\alpha$ -АМІЛАЗИ .....	34
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	34
4.2. Біотрансформація ростового субстрату в амілазу .....	36
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	41
5.1. Вибір умов і способу культивування .....	41
5.2. Вибір типу ферментера.....	43
5.3. Обґрунтування стадій підготовки стерильного аераційного повітря....	43
5.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва амілази .....	46
5.5. Обґрунтування способу приготування та стерилізації компонентів поживного середовища для вирощування <i>Bacillus stearothermophilus</i> WHS9GSAB .....	56
5.5.1. Вирощування інокуляту у колбах на качалці .....	60
5.5.2. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах та посівному апараті .....	61
5.5.3. Виробничий біосинтез $\alpha$ -амілази у ферментері об'ємом 10 м <sup>3</sup> .....	64
5.6. Обґрунтування вибору розчинів титрувальних агентів та піногасників .....	65
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА $\alpha$ - АМІЛАЗИ.....	67

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА $\alpha$ -АМІЛАЗИ .....	71
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА $\alpha$ -АМІЛАЗИ .....	81
8.1. Мікробіологічний контроль .....	81
8.2. Контроль показників росту та синтезу цільового продукту .....	83
8.2.1. Визначення концентрації біомаси .....	83
8.2.2. Визначення активності $\alpha$ -амілази .....	83
8.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецю .....	84
8.2.4. Визначення концентрації джерела азоту .....	84
8.3. Карта постадійного контролю виробництва $\alpha$ -амілази .....	86
8.4. Методи ідентифікації амілази .....	90
8.5. Показники якості амілази .....	92
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА .....	94
9.1. Система знешкодження рідких відходів .....	94
9.2. Система знешкодження газоподібних відходів .....	97
9.3. Система знешкодження твердих відходів .....	100
ЛІТЕРАТУРА .....	101

## ВСТУП

Ферменти це біокаталізатори, які є ключовою частиною життя, оскільки вони відіграють важливу роль у всіх біологічних реакціях. Амілаза є одним з найбільш незамінних ферментів, які мають широке застосування в лабораторіях і промисловості, даний фермент широко застосовується в харчовій та текстильній промисловості, в основному використовується для переробки крохмалю, виробництво миючих засобів, паперу, та виробництво паливного спирту [1].

Амілази виробляються багатьма тваринами, рослинами, бактеріями, пліснявою та грибами, але переважно в багатьох сучасних біотехнологічних цілях в основному  $\alpha$ -амілази синтезується за використання мікроорганізмів, таких як бактерії, гриби та дріжджі [2].

Хліб та хлібобулочна продукція посідають важливе місце в раціоні населення України, оскільки вони призначені для щоденного задоволення фізіологічних потреб людей. Проте диференціація потреб споживачів залежно від їх доходу, уподобань, можливостей вживання різних видів хліба та хлібобулочних виробів внаслідок особливостей їх здоров'я актуалізує питання розширення товарного асортименту виробників хліба та хлібобулочних виробів шляхом втілення у їх діяльність інноваційних підходів [3].

Щороку врожай пшениці збільшується, що призводить до погіршення її якості. Тому виникає необхідність покращення властивостей пшеничного борошна. В європейських країнах для цього широко використовують внесення екзогенних ферментів у пшеничне борошно безпосередньо на борошномельних заводах, що дозволяє отримувати з низькосортного борошна борошно високої якості.

					НУХТ БТЕК 04.03.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ док.ум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Марухіна В.В.			Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					8	2
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

Для борошномельних заводів використання ферментів — це ефективний та економічно доцільний засіб, що дозволяє максимально використати потенціальні можливості сировини. Такими ферментами є амілази, що використовують для перетворення крохмалю в цукор і отримання декстринів [4].

Отже, **новизною даної кваліфікаційної роботи** є використання бактеріального штаму *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB, що характеризується високою амілолітичною активністю (35 779,5 Од/мл), з метою одержання амілази для випікання хліба пшеничного із покращеними показниками якості.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТУ АМІЛАЗИ

$\alpha$ -Амілаза ( $\alpha$ -1,4-глюкан-4-глюканогідролаза, КФ 3.2.1.1) – фермент класу гідролаз, який каталізує гідроліз  $\alpha$ -1,4-глікозидних зв'язків у молекулах крохмалю, результатом чого є утворення декстринів, які складаються з мальтози, мальтотріози та розгалужених олігосахаридів, молекули яких включають 6-8 залишків глюкози. При цьому, даний фермент не може каталізувати реакції відщеплення кінцевих залишків глюкози та розщеплення  $\alpha$ -1,6-глікозидних зв'язків.  $\alpha$ -амілаза є кальційвмісним ферментом, молекула якого складається з 512 амінокислотних залишків і може мати масу від 43 до 135 кДа, залежно від джерела отримання ферменту. Тривимірна структура цього білка включає три домени (рис. 1.1): А (найбільший), В (з'єднаний з доменом А дисульфідним зв'язком) і С (домен з невідомою функцією, з'єднаний з доменом А за допомогою поліпептидного ланцюга). Активний центр ферменту розташований між С-кінцями доменів А і В. Між доменами А і В також розміщені катіони кальцію, які можуть брати участь у стабілізації тривимірної структури або бути алостеричним активатором [5]. На роботу  $\alpha$ -амілази можуть чинити вплив й інші катіони металів: катіони марганцю (II) та магнію підвищують активність цього ферменту, в той час як катіони натрію, калію, міді (II), заліза (II), цинку та, особливо, ртуті чинять негативну дію [6].

					НУХТ БТЕК 04.03.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика препарату амілази	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Марухіна В.В.					10	5
Перевір.		Буценко Л.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			



Рис. 1.1. Тривимірна структура  $\alpha$ -амілази (червоним кольором позначено домен А, жовтим – домен В, темно-синім – домен С).

Джерелом  $\alpha$ -амілази можуть бути мікроорганізми, рослини та навіть вищі організми, однак, станом на сьогодні, в промисловості здебільшого використовуються  $\alpha$ -амілази мікробного походження [6]. Продуцентами цього ферменту можуть бути різні види мікроорганізмів: бактерії роду *Bacillus*; галофільні бактерії *Chromohalobacter sp.*, *Halobacillus sp.*, *Haloarcula hispanica*, *Halomonas meridiana*, *Bacillus dipsosauri*; гриби родів *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae*), *Penicillium*, а також *Thermomyces lanuginosus*. Незважаючи на те, що  $\alpha$ -амілази грибного походження є безпечнішими для використання (мають статус GRAS – Generally Recognized As Safe), в промисловості в основному застосовуються  $\alpha$ -амілази, що синтезуються бактеріями роду *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* та *B. amiloliquefaciens*), оскільки ці ферменти характеризуються високою термостабільністю. Взагалі,  $\alpha$ -амілази можуть мати різні властивості (оптимум температури, рН, залежність від катіонів кальцію), залежно від галузі застосування. Наприклад,  $\alpha$ -амілази, що застосовуються для гідролізу крохмалю, мають бути стабільними й активними за низьких значень рН (кисле середовище), а ті, що використовуються в мийних засобах – за високих

значень (лужне середовище). Важливим також є біологічний агент, за допомогою якого отримано фермент: бактеріальні  $\alpha$ -амілази мають оптимум рН, близький до нейтрального (5,0-9,0), і температурний оптимум у діапазоні 30-80 °С, у той час як грибні краще працюють за слабкокислих умов (рН 5,0-6,0) і температури 30-60 °С [5].

При дії  $\alpha$ -амілази на амілозу її макромолекула спочатку розпадається на декстрини середнього розміру зі ступенем полімеризації 6-10 ( $\alpha$ -декстрин), які в подальшому розщеплюються на низькомолекулярні декстрини і мальтозу. При дії  $\alpha$ -амілази на амілозу може відбутися також відрив одного, двох або трьох глюкозних залишків. Таким чином,  $\alpha$ -амілаза здатна повністю перетворити амілозу в мальтозу, мальтотріозу і невелику кількість глюкози. При дії  $\alpha$ -амілази на амілопектин крохмалю утворюється мальтоза і низькомолекулярні декстрини з 5-8 глюкозидними зв'язками [7].

$\alpha$ -Амілаза – фермент, який наразі використовується в багатьох галузях промисловості. Донедавна використовували  $\alpha$ -амілазу *Bacillus amyloliquefaciens*, однак зараз її все частіше замінюють  $\alpha$ -амілазою *Bacillus stearothermophilus* або *Bacillus licheniformis* через кращу термостабільність [1]. Прикладом такого препарату є Termamyl SC DS, який являє собою термостабільну  $\alpha$ -амілазу (температурний оптимум – 90 °С) в рідкому вигляді [8].

$\alpha$ -Амілази користуються попитом і в харчовій промисловості, зокрема, у виробництві хліба. Додавання  $\alpha$ -амілази до тіста забезпечує розщеплення крохмалю до декстринів (які в подальшому легко піддаються бродінню хлібопекарськими дріжджами), сприяє зниженню в'язкості тіста, покращенню смаку та кольору скоринки й підвищенню терміну придатності хлібобулочних виробів.

У хлібопекарській справі може бути використаний препарат Novamyl, застосування якого може знизити потребу додавати емульгатори або моногліцериди, а також убезпечити хлібобулочні вироби від швидкого черствіння. Препарат Novamyl BestBite розроблений компанією Novozymes

(Данія) та містить у своєму складі ензим, спрямований на покращення текстури та терміну зберігання хлібобулочних виробів, зменшення харчових відходів і обмеження використання доданого цукру в хлібі [9].

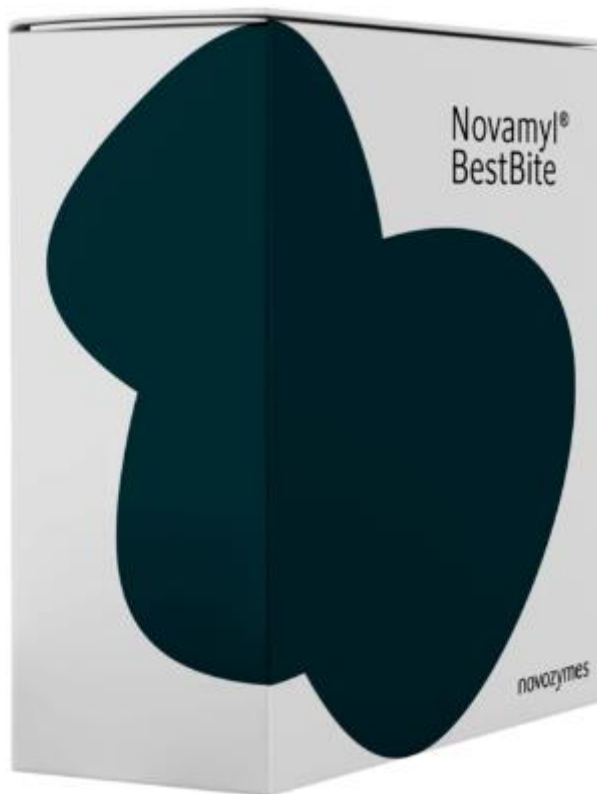


Рис. 1.2. Novamyl ® BestBite [9].

Препарат Novamyl BestBite являє собою гранулят амілази (амілоглюкозидази) [10].

Препарат  $\alpha$ -амілази має забезпечувати такі передбачувані властивості хліба [11]:

- біла чи білувато-жовта м'якушка, стійка форма хлібини, подовження терміну зберігання хлібобулочного виробу;

- золотиста та однорідна без тріщин скоринка, внаслідок включення до складу комплексного поліпшувача альфа-амілази, що підвищує цукроутворюючу здатність борошна і, відповідно, бродильну активність дріжджів, збільшує набухання колоїдів борошна, прискорює термін виробництва;

- пухка збільшена в об'ємі хлібина порівняно з початковою тістовою заготовкою до запікання, завдяки наявності хлібопекарських дріжджів;

- відчуття ситості (насичення);
- інтенсивно забарвлена золотисто-рум'яна скоринка, помірно спущена м'якушка, ніжний солодкий присмак [11].

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, СКЛАДУ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ

$\alpha$ -Амілаза є ферментом класу гідролаз, амілази є одними з найважливіших промислових ферментів, які мають широкий спектр застосувань, починаючи від перетворення крохмалю на цукрові сиропи і закінчуючи виробництвом циклодекстринів для фармацевтичної промисловості. За деякими даними на дані ферменти припадає близько 30% світового виробництва ферментів [12], саме тому вчені постійно проводять дослідження пов'язані з покращенням кінцевих показників синтезу промислового виробництва даного ферменту. Розглянемо порівняльну характеристику наведену в табл. 2.1, в якій наведено перспективних продуцентів  $\alpha$ -амілази. *Bacillus sp.* ВСС 01-50 характеризується найменшим часом культивування (60 год) та найменшим показником активності  $\alpha$ -амілаза (4 500 Од/мл) в порівнянні з іншими продуцентами [13].

*Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB – даний мікроорганізм в порівнянні з *Bacillus sp.* ВСС 01-50 має в 1,55 рази більший час культивування (93 год), а також характеризується в 7,95 рази більшим показником активністю ферменту (35 779,5 Од/мл) [3]. *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB використовується для посиленого позаклітинного виробництва  $\alpha$ -амілази шляхом збалансування всього процесу секреції в оптимальному штамі.

*Pichia pastoris* GS115 характеризується найбільшим показником активності ферменту (38 314 Од/мл), що приблизно в 8,51 та 1,13 рази більше в порівнянні з *Bacillus sp.* ВСС 01-50 та *B. stearothermophilus* WHS9GSAB, відповідно, а також найбільшим часом культивування (194 год) [15].

					НУХТ БТЕК 04.03.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Марухіна В.В.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних середовищ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					15	10
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b> --		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Після ознайомлення з порівняльною характеристикою продуцентів  $\alpha$ -амілази, не можна визначити кращого продуцента, через різні показники активності ферменту, час культивування та склад поживного середовища, тому для детальнішого порівняння, необхідно переглянути вартість поживного середовища даних продуцентів. Вартість 1 л поживного середовища наведено в табл. 2.2.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів  $\alpha$ -амілази

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Активність $\alpha$ -амілази, Од/мл	Час, год	Умови культивування	Література
<i>Bacillus stearothermophilus</i> WHS9GSAB	Соевий пептон (поч./кінц.) – 10 г/л; Кукурудзяний сироп (поч./кінц.) – 10 г/л; Сахароза – 5 г/л; Глюкоза (поч./кінц.) – 500 г/л; Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> – 2 г/л; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 19,2 г/л; Диамонію цитрат – 1 г/л; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 2,68 г/л; Роз. мікроелементів(поч./кінц.) – 3 мл; Склад РМ, г/л: CaCl <sub>2</sub> – 0,5; ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,18 г/л; MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O – 0,1; Na <sub>2</sub> -EDTA – 10,05 г/л; FeCl <sub>3</sub> – 8,35 г/л; CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O – 0,16 г/л; CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O – 0,18 г/л.	35 779,5	93	Вирощування відбувалось в 3 л ферментері при постійному перемішуванні 300 об/хв при температурі 37 °С та рівні рН 7,5, рівень розчиненого кисню 30 %. Під час вирощування відбувалось внесення підживлювального розчину зі швидкістю 1-9 мл/год, також кожні 24 год вносять 20 мг/л тетрацикліну. Підживлювальний розчин містить, г/л: соєвий пептон – 35, кукурудзяний сироп – 35, глюкоза – 500, розчин мікроелементів – 20 мл.	Yao, Dongbang & Zhang, Kang & Su, Lingqia & Liu, Zhanzhi. (2021). Enhanced extracellular <i>Bacillus subtilis</i> $\alpha$ -amylase production in <i>Bacillus stearothermophilus</i> by balancing the entire secretion process in an optimal strain. <i>Biochemical Engineering Journal</i> . 168. 107948. 10.1016/j.bej.2021.107948.
<i>Bacillus sp.</i> BCC 01-50	Меляса – 30; Екстракт яловичини – 15; MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 1; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2.	4 500	60	Вирощування відбувалось в качалочних колбах при постійному перемішуванні 150 об/хв впродовж 60 год при температурі 50 °С та рівні рН 8,0	Simair, A. A., Qureshi, A. S., Khushk, I., Ali, C. H., Lashari, S., Bhutto, M. A., Mangrio, G. S., & Lu, C. (2017). Production and Partial Characterization of $\alpha$ -Amylase Enzyme from <i>Bacillus sp.</i> BCC 01-50 and Potential Applications. <i>BioMed research international</i> , 2017, 9173040. <a href="https://doi.org/10.1155/2017/9173040">https://doi.org/10.1155/2017/9173040</a>

Закінчення таблиці 2.1

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Активність $\alpha$ -амілази, Од/мл	Час, год	Умови культивування	Література
<i>Pichia pastoris</i> GS115	<p>Гліцерол (поч./кінц.) – 40 / 85,7;  <math>K_2SO_4</math> – 18,2;  <math>MgSO_4 \times 7H_2O</math> – 14,9;            KOH – 4,13;  <math>CaSO_4</math> – 0,93;            Метанол (поч./кінц.) – 0 / 422;            Фосфорна кислота 85% – 26,7 мл            Роз. мікроелементів(поч./кінц.) – 4,35 / 8,02            мл;</p> <p>Склад РМ, г/л:  <math>CuSO_4 \times 5H_2O</math> – 6;            NaI – 0,08;  <math>MnSO_4 \times H_2O</math> – 3;  <math>Na_2MoO_4 \times 2H_2O</math> – 0,2;  <math>H_3BO_3</math> – 0,02;  <math>CoCl_2</math> – 0,5;  <math>ZnCl_2</math> – 20;  <math>FeSO_4 \times 7H_2O</math> – 65;            Біотин – 0,2;  <math>H_2SO_4</math> – 50 мл</p>	38 314	194	<p>Вирощування відбувалось в 5 л ферментері при постійному перемішуванні 600 об/хв при температурі 30 °С та рівні рН 4,0, рівень розчиненого кисню 20 %, впродовж перших 20 год після відбувалось внесення підживлювального розчину гліцеролу зі швидкістю 18,4 мл/год/л впродовж 6 год. Після внесення підживлювального розчину гліцеролу впродовж 7 днів проводили індукцію метанолом. Швидкість перемішування становила 800 об/хв а рівень рН 6,0</p>	<p>Wang, Y. C., Zhao, N., Ma, J. W., Liu, J., Yan, Q. J., &amp; Jiang, Z. Q. (2019). High-level expression of a novel <math>\alpha</math>-amylase from <i>Thermomyces dupontii</i> in <i>Pichia pastoris</i> and its application in maltose syrup production. <i>International journal of biological macromolecules</i>, 127, 683–692.  <a href="https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.162">https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.162</a></p>

Таблиця 2.2

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування  
*Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB, *Pichia pastoris* GS115 та *Bacillus*  
*sp.* BCC 01-50**

Продуцент	Компонент поживного середовища	г/л	Ціна компонент а, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1 – 18)*	
<i>Bacillus stearothermophilus</i> WHS9GSAB	Соевий пептон	10	304	6,384	1	
	Кукурудзяний сироп	10	70	1,47	2	
	Сахароза	5	90	0,45	3	
	Глюкоза	500	63,6	14,119	4	
	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	2	60	0,12	5	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	19,2	150	2,88	6	
	Диамонію цитрат	1	114	0,114	7	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,68	50	0,134	8	
	Розчин мікроелементів (PM)	3 мл	2,78	0,0292		
	Розчин мікроелементів – 2,78 грн/л					
		CaCl <sub>2</sub>	0,5	38	0,019	10
		ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,18	64	0,01152	11
		MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,1	63	0,0063	12
		Na <sub>2</sub> -EDTA	10,05	180	1,809	13
		FeCl <sub>3</sub>	8,35	95	0,79325	14
		CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,16	136	0,02176	15
		CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,18	641	0,11538	16
Вартість 1 л середовища – 36,7178 грн						
<i>Pichia pastoris</i> GS115	Гліцерол	85,7	57	4,885	17	
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18,2	67	1,2194	18	
	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	14,9	28	0,4172	19	
	KOH	4,13	120	0,4956	20	
	CaSO <sub>4</sub>	0,93	30	0,0279	21	
	Метанол	422	80	33,76	22	

Закінчення таблиці 2.2

	Фосфорна кислота 85%	26,7	130	3,471	23
	Розчин мікроелементів (РМ)	8,02	12,26	0,0983	
	Розчин мікроелементів – 12,26 грн/л				
	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	6	136	0,816	15
	NaI	0,08	19	0,00152	24
	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	3	63	0,189	12
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,2	1 299	0,2598	25
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,02	72	0,00144	26
	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,5	641	0,3205	16
	$\text{ZnCl}_2$	20	92	1,84	27
	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	65	60	3,9	28
	Біотин	0,2	4 642	0,9284	29
	$\text{H}_2\text{SO}_4$	50 мл	80	4	30
	Вартість 1 л середовища – 44,3744 грн				
<i>Bacillus sp.</i> BCC 01-50	Меляса	30	40	1,2	31
	Екстракт яловичини	15	266	3,99	32
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1	28	0,028	19
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	128	0,256	33
	Вартість 1 л середовища – 5,474 грн				

**Примітка:** \* – Ціни вказано станом на березень 2023 р.

- [https://www.alibaba.com/product-detail/Soybean-extract-Soy-peptone-powder-65\\_1600409788999.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Soybean-extract-Soy-peptone-powder-65_1600409788999.html)
- <https://rozetka.com.ua/ua/211490185/p211490185/>
- <https://www.covalent.com.ua/ru/shop/sucrose/>
- <https://prom.ua/ua/p1519082061-dekstroza-pischevaya-glyukoza.html>
- <https://flagma.ua/uk/natriy-sernistokisly-sulfit-natriya-chda-o2986048.html>
- <https://novohim.com.ua/ru/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/kalij-fosfornokislyj-2-zam/>
- [https://russian.alibaba.com/p-detail/factory-10000008885747.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal\\_offer.d\\_title.1fa31e89Oe89pY](https://russian.alibaba.com/p-detail/factory-10000008885747.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.1fa31e89Oe89pY)
- [https://zakupka.com/p/1452009398-sulfat-ammoniya-ammoniy-sernokislyy-nh4-2so4/?e=1&i=db9o9dAtWkAsOh8dRHXtb1tz\\_9D36AbEvq4C1mBydPL6-UVjAMkEpJwyhGJ2XW3TC6t3wRPfbaCTsstpXItyWnzXlaIOj7NtWN-9zE67NofH0w5x7wQ\\_3KSANodWmKI5jXx95g4wwMx08R0D0n7GSjysXDH-pbg\\_hdlF1hdIy8=&gclid=Cj0KCQjw8e-](https://zakupka.com/p/1452009398-sulfat-ammoniya-ammoniy-sernokislyy-nh4-2so4/?e=1&i=db9o9dAtWkAsOh8dRHXtb1tz_9D36AbEvq4C1mBydPL6-UVjAMkEpJwyhGJ2XW3TC6t3wRPfbaCTsstpXItyWnzXlaIOj7NtWN-9zE67NofH0w5x7wQ_3KSANodWmKI5jXx95g4wwMx08R0D0n7GSjysXDH-pbg_hdlF1hdIy8=&gclid=Cj0KCQjw8e-)

[gBhD0ARIsAJiDsaWpO5gDMKSvHQmTWzT\\_cj5j5zR32BHQXjwXxJg83gAMNgZeC2EVjRgaAhx-EALw\\_wcB](#)

9. <https://www.scientificlabs.co.uk/product/T7660-5G>

10. [https://prom.ua/ua/p1296604649-kaltsij-hloristyj.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaWhBQ3keFrH7dIeXtcSN7M8v2rr03Pe2bPaKvbEYAoNBOxQKjrS26saArdCEALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p1296604649-kaltsij-hloristyj.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaWhBQ3keFrH7dIeXtcSN7M8v2rr03Pe2bPaKvbEYAoNBOxQKjrS26saArdCEALw_wcB)

11. <https://prom.ua/ua/p1530030759-tsink-sernokislyj-tehnicheskij.html?&primelead=MS45>

12. [https://prom.ua/ua/p274731750-sulfat-margantsa-marganets.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaUjujNE3fQgbQ3MDVnAS0aQoVpPYKH1rc3myBbvdZKW2uSKG9mjVScaAoMBEALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p274731750-sulfat-margantsa-marganets.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaUjujNE3fQgbQ3MDVnAS0aQoVpPYKH1rc3myBbvdZKW2uSKG9mjVScaAoMBEALw_wcB)

13. <https://prom.ua/ua/p1293380085-trilon-edta-2na.html?&primelead=My42>

14. [https://www.covalent.com.ua/ru/shop/ferric\\_chloride/](https://www.covalent.com.ua/ru/shop/ferric_chloride/)

15. [https://prom.ua/ua/p269403380-mednyj-kuporos-med.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_05\\_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaWuh1I4gKTBMEV\\_VuR8554XTQHWRLu9zAiXDpvXm1Znyps3ixXxvC4aAoVjEALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p269403380-mednyj-kuporos-med.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_05_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaWuh1I4gKTBMEV_VuR8554XTQHWRLu9zAiXDpvXm1Znyps3ixXxvC4aAoVjEALw_wcB)

16. <https://prom.ua/ua/p1785760990-kobalt-hloristij-vodn.html>

17. [https://prom.ua/ua/p1419740206-glitserin-pischevoj-opt.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD3ARIsANRrqEv3EHIE\\_HPQ9KuKoMb1i9I9UaTceatgNjBw1LYd9tUWeYfLXVaquNEaAptcEALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p1419740206-glitserin-pischevoj-opt.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD3ARIsANRrqEv3EHIE_HPQ9KuKoMb1i9I9UaTceatgNjBw1LYd9tUWeYfLXVaquNEaAptcEALw_wcB)

18. <https://prom.ua/ua/p269175378-sulfat-kaliya-sernokislyj.html>

19. [https://sadvij-raj.com.ua/p646069042-sulfat-magniyu-kitaj.html?source=merchant\\_center&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD3ARIsANRrqEviKHuM5tX8IW2VuFO-rsiUERUBB\\_fbvr7CIn9fEtdjD66K-5bW5TwaAs\\_pEALw\\_wcB](https://sadvij-raj.com.ua/p646069042-sulfat-magniyu-kitaj.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD3ARIsANRrqEviKHuM5tX8IW2VuFO-rsiUERUBB_fbvr7CIn9fEtdjD66K-5bW5TwaAs_pEALw_wcB)

20. [https://prom.ua/ua/p1129758418-kalij-edkij-gidroksid.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaV5Y9gy-16ZA3ZjN0dT4lfUHQzCzGvdRzWQalWk5g7C5sLPKaODb1AaAkj4EALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p1129758418-kalij-edkij-gidroksid.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaV5Y9gy-16ZA3ZjN0dT4lfUHQzCzGvdRzWQalWk5g7C5sLPKaODb1AaAkj4EALw_wcB)

21. <https://m.board.com.ua/m0519-2008822901-sulfat-kaltsiya-pischevoj.html>

22. [https://ekohimstandart.com.ua/p1654645599-metanol-metilovyj-spirit.html?source=merchant\\_center&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaU6lp\\_Ctx0-ndAmjHoSVV88w\\_jIbS7suJvR\\_GISlIWwPXDisMzhVD4aAq0QEALw\\_wcB](https://ekohimstandart.com.ua/p1654645599-metanol-metilovyj-spirit.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaU6lp_Ctx0-ndAmjHoSVV88w_jIbS7suJvR_GISlIWwPXDisMzhVD4aAq0QEALw_wcB)

23. [https://prom.ua/ua/p43923233-ortofosfornaya-kislota-pischevaya.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaU9kx6-wW-i-x9o8d1xA-yWrWZiZDgAPOpb-CSTAQxf486TMAQnglAaAvjfEALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p43923233-ortofosfornaya-kislota-pischevaya.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaU9kx6-wW-i-x9o8d1xA-yWrWZiZDgAPOpb-CSTAQxf486TMAQnglAaAvjfEALw_wcB)
24. <https://prom.ua/ua/p1716961055-edkij-natr.html>
25. <https://prom.ua/ua/p1716959924-molibdat-natriya-natrij.html?&primelead=MC45NQ>
26. <https://reaplus.com.ua/tetraborna>
27. <https://prom.ua/ua/p1586058808-tsink-hloristyj-hlorid.html?&primelead=MS45>
28. [https://mendelev-shop.com.ua/p1033368518-zheleznyj-kuporos-sulfat.html?source=merchant\\_center&gclid=Cj0KCQIAjbagBhD3ARIsANRrqEuQx5MSsg-RHynbSI3cle53siAzD4aG\\_6XuomI2ZLbhAiw1sRetE7oaAmpXEALw\\_wcB](https://mendelev-shop.com.ua/p1033368518-zheleznyj-kuporos-sulfat.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQIAjbagBhD3ARIsANRrqEuQx5MSsg-RHynbSI3cle53siAzD4aG_6XuomI2ZLbhAiw1sRetE7oaAmpXEALw_wcB)
29. <https://prom.ua/p1479898056-biotin-poroshok.html>
30. [https://prom.ua/ua/p1209883872-sernaya-kislota-445.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaVUkyPPUTgeYW7oWXdspcjhSGU0hwTA-cYStjqYSWraCuNzKbv7tJcaAhvbEALw\\_wcB](https://prom.ua/ua/p1209883872-sernaya-kislota-445.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaVUkyPPUTgeYW7oWXdspcjhSGU0hwTA-cYStjqYSWraCuNzKbv7tJcaAhvbEALw_wcB)
31. [https://kramnyca.com.ua/p1123994893-patoka-melassa-sveklovichnaya.html?source=merchant\\_center&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaVOQoU24NkdXbXn6Gw8ynEjZ16ec1OjRjcTEoZcPDmmSuHgc2rCw3waAvJ-EALw\\_wcB](https://kramnyca.com.ua/p1123994893-patoka-melassa-sveklovichnaya.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaVOQoU24NkdXbXn6Gw8ynEjZ16ec1OjRjcTEoZcPDmmSuHgc2rCw3waAvJ-EALw_wcB)
32. [https://www.alibaba.com/product-detail/Beef-Tasteless-Collagen-Protein-Powder-Extracted\\_1600308737123.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Beef-Tasteless-Collagen-Protein-Powder-Extracted_1600308737123.html)
33. [https://ukrhim.com.ua/p1133920722-monofosfat-kaliya.html?source=merchant\\_center&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaVqObUg5irfKRRBAIGe4nbICVtzpq9ZsZO\\_qo-IVr36JiOZTpsrBM8aAqCZEALw\\_wcB](https://ukrhim.com.ua/p1133920722-monofosfat-kaliya.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjw8e-gBhD0ARIsAJiDsaVqObUg5irfKRRBAIGe4nbICVtzpq9ZsZO_qo-IVr36JiOZTpsrBM8aAqCZEALw_wcB)

Розглянувши дані наведені в табл. 2.2, можна дійти висновку що найдорожчим поживним середовищем для промислового виробництва ферменту характеризується *Pichia pastoris* GS115, вартість 1 л поживного середовища становить 44,37 грн/л, приблизно на 17 % дешевша вартість вирощування *Bacillus stearotherophilus* WHS9GSAB (вартість 1 л поживного середовища 36,72 грн/л), та найменшою вартістю вирощування характеризується *Bacillus sp.* ВСС 01-50 (вартість 1 л поживного середовища 5,474 грн/л). Враховуючи що розглянуті продуценти демонструють різні показники активності амілази та вартості 1 л поживного середовища слід

розглянути умовну вартість отриманого ферменту (порівняння умовної вартості 1 Од  $\alpha$ -амілази наведено в табл. 2.3).

Згідно даних наведених в табл. 2.3 можна зробити висновок, що при вирощуванні *Bacillus sp.* ВСС 01-50 умовна вартість 1 Од амілази буде найбільша ( $12,16 \times 10^{-4}$  грн/Од), а кількість синтезованого ферменту найменша (75 Од/год). Кращими показниками в порівнянні з *Bacillus sp.* ВСС 01-50 характеризується *Pichia pastoris* GS115 умовна вартість 1 Од ферменту становить  $11,58 \times 10^{-4}$  грн/Од, а показник синтезованого ферменту становить 197,49 Од/год.

Таблиця 2.3

**Умовна вартість 1 Од  $\alpha$ -амілази при культивуванні *Bacillus stearotherophilus* WHS9GSAB, *Pichia pastoris* GS115 та *Bacillus sp.* ВСС 01-50**

Біологічний агент	Активність $\alpha$ -амілази , Од/мл	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної $\alpha$ -амілази за годину, Од/год	Вартість 1 л середовища, грн	Умовна вартість 1 Од $\alpha$ -амілази, грн/Од
<i>Bacillus stearotherophilus</i> WHS9GSAB	35 779,5	93	384,72	36,7178	$10,26 \times 10^{-4}$
<i>Pichia pastoris</i> GS115	38 314	194	197,49	44,3744	$11,58 \times 10^{-4}$
<i>Bacillus sp.</i> ВСС 01-50	4 500	60	75	5,474	$12,16 \times 10^{-4}$

Найкращими показниками володіє *Bacillus stearotherophilus* WHS9GSAB умовна вартість 1 Од ферменту є найменшою в порівнянні з іншими представниками ( $10,26 \times 10^{-4}$  грн/Од) та кількість синтезованої  $\alpha$ -амілази за 1 год є найбільшою (384,72 Од/год). Також він може ефективно продукувати AmySA, демонструючи позаклітинну активність AmySA 2835,1 Од/мл, шляхом поєднання з надекспресією внутрішньоклітинних молекулярних шаперонів та коекспресією елементів секреторного шляху Sec.

Розглянувши вище наведені дані, можна зробити висновок, що серед розглянутих продуцентів, найкращим біологічним агентом для промислового виробництва  $\alpha$ -амілази є *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB, через найкращий показник умовної вартості синтезованого ферменту ( $10,26 \times 10^{-4}$  грн/Од), та найбільший показник синтезованого ферменту за годину (384,72 Од/год).

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ $\alpha$ -АМІЛАЗИ

### 3.1. Потреба в $\alpha$ -амілазі

Фермент  $\alpha$ -амілаза знаходить безліч застосувань як у лабораторному, так і промислового масштабі виробництва. На частку амілаз припадає приблизно 30% світового ринку ферментних препаратів. Існують такі найбільш відомі застосування  $\alpha$ -амілази, як конверсія крохмалю, харчова промисловість, виробництво миючих засобів, паперова промисловість, текстильна промисловість і виробництво паливного спирту, зокрема біоетанолу [16]. Найбільш поширеним застосуванням  $\alpha$ -амілаз (термостабільних) є використання у розщепленні крохмалю у гідролізати крохмалю, такі як глюкоза і фруктоза. Через їхню високу підсолоджувальну властивість вони використовуються у величезних кількостях у виробництві безалкогольних напоїв в якості підсолоджувачів. Процес розрідження призводить до зниження в'язкості та часткового гідролізу крохмалю, що дозволяє уникнути під час подальшого охолодження [17].

Амілази широко використовуються в різних виробничих процесах у харчовій промисловості, наприклад, у виробництві тістечок, різних засобів для травлення, випічки, крохмальних сиропів, фруктових соків і пивоваріння. У хлібопекарській промисловості  $\alpha$ -амілаза гідролізує крохмаль у хлібному тісті на декстрин, який зброджують дріжджі, в результаті чого в'язкість тіста знижується, а швидкість бродіння збільшується. Крім того, завдяки використанню  $\alpha$ -амілази покращується смак, якість підсмажування та колір скоринки хліба.  $\alpha$ -амілаза покращує збереження м'якості хліба, а також збільшує термін зберігання їжі, оскільки вона функціонує як засіб, що запобігає черствінню [16, 18]. Попередня обробка кормів для тварин є ще одним важливим застосуванням амілаз у харчовій промисловості, оскільки це також

					НУХТ БТЕК 04.03.17 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Марухіна В.В.			РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування $\alpha$ -амілази					
Перевір.		Буценко Л.М.						Літ.	Арк.	Аркушів
Реценз.									25	9
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.								

може бути зроблено для покращення засвоюваності волокна разом із посиленням пива фруктових соків [16, 19].

$\alpha$ -Амілаза в текстильній промисловості використовується в процесі зміни розміру тканин. Проклеювальний агент, крохмаль, наноситься на пряжу перед виготовленням тканини, оскільки він гарантує, що процес ткання протікає як безпечно, так і швидко. У процесі ткання крохмаль запобігає розриву ниток основи, тому діє як зміцнювач. У текстильно-оздоблювальній промисловості крохмаль, присутній на тканині, видаляють за допомогою мокрого процесу за використання  $\alpha$ -амілази. У процесі розшліфовування  $\alpha$ -амілаза частково гідролізує крохмаль, який використовується в процесі плетіння, і перетворює його на водорозчинний компонент. Але якість та властивості волокон залишаються незмінними [20].

Через свою здатність до розщеплення крохмалю,  $\alpha$ -амілаза застосовується у виробництві етанолу. Крохмаль використовується у виробництві етанолу як субстрат, оскільки він економічний і відносно зручніше доступний, ніж інші субстрати, що використовуються у виробництві біопалива.  $\alpha$ -амілаза використовується у другому етапі виробництва спирту шляхом гідролізу крохмалю із подальшим одержанням зброджуваних цукрів. Після цього етапу відбувається бродіння за допомогою *Saccharomyces cerevisiae*, який перетворює ці цукри в етанол [21].

У фармацевтичній галузі  $\alpha$ -амілаза широко використовується як компонент травних тоніків для лікування розладів травлення. Крім того,  $\alpha$ -амілаза, змішана з декстраном або декстрином, знаходить своє застосування у фармацевтичних композиціях. Наприклад, система ферментативно контрольованого вивільнення ліків складається з лікарських форм, до складу яких входять олігосахариди, декстрини,  $\alpha$ -амілаза та ліки в таблетках із зшитою амілозою (CLA). CLA під торговою назвою Contramid - це новий полімерний матеріал, який використовується для контрольованого вивільнення препарату. Синтезується шляхом обробки епіхлоргідрином крохмалю, багатого на 70% вмісту амілози [22].

$\alpha$ -Амілази є другим типом ферментів, які використовуються у складі мийних засобів, і 90% усіх рідких мийних засобів містять ці ферменти. Ферменти  $\alpha$ -амілази використовуються для прання білизни, а також для видалення плям крохмалистих продуктів, таких як шоколад, заварний крем, соуси, картопля та інші менші олігосахариди. Частково очищена  $\alpha$ -амілаза разом із комерційними мийними засобами має потенціал для видалення плям крові [22, 23].

Ринок хліба та хлібобулочних виробів є однією із найважливіших сфер економіки, що має великий потенціал та забезпечує населення основними продуктами харчування. Сьогодні хлібопекарська галузь України за допомогою своїх виробничих потужностей, механізації технологічних процесів та розширення асортименту здатна забезпечити населення різноманітними видами хлібобулочних виробів за прийнятною ціною. Харчова цінність хлібобулочних виробів має велике значення, адже вони забезпечують більше 50% добової потреби людини в енергії і близько 75% потреби у рослинному білку [24].

Хлібопекарські властивості борошна прямо залежать від властивостей білково-протеазного і вуглеводно-амілазного комплексів. Недостатня кількість білку, надмірна пружність або розтяжність клейковини не сприяють утворенню безперервної структури тіста. З іншого боку, важлива роль в отриманні високоякісного хліба належить крохмалю (розмір крохмальних зерен, ступеню їх пошкодження, тобто доступність дії ферментів) і амілолітичної активності, що сприяє розщепленню крохмалю до цукрів і оптимального утворення газу при бродінні [25]. Однак рівень  $\alpha$ -амілази в деяких видах борошна іноді дуже низький, і тому існує потреба в додаванні  $\alpha$ -амілази до пшеничного борошна [26]. Зважаючи на високу цінність та використання  $\alpha$ -амілази у даній галузі, зупиняємо свій вибір саме на ній.

### **3.2. Розрахунок потужності виробництва $\alpha$ -амілази**

Як зазначається у дослідженнях [11], задля покращення органолептичних ознак хліба (пористість м'якушки, колір скоринки та

зовнішній вигляд хліба в цілому) достатньо додати лише 0,005 г  $\alpha$ -амілази до 100 г борошна.

Найбільшим попитом серед українських споживачів користується хліб пшеничний, питома вага якого у загальному обсязі виробництва у 2017 - 2019 р.р. залишалась у розмірі 41% [27]. Споживчий кошик українця передбачає споживання дорослою працездатною людиною 62 кг на рік хлібу пшеничного та 39 кг на рік хлібу житнього [28].

Приймаємо, що тісто масою 1 кг для випікання хліба складається з пшеничного борошна (100 г), солі (2 г), сухих хлібопекарських дріжджів (2 г) та води (65 г) [29]. Попередньо зазначені компоненти у відсотковому співвідношенні:

- 1) борошно – 59,2%;
- 2) сіль – 1,2%;
- 3) дріжджі – 1,2%;
- 4) вода – 38,4%.

Такий показник як «упікання хліба» визначається як різниця маси тіста перед посадкою в піч і маси готового хлібного виробу по завершенню процесу, і коливається в діапазоні від 6 до 14 % [30].

За офіційними даними держстату на території України на початку 2022 року проживало 40979247 осіб. Прийmemo, що зможемо забезпечити невелику частину цього населення, а саме жителів Київської області. Даний показник становить 1789531 осіб. Тож розрахуємо кількість споживаного хліба пшеничного на рік жителями відповідної області:

$$62 \cdot 1789531 = 110\,950\,922 \text{ кг}$$

Величину упікання хліба приймаємо 14 %. Отже, визначимо масу тіста, необхідного для приготування хлібу:

$$110\,950\,922 \text{ кг} - 86\%$$

$$x \text{ кг} - 100\%$$

$$x = \frac{110\,950\,922 \cdot 100}{86} = 129\,012\,700 \text{ кг}$$

Маса борошна, потрібна для попередньо одержаної кількості тіста, становить:

$$\begin{aligned} 129\,012\,700 \text{ кг} &- 100\% \\ x \text{ кг} &- 59,2\% \\ x &= \frac{129\,012\,700 \cdot 59,2}{100} = 76\,375\,518,4 \text{ кг} \end{aligned}$$

Маса  $\alpha$ -амілази, потрібна для розрахованої кількості борошна:

$$\begin{aligned} 0,005 \text{ г} &- 1 \text{ кг} \\ x \text{ г} &- 76\,375\,518,4 \text{ кг} \\ x &= \frac{76\,375\,518,4 \cdot 0,005}{1} = 381\,877,6 \text{ г} \end{aligned}$$

Отже, після проведених обрахунків, можна зробити висновок, що для забезпечення потреб хлібом жителів Київської області, потрібно отримати 381,878 кг  $\alpha$ -амілази.

Оскільки авторами статті [14] не зазначається концентрація відповідного ферменту, синтезованого *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB, умовно приймаємо такий показник як 2 г/л. Об'єм культуральної рідини складатиме:

$$381\,877,6 / 2 = 190\,938,8 \text{ л} = 190,938 \text{ м}^3$$

Також потрібно врахувати втрати при виділенні ферменту, що складають 30 %. Тому кількість культуральної становитиме:

$$190,938 \cdot 1,3 = 248,22 \text{ м}^3$$

### 3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл біосинтезу, аби у подальшому розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів – 200, тоді об'єм культуральної рідини за добу складатиме:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 248,22 / 200 = 1,24 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \cdot 1,24 \cdot 101) / 24 = 5,74 \text{ м}^3/\text{цикл},$$

де  $T_{\text{цф}}$  – цикл роботи ферментера, який включає в себе тривалість виробничого біосинтезу (93 год) та час підготовки ферментера до роботи (8

год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ).

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

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення  $K_3$ , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_3 = 5,74/0,6 = 9,57 \text{ м}^3.$$

Відповідно до даних щодо розмірів стандартних ферментерів, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер  $V_{\Phi} = 10 \text{ м}^3$ .

На наступному етапі уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 5,74/10 = 0,574 - \text{не перевищує заданого значення}$$

### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу з метою проведення біосинтезу $\alpha$ -амілази**

Як попередньо зазначалося, за один виробничий цикл отримують  $5,74 \text{ м}^3$  культуральної рідини.

При отриманні культуральної рідини слід враховувати втрати цієї рідини через видалення крапель через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15 відсотків.

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

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\Phi}) = 5,74/0,9 = 6,38 \text{ м}^3,$$

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

Отже, робочий об'єм ферментера перед біосинтезом дорівнює  $6,38 \text{ м}^3$ . За попередньо обраного коефіцієнта заповнення 0,6 геометричний об'єм ферментера складатиме:  $V_{\Phi} = 6,38/0,6 = 10,6 \text{ м}^3$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 10 \text{ м}^3$ .

$$\text{Уточнюємо коефіцієнт заповнення: } K_{31} = 6,38/10 = 0,638.$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді об'єм поживного середовища для біосинтезу у виробничому ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 6,38 / (1 + 0,1) = 5,8 \text{ м}^3,$$

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

Тому кількість посівного матеріалу становить:  $V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 6,38 - 5,8 = 0,58 \text{ м}^3$ .

Також слід передбачити, що під час одержання  $0,58 \text{ м}^3$  інокуляту в посівному апараті 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тому об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 0,58 / 0,9 = 0,64 \text{ м}^3.$$

Обрахований об'єм інокуляту  $0,64 \text{ м}^3$  за коефіцієнта заповнення 0,6 можна одержати в посівному апараті об'ємом:  $V_{\text{па2}} = 0,64 / 0,6 = 1,07 \text{ м}^3$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{с.ін1}} = 1 \text{ м}^3$ .

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді об'єм поживного середовища для одержання інокуляту у посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 0,64 / (1 + 0,1) = 0,58 \text{ м}^3,$$

де  $X_{\text{ф}} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Звідси випливає, що кількість посівного матеріалу:  $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,64 - 0,58 = 0,06 \text{ м}^3 = 60 \text{ л}$ .

З урахуванням втрат 10% культуральної рідини через краплевинос через колектор відпрацьованого повітря, об'єми поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті будуть наступними:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / 0,9 = 60 / 0,9 = 67 \text{ л}.$$

Об'єм інокуляту 67 л за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в інокуляторі об'ємом:  $V_{\text{ін1}} = 67 / 0,6 = 111,67 \text{ л}$ . Обираємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{с.ін2}} = 100 \text{ л}$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:  $K_{3,3} = 67 / 100 = 0,67$ .

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде складати:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 67 / (1 + 0,1) = 60,91 \text{ л,}$$

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

Звідси кількість посівного матеріалу:  $V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 67 - 60,91 = 6,09 \text{ л.}$

З урахуванням того, що під час одержання 6,09 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено у процесі краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / 0,9 = 6,09 / 0,9 = 6,77 \text{ л.}$$

Об'єм інокуляту 6,77 л за коефіцієнта заповнення 0,6 можна отримати в інокуляторі об'ємом:  $V_{\text{ін2}} = 6,77 / 0,6 = 11,3 \text{ л.}$  Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{с.ін2}} = 10 \text{ л.}$

$$\text{Уточнюємо коефіцієнт заповнення: } K_{3,4} = 6,77 / 10 = 0,67.$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 6,77 / (1 + 0,1) = 6,15 \text{ л,}$$

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

Звідси кількість посівного матеріалу:  $V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 6,77 - 6,15 = 0,62 \text{ л.}$

Для одержання посівного матеріалу  $V_{\text{пм4}} = 0,62 \text{ л}$  для засіву малого інокулятора можна культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього обираємо качалочні колби об'ємом  $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$  з коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зк}} = 0,2$ .

Тоді кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}) = 620 / (750 * 0,2) = 5 \text{ колб}$$

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу  $\alpha$ -амілази бактеріальним штамом *B. stearotherophilus* WHS9GSAB необхідно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом 10 м<sup>3</sup>, посівний апарат об'ємом 1 м<sup>3</sup>, інокулятори по 100 та 10 л та 5 качалочних колб.

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ $\alpha$ -АМІЛАЗИ

### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Bacillus stearothermophilus*

*Bacillus stearothermophilus* використовує як джерело вуглецю органічні речовини, зокрема сахарозу. Тому, згідно цього і використовуючи онлайн базу даних KEGG був наведений шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса для бактерії *Bacillus stearothermophilus* [31].

Сахароза під дією ферменту  $\beta$ -фруктофуранозидази (КФ 3.2.1.26) перетворюється на D-фруктозу, яка потім за допомогою фруктокінази (КФ 2.7.1.4) перетворюється на D-фруктозо-6-фосфат. Глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9) перетворює D-фруктозо-6-фосфат на D-глюкозо-6-фосфат, а фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2) утворює з D-глюкозо-6-фосфату –  $\alpha$ -D-глюкозо-1-фосфат, який потім залучається до гліколізу.

Далі  $\alpha$ -D-глюкозо-1-фосфат під дією фосфоглюкомутази (КФ 5.4.2.2) перетворюється на  $\alpha$ -D-глюкозо-6-фосфат, де вона за дії глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9) перетворюється на  $\beta$ -D-фруктозу 6-фосфат. Фосфотриозофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перетворення  $\beta$ -D-фруктози 6-фосфат у  $\beta$ -D-фруктозу 1,6-фосфат. Далі фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13) зумовлює перетворення  $\beta$ -D-фруктози 1,6-фосфат на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією триозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат. Гліцеральдегід 3-фосфат, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на гліцерат 1,3-фосфат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат 3-фосфат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат 3-фосфат спричиняє його перетворення на гліцерат 2-фосфат [32].

					НУХТ БТЕК 04.03.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Марухіна В.В.			РОЗДІЛ 4. Біосинтез $\alpha$ -амілази	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					34	7
Реценз.					Кафедра БТМ			
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат 2-фосфат перетворюється на фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) [32].

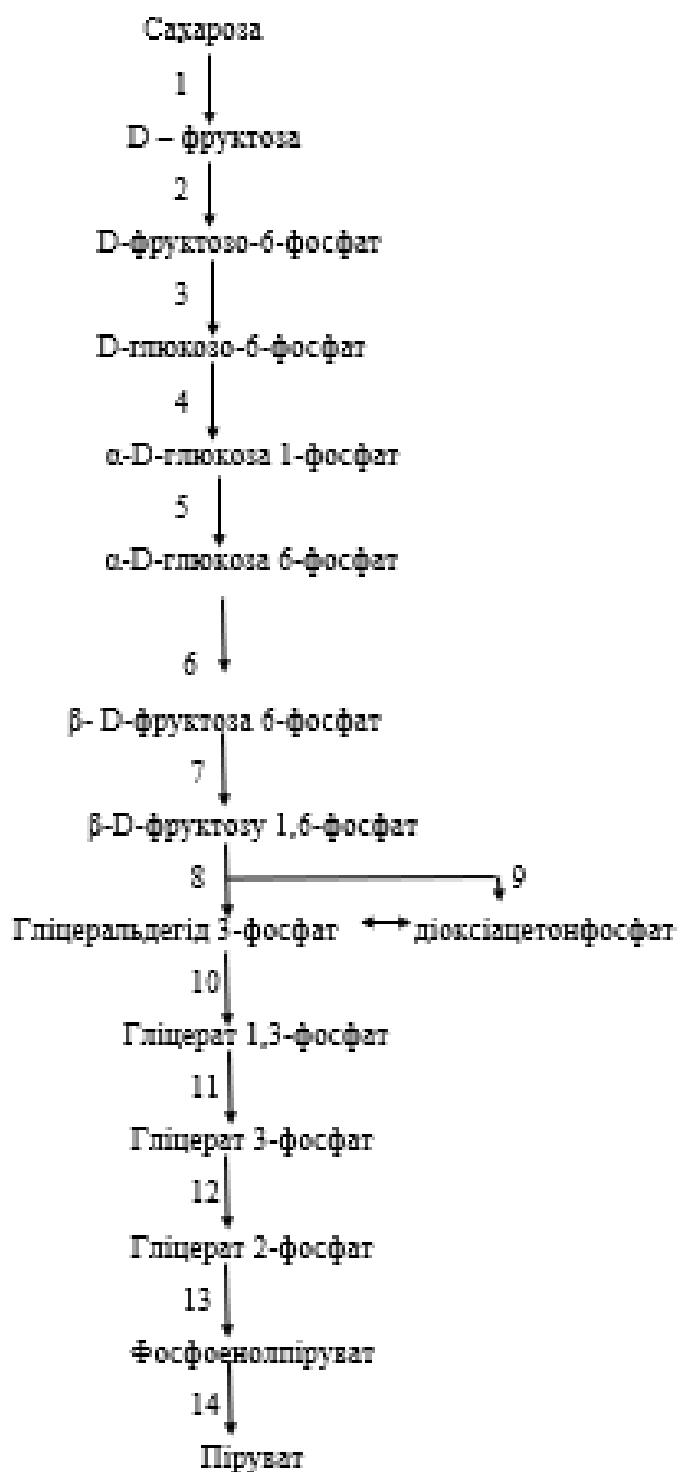


Рис.4.1. Шлях катаболізму сахарози у *Bacillus stearothermophilus*.

**Ферменти:** 1 – β-фруктофуранозідаза (КФ 3.2.1.26); 2 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4); 3 – глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 –

фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 5 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 6 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 7 – фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11); 8 – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 9 – тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 10 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 11 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 12 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 13 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 14 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

#### **4.2. Біотрансформація ростового субстрату в амілазу**

Під час росту *Bacillus stearothermophilus* з використанням сахарози як джерела вуглецю, для подальшого процесу біосинтезу із пірувату утворюється Ацетил-КоА, який потім залучається до ЦТК.

$\alpha$  - амілаза утворюється з протеїногенних амінокислот. Вона містить такі амінокислоти як глютамінова кислота, аспарагінова кислота, аспаратна кислота, гліцин, пролін, фенілаланін, треонін, серин і лізин [33].

Для утворення таких сполук, як 3-фосфогліцерат, піруват, глюкозо-6-фосфат, функціонують реакції глюконеогенезу, ключовим ферментом якого є фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (АТФ) (КФ 4.1.1.49), під дією якого оксалоацетат перетворюється на фосфоенолпіруват.

Біосинтез піримідинових нуклеотидів починається з утворення карбамоїлфосфату, який синтезується через карбамоїлфосфатсинтетази. Рибозо-5-фосфат, утворений у пентозофосфатному циклі, активується шляхом перетворення у 5- фосфорибозил-1-пірофосфат. Реакція 5-фосфорибозил-1-пірофосфату з оротатом дає оротидинмонофосфат, який далі декарбоксилується в уридинмонофосфат. Пуринові нуклеотиди утворюються з імідазольного нуклеотиду, який утворюється з 5 -фосфорибозил-1-пірофосфату. За допомогою бікарбонату, аспартату та формілтетрагідрофолієвої кислоти утворюються атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду. Кільце замикається через інозинмонофосфат [34].

Попередником жирних кислот є Ацетил-КоА. Далі з Ацетил-КоА синтезується Малоніл-КоА, за допомогою ферменту Ацетил-КоА-

карбоксілази. . Малоніл-КоА перетворюється на Малоніл-АПБ, завдяки приєднання АПБ (ацилпереносний білок), який виконує функцію затравки [35].

Пептидоглікан утворюється з УДФ-N-ацетилмурамової кислоти та УДФNацетилглюкозаміну, які синтезуються з глюкозамін-6-фосфату [36].

Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін, ізолейцин) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК.

Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники ароматичних амінокислот – фосфорибозилпірофосфат (попередник гістидину) і еритрозо-4-фосфат. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники фенілаланіну, тирозину і триптофану.

Амінокислоти глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін, лізин) утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).

За допомогою глутаматсинтетази аміногрупа глутаміну може бути перенесена на 2-оксоглутарат з утворенням глутамату. Утворення глутаміну з глутамату каталізується глутамінсинтетазою.

Серин, гліцин та цистеїн синтезуються з 3-фосфогліцерату, пролін – аргінін – із глутамату. Гістидин синтезується через глутамат [37].

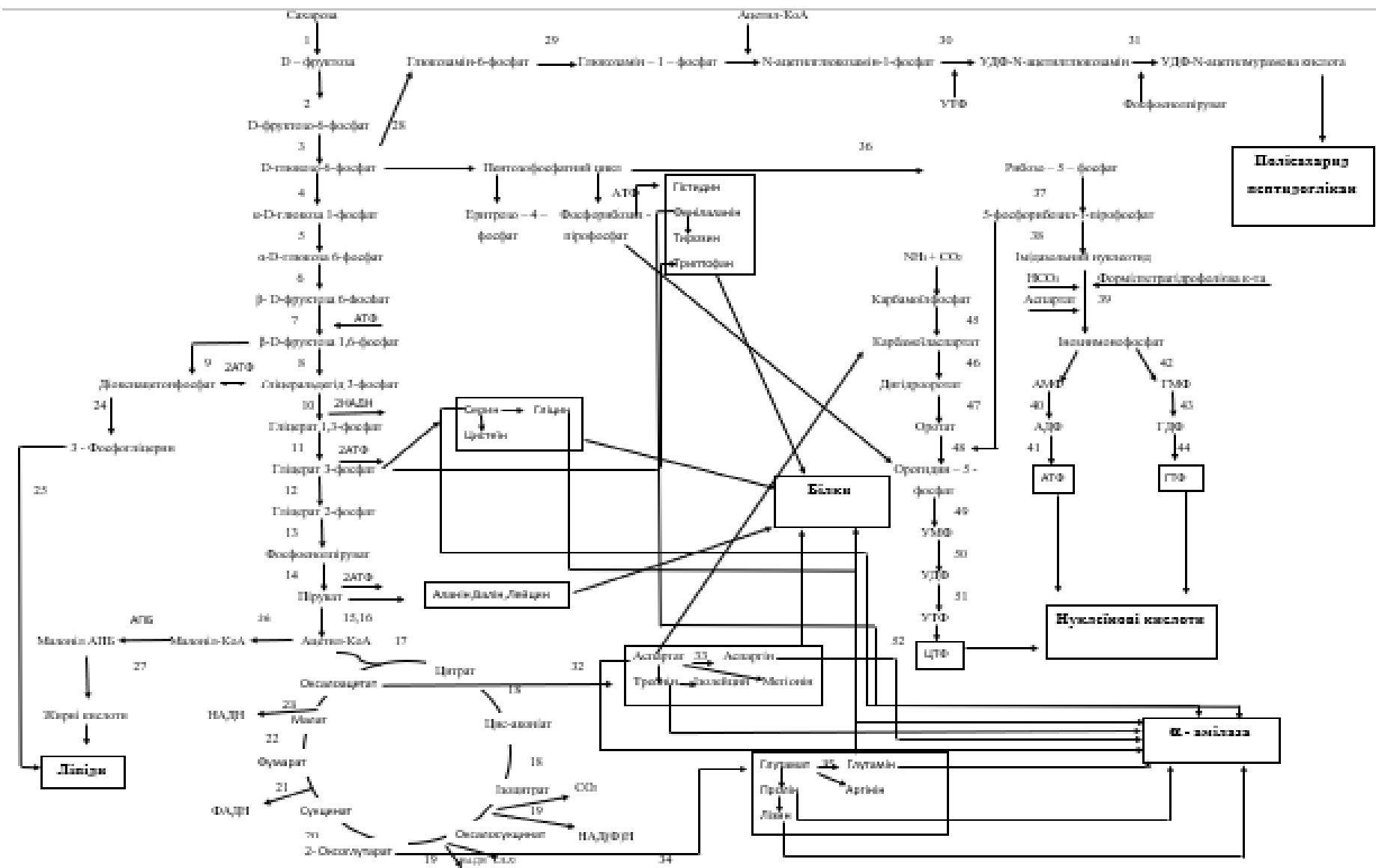


Рис. 4.2. Схема біосинтезу ферменту α-амілази, починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату.

**Ферменти:** 1 –  $\beta$ -фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26); 2 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4); 3 – глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 5 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 6 – глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 7 – 6-фосфотриозофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 8 – фруктозо-1,6-бісфосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 9 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 10 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 11 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 12 – 2,3-бісфосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 13 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 14 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 15 - альфа-субодиниця компонента піруватдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.1); 16 – компонент піруватдегідрогенази E2 (КФ 2.3.1.12); 17 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 18 – аконітат гідратаза 2 (КФ 4.2.1.3); 19 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 20 - сукциніл-КоА:ацетат-КоА-трансфераза (КФ 2.8.3.18); 21 - Субодиниця цитохрому b сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1); 22 - фумаратгідратаза I (КФ 4.2.1.2); 23 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.5.4); ); 24 – гліцерин-3-фосфатдегідрогеназа (НАД(Ф)+) (КФ 1.1.1.94); 25 - фосфатидилгліцерофосфатаза A (КФ 3.1.3.27); 26 – ацетил-КоА карбоксилаза карбоксилтрансфераза субодиниця альфа (КФ 6.4.1.2); 27 - малоніл КоА-ацил трансацилаза (КФ 2.3.1.39); 28 - глютамін-фруктозо-6-фосфат трансаміназа (КФ 2.6.1.16); 29 – глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.157); 30 - біфункціональна УДФ-N-ацетилглюкозамінпірофосфорилаза (КФ 2.7.7.23); 31 - УДФ-N-ацетилмураматдегідрогеназа (КФ 1.3.1.98); 32 - L-аспартатоксидаза (КФ 1.4.3.16); 33 - аспарагінсинтаза (гідролізує глютамін) (КФ 6.3.5.4); 34 - великий ланцюг глютаматсинтази (НАДФ) (КФ 1.4.1.13); 35 - глютамінсинтетаза (КФ 6.3.1.2); 36 - рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 37 - амідифосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.14); 38 - фосфорибозиламін-гліцинлігаза (КФ 6.3.4.13); 39 - фосфорибозиламіноімідазолкарбоксамід формилтрансфераза (КФ 3.5.4.10); 40 - аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3); 41 - нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 42 - Синтаза ГМФ (гідролізуюча глютамін) (КФ 6.3.5.2); 43 - гуанілаткіназа (КФ

2.7.4.8); 44 - нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 45 - каталітична субодиниця аспартаткарбамоїлтрансферази (КФ 2.1.3.2); 46 -дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3); 47 - Дигідрооротатдегідрогеназа 2; (КФ 1.3.98.1); 48 – оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10); 49 – оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.23); 50 - оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.23); 51 – нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 52 - СТР-синтаза (КФ 6.3.4.2).

## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1. Вибір умов і способу культивування

Вибір способу та умов культивування залежить від фізіолого-біохімічних особливостей штаму продуцента, тому для вибору основних аспектів виробничого синтезу розглянемо характеристику *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB.

Оптимальна температура культивування даного штаму становить 37 °С, а рівень рН 7,5, з чого можна зробити висновок що даний продуцент є мезофільним нейтрофілом. З даного факту можна зробити висновок, що умови культивування є сприятливими для більшості мікроорганізмів, що сприяє великому ризику контамінації. Тому, для усунення можливої контамінації процес культивування пропонується проводити в асептичних умовах.

Також враховуючи що  $\alpha$ -амілаза є вторинним метаболітом, тобто накопичується поза клітинами, а максимальна активність ферменту спостерігається в стаціонарній фазі росту, для способу культивування оптимально обрати глибинний метод з періодичним культивуванням.

По відношенню до кисню представники *Bacillus stearothermophilus* є факультативними анаеробами, що означає що вони можуть рости як з доступом кисню так і без нього, але враховуючи дані переглянуті під час обрання оптимального продуцента, а саме наявність аерації, можна зробити висновок що для синтезу  $\alpha$ -амілази необхідна постійна аерація. Так як культивування буде відбуватись в асептичних умовах, слід передбачити стерилізацію повітря та його подальшу подачу в ферментер.

					НУХТ БТЕК 04.03.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Марухіна В.В.			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					41	26
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Також слід врахувати, що для стадій отримання посівного матеріалу можна використовувати простіше за кількісним та якісним складом поживне середовище, так як на даному етапі необхідно буде отримати лише біомасу, а наведений в попередніх розділах склад поживного середовища є оптимізованим науковцями для надсинтезу амілази, отже, можна зробити висновок, що використання даного середовища для отримання інокуляту буде недоцільним через використання даного поживного середовища неповною мірою.

В статті [14] було продемонстровано що для надсинтезу  $\alpha$ -амілази необхідно вносити додаткову кількість джерела вуглецю та азоту, так при культивуванні без внесення підживлювального розчину спостерігався менший кінцевий вихід продукту в порівнянні з внесенням підживлювального розчину. В якості підживлювального розчину вчені використовували розчин з наступним компонентним складом: глюкоза, соєвий пептон, кукурудзяний сироп та розчин мікроелементів. Внесення підживлювального розчину відбувалось автоматично, часові проміжки не описано, але в статті наведено, що внесення розчину відбувалось з 7 год культивування, і підтримувалось для забезпечення постійної концентрації глюкози 0,5 г/л. Отже, можна дійти висновку, що для збільшення активності  $\alpha$ -амілази потрібно вносити підживлювальний розчин починаючи з 7 год культивування, та необхідно під час синтезу рівномірно розподілити його на весь процес виробничого культивування (процес синтезу відбувається 93 год, врахуємо початкові 7 год та останні 2 год,  $93 - 7 - 2 = 84$  год коли необхідно вносити підживлювальний розчин, для рівномірного розподілу можна взяти інтервал 3 год, тоді кількість внесення підживлювального розчину буде становити 28 разів, приблизно по 64,3 л).

Підсумовуючи вище наведену інформацію, можна зробити висновок що процес виробничого біосинтезу  $\alpha$ -амілази культивуванням *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB буде відбуватись періодично глибинним

методом в асептичних умовах з постійним внесенням стерильного повітря та подачею підживлювального розчину.

## **5.2. Вибір типу ферментера**

Вибір типу ферментера в основному залежить від умов культивування, тому слід врахувати обрані умови культивування в попередньому пункті.

Для біосинтезу було встановлено необхідність постійного внесення стерильного повітря, так як процес культивування буде відбуватись глибинним методом, необхідно передбачити наявність в ферментері барботера (через який будуть подавати стерильне повітря), а також необхідно встановити над барботером мішалку, яка буде покращувати розподіл повітря в товщі води.

Процес культивування слід проводити з постійним підтриманням оптимальної температури, отже, ферментер повинен бути оснащений сорочкою, в яку буде подаватись пара для нагріву, або холодна вода для охолодження культуральної рідини всередині.

Також під час культивування необхідно підтримувати певний рівень температури (37 °C) та рівень рН (7,5), для цього необхідно передбачити встановлення датчиків рівня рН та температури.

Отже, виробничий ферментер повинен оснащуватись датчиками рівня рН та температури, сорочкою, барботером та мішалкою.

## **5.3. Обґрунтування стадій підготовки стерильного аераційного повітря**

Обраний продуцент  $\alpha$ -амілази – *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB є факультативним анаеробом, однак для синтезу відповідного ферменту необхідна постійна аерація. Оптимальна температура культивування даного штаму становить 37 °C, а рівень рН 7,5 [14], з чого можна зробити висновок що даний продуцент є мезофільним нейтрофілом. А відповідні умови культивування є сприятливими для більшості мікроорганізмів, що сприяє великому ризику контамінації.

Тому, для усунення можливої контамінації процес культивування пропонується проводити в асептичних умовах. Так як процес біосинтезу буде

відбуватись в асептичних умовах, слід передбачити підготовку стерильного аераційного повітря та його наступну подачу в ферментер. Загальним чином, підготовка повітря проходить ряд послідовних стадій, а саме:

1. На першому етапі виконується забір атмосферного повітря для виробничих процесів за допомогою турбокомпресора, що є стандартним методом у багатьох галузях промисловості. Такий підхід має на меті забезпечити чисте та надійне постачання повітря для процесів, де важлива низька концентрація забруднювачів, таких як мікроорганізми, пил, аерозолі та інші частки. Відповідний процес здійснюється за використанням забірної шахти, на висоті двох-трьох метрів від найвищої точки будівлі. У нашому випадку забір повітря для проєктованого виробництва ферментного препарату здійснюється на висоті 16 м (висота ферментера близько 6 м, висота поверху 6 м, разом із косим дахом будівлі – 13 м, забір проводиться на висоті ~ 3 м від даху будівлі).

2. У свою чергу, для зниження кількості контамінантів повітря далі направляється до фільтрів попереднього очищення, де воно очищається від грубого аерозолу, такого як пил, за допомогою фільтрувального матеріалу [38]. На такому етапі очистки зазвичай використовують фільтрувальні матеріали класу G4. Рулонні повітряні фільтроматеріали класу G4 виготовляються з високоякісної фільтруючої сировини, яка складається з нетканого полотна, зробленого із 100%-го поліестеру і з'єднаного методом термічного скріплення при температурі понад 100°C. Завдяки своїй спеціальній прогресивній структурі, фільтруючий матеріал G4 забезпечує високу ефективність у видаленні пилу і очищенні повітря. Зокрема, обираємо тип матеріалу Verfiltan V4, що підходить до використання в очищенні повітря виробничих приміщень і робочих місць [39].

3. Наступним етапом підготовки повітря є його стиснення. Такий процес проводиться для підвищення тиску та подолання опору фільтрувальних матеріалів на наступних етапах підготовки, а також для подолання гідравлічного опору під час диспергування повітря в культуральній рідині.

Повітря піддається стисненню у турбокомпресорі до рівня 0,35–0,5 МПа. Під час процесу стиснення в компресорі температура повітря підвищується до 120–250°C, а його вологість збільшується на одиницю об'єму.

4. Оскільки попередньо повітря сильно нагрівається, та утворюється великий об'єм води у краплевловлювачі, повітря охолоджують за допомогою водяного теплообмінного апарату.

5. Під час наступного етапу використовують ресивер, що потрібен для остаточного видалення конденсованої вологості та вирівнювання тиску очищеного повітря.

6. Для подальшого очищення повітря, яке направляється до всіх ферментерів цеху і видалення до 98% мікроорганізмів, проводять очищення на головних фільтрах, які заповнюються набивним волокном. Такі фільтри, зазвичай, встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. Головні фільтри заповнюють грубшим волокном, яким, наприклад може слугувати нетканий фільтрувальний матеріал, що також відносять до класу G4 [38]. Зупиняємо свій вибір на фільтруючому матеріалі SYNFASAN C5, що являє собою синтетичний фільтруючий елемент з різним рівнем стиснення. До того ж, C5 додатково просмалений особливою клейкою речовиною, що дозволяє краще вловлювати пил [39].

7. На заключному етапі підготовлене повітря подається через колектори від головних фільтрів і далі піддається очищенню на індивідуальних фільтрах. Такі індивідуальні фільтри, що встановлені безпосередньо на кожному ферментері, здатні затримувати до 99,999% мікроорганізмів. Як фільтрувальні матеріали на даному етапі знаходять своє використання матеріали з ультратонких полімерних волокон [38]. Такими є фільтри класу F5-F9. Фільтроматеріал можна використовувати для виготовлення кишенькових фільтрів, є волого- та вогнестійким, витримує високі температури. Головною перевагою є відсутність силікону й інших лакових шкідливих речовин [40].

Також необхідно не забувати про важливість підготовки повітря у боксах, де здійснюється підготовка посівного матеріалу для вирощування у колбах на качалках. Такі бокси обов'язково обладнані УФ-лампами, за використання яких повітря стерилізують шляхом опромінення ультрафіолетовими променями [38].

#### **5.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва амілази**

Мийні та дезінфікуючі застосовуються для мийки приміщень, обладнання, рук персоналу та інших поверхонь. Бажано чергувати мийні засоби кожні 1-3 місяці для уникнення виникнення резистентності патогенних бактерій та грибів до таких засобів.

*Мийні та дезінфікуючі засоби для обробки поверхонь, приміщень та обладнання*

1) Біопагdez ензим 1л концентрат – новий ефективний дезінфікуючий засіб з комплексом ензимів (ферментів), дезінфекція поверхонь медичних стоматологічних інструментів, для прибирання та дезінфекції приміщень, ПСО Аналог Аніозима ДД1 [41].

**Фірма виробник** – «ДАНА МЕДІКАЛ» (Україна), що виготовляється у відповідності із ТУ У 20.240220141-003:2017.

**Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %:**  
полігексаметиленгуанідін гідрохлориду (ПГМГ ГХ) – 4,0% - 6,0 %, алкілдиметилбензиламонію хлорид – 10,0% – 12,0%; ундецил амідопропиламонійметосульфат (Tetranyl U) – 2,0% - 4,0%; хелатний комплекс, антикорозійний комплекс, рН регулятор, мийні компоненти (що можуть включати без фосфатні тензиди чи за вимогою користувачів ензимний комплекс: амілаза, протеаза, ліпаза), інгібітор корозії, за потреби – комплекс для зниження піноутворення, інші функціональні добавки, вода демінералізована - до 100,0%.

**Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу.** Засіб дезінфікуючий – однорідна прозора рідина, від світло жовтого до зеленого кольору, з нейтральним запахом (за потреби, на вимогу користувачів може

додаватись віддушка, засіб та його робочі розчини набувають запаху віддушки). Величина рН 0,1% - 1,0% розчину – 6,5–10,5. Робочі розчини засобу мають гарні миючі, дезодоруючі, змочувальні, емульгуючі властивості, усуває неприємні запахи, в т.ч. пов'язані із утворенням цвілі, не пошкоджують вироби та поверхні із різноманітних матеріалів: натурального та штучного походження, у т.ч. із корозійностійких та не стійких до корозії металів (в т.ч. з вмістом хрому, нікелю, титану, сплавів кольорових важких металів, анодованого алюмінію, олова, нелегованої листової сталі, латуні, бронзи, низьковуглеводної сталі тощо), цементів, кераміки, металокераміки, гуми, скла, полімерних матеріалів (включаючи штучну шкіру, каучук (будь яких різновидностей), латекс, поліамід, макролон, полівінілхлорид, плексиглас (акрилове скло), полістерол, силікон, альгінат, гідроколоїд тощо), пластмас (різноманітних видів); (дерева, кахелю, порцеляни, фаянсу, поверхні медичних приладів і устаткування з лакофарбованим, гальванічним, полімерним покриттям; добре змиваються з поверхонь, не залишають нальоту і плям, не фіксують органічні забруднення, не знебарвлюють та не зменшують міцність тканин. Видаляють механічні, білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів.

Гомогенізують мокротиння та інші виділення. За потреби низьке піноутворення (в т.ч. в разі необхідності можливе додавання піногасників), що дозволяє використовувати засіб для миття та дезінфекції із використанням циркуляційних систем. Засіб «Біопагdez» зберігає свої властивості, в т.ч. герміцидні, після поступового відтаювання внаслідок замерзання. Засіб не сумісний з милами, аніоноактивними ПАВ. «Біопагdez» є не горючим, пожежобезпечним. Дезінфекційний засіб «Біопагdez» не містить окислювачів. «Біопагdez» добре змішується з водою в будь яких співвідношеннях [41].

**Спектр антимікробної дії:** бактерицидні властивості по відношенню до грампозитивних та грамнегативних бактерій у т. ч. щодо бактерій групи

кишкової палички (включаючи ентерогеморагічну), інших ентеробактерій, в т.ч. стійких до гентаміцину і/або до цефалоспоринових), стафілококів (у т. ч. стійких до метациліну/оксациліну чи ванкоміцину, стійкі штами *Streptococcus pyogenes*, *Stenotrophomonas maltophilia*), *Streptococcus pneumoniae*, ентерококів (у т. ч. стійких до ванкоміцину), неферментуючих бактерій із стійкістю до цефалоспоринових антибіотиків, *Pseudomonas aeruginosa* (в т.ч. antibiotic resistant), *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Acinetobacter* spp. (у тому числі *Acinetobacter baumannii* та *Acinetobacter lwoffii*), *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, сальмонел, легіонел, лістерій, ієрсиніозів, чуми, туляремії, бруцельозу, холери, *Clostridium difficile*, інших збудників небезпечних та особливонебезпечних, у т.ч. зоонозних інфекцій, анаеробних інфекцій тощо), туберкулоцидні (щодо збудників туберкульозу, *Mycobacterium terrae*) і спороцидні властивості, віруліцидні властивості (специфічна активність засобу перевірена на вірусі групи поліомієліту, що забезпечує знищення усіх інших видів і груп збудників вірусних інфекцій, в т.ч. збудників парентеральних та ентеральних вірусних гепатитів (А, В, С), вірусу СНІДу (ВІЛ), рота-, корона-, філовірусів, хантавірусів, ентеровірусів, вірусів грипу всіх видів (у т. ч. А(Н5N1) «пташиний грип», А(Н1N1) «свинячий грип» ін., парагрипу тощо), вірусу поліомієліту, герпесу та ін.); фунгіцидні властивості (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, а також пліснявих грибів, в т.ч. у споровій формі тощо) та овоцидні і ларвіцидні властивості [41].

Поверхні в приміщеннях (стіни, підлога, двері тощо), предмети обстановки (тверді меблі та ін.), поверхні приладів, апаратів, устаткування, об'єкти транспорту, протирають ганчір'ям, змоченим розчином засобу (норма витрати розчину при цьому – 50 – 100 мл/м<sup>2</sup>) умова для процесу дезінфекції – повне зволоження поверхні засобом) чи використовуючи спеціальні одноразові серветки, що поміщують в призначені для них універсальні контейнери і просочують робочими розчинами засобу (див. табл. 2.1.), або

зрошують із гідропульта, автомакса, розпилювача типу «Квазар» (норма витрат 50-150 мл/м<sup>2</sup>) [41].

Таблиця 5.1

Розрахунки для приготування робочих розчинів засобу «Біопагdez» [41]

Концентрація робочого розчину (за препаратом), %	Кількість компонентів (мл) для приготування					
	1,0 л		5,0 л		10,0 л	
	Кількість концентрату, мл	Кількість води, мл	Кількість концентрату, мл	Кількість води, мл	Кількість концентрату, мл	Кількість води, мл
0,05	0,5	999,5	2,5	4997,5	50	9995,0
0.1	1.0	999.0	5,0	49950	10.0	9990,0
0,15	1,5	998,5	7,5	4992,5	15,0	9985,0
0,25	2,5	997,5	12,5	4987,5	25,0	9975,0
0,5	50	995,0	25,0	4975,0	50,0	9950,0
0,8	8,0	992,0	40,0	4960,0	80,0	9920,0
1.0	10,0	990,0	50,0	4950,0	100,0	9900,0
1,5	15,0	985,0	7,5	49925	150,0	9850,0
2,0	20,0	980,0	100,0	4900,0	200,0	9800,0
2,5	25,0	975,0	125,0	487,5	250,0	9750,0
3.0	30,0	970,0	150,0	4850,0	300,0	9700,0
3.5	35,0	965,0	175,0	4825,0	350,0	9650,0
5,0	50,0	950,0	250,0	4750,0	500,0	9500,0

2) Засіб дезінфекційний та мийний «ПЗ-стерил» («P3-steril»)- рідкий слабо лужний миючий засіб з антибактеріальним ефектом для ручного миття.

**Діючі речовини:** дидецилдиметил амоній хлорид – 1,5%; алкіл(C12-16) диметилбензил амоній хлорид – 1,75% [42].

**Фірма виробник** – ТОВ "Еколаб ТзОВ", Україна.

**Призначення.** Для професійного використання за призначенням на підприємствах харчової та харчопереробної промисловості у т.ч. на підприємствах дитячого харчування, молочної, м'ясопереробної, птахопереробної, пиво-безалкогольної, рибопереробної, виробництва напоїв; сільського господарства та агропромислового комплексу; ресторанного господарства, роздрібної та оптової торгівлі харчовими продуктами, в

громадських закладах, в закладах громадського харчування, в закладах охорони здоров'я; навчальних та дошкільних закладах різних рівнів акредитації, установ соціального захисту, об'єктах комунально-побутового призначення (готелі, кемпінги, гуртожитки, пральні, хімчистки), транспорт, для цілей дезінфекції робочих поверхонь, технологічного обладнання, тари, які контактують з харчовими продуктами, поверхонь виробничих та побутових приміщень [42].

Таблиця 5.2

Схема застосування засобу дезінфекційного та мийного «ПЗ-стерил» («P3-steril») [43]

Ємкості і контейнери	Концентрація:	1-2% (100-200 мл на 10 л води)
	Температура:	Холодна
	Час:	30 хвилин
Блок розливу, повітряні конвеєри	Концентрація:	1-2% (100-200 мл на 10 л води)
	Температура:	Від холодної до +50°C
	Час:	30 хвилин
Блок завантаження, ланцюгові передачі в м'ясопереробній промисловості	Концентрація:	1-2% (100-200 мл на 10 л води)
	Температура:	Холодна
	Час:	30-60 хвилин
Упаковка, столи	Концентрація:	1-2% (100-200 мл на 10 л води)
	Температура:	Від +30°C до +50°C
	Час:	30-60 хвилин
Дезінфікуючі килимки, прохідні	Концентрація:	1% (100 мл на 10 л води)
	Температура:	Холодна
Після миття необхідно ретельно обполоснути всі поверхні водою питної якості		

3) Дезінфекційний (антисептичний) засіб «Квікцид» – антимікробний засіб для швидкої дезінфекції різноманітних поверхонь та інструментів [44].

**Фірма виробник** – ТОВ «ІНТЕР КЕМІКАЛ ГРУП», Україна ТУ У 20.2-38261660-004:2015.

**Склад засобу:** активно-діючі речовини - 1-пропанолу – 40%, 2-пропанолу – 35%, алкілдиметилбензиламоній хлорид – 0,15%, необхідні функціональні добавки до 100,0%.

**Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу.** Дезінфекційний (антисептичний) засіб – однорідна прозора (або із легкою опалісценцією) безбарвна рідина, рН 4,7 – 7,5. Не містить окислювачів, стабільний при температурі, що не перевищує 40°C. Засіб «Квікцид» при застосуванні для антисептичної обробки рук полегшує надягання рукавичок, має антиперспірантні властивості - зменшує кількість виділень під рукавичками під час виконання робочих процесів. Гарно очищує об'єкти, що знезаражуються. Сумісний з усіма матеріалами, окрім чутливих до дії спиртів [44].

**Спектр антимікробної дії.** Засіб «Квікцид» має бактерицидні (у відношенні грампозитивних і грамнегативних бактерій в т.ч. щодо збудників госпітальних інфекцій, включаючи збудників туберкульозу, мультирезистентні госпітальні штами стафілококу, ентеробактерій і псевдомонад, ентерогеморагічної кишкової палички, сальмонельозу, холери, ієрсиніозів тощо), віруліцидні (включаючи збудників парентеральних вірусних гепатитів, ВІЛ-інфекції, всіх типів (видів) грипу (в т.ч. «пташиний», «свинячий»), герпес-, рота-, норо- вірусів, збудників кишкових вірусних інфекцій, включаючи групу поліомієліту тощо) та фунгіцидні властивості в т.ч. щодо представників роду *Candida*, збудників дерматомікозів, плісняви тощо). Ефективні проти резидентної мікрофлори шкіри.

Перешкоджають виділенню резидентної мікрофлори шкіри з її глибоких шарів. Протимікробна дія засобу пролонгована у часі - не менше 3 годин, може продовжуватись до 5 годин (залежить від ступеню мікробного обсіменіння шкіри). «Квікцид» володіє ранозагоювальною та протизапальною дією. Протимікробні властивості засобу зберігаються в присутності крові,

сиворотки, гною, інших виділень, забруднень органічного, неорганічного та змішаного характеру.

Знезараження проводять методом протирання, використовуючи чисту серветку(бажано одноразового застосування) просочену засобом «Квікцид» або методом зрошення засобом із флакона з розпилювачем, витримують час експозиції 30 секунд. Норма витрат засобу 30-50 мл/м<sup>3</sup>. Дозволяється проводити процедуру дезінфекції в присутності осіб, не причетних до процесу дезінфекції (клієнти, відвідувачі і т.д.). Після завершення дезінфекції змивати засіб не обов'язково [44].

#### *Мийні та дезінфікуючі засоби для обробки рук персоналу*

1) Дезінфекційний засіб «ДЕЗамол» або еквівалент в 1 л каністрах з дозатором [45].

**Призначений** для дезінфекції виробів медичного призначення, для дезінфекції шкіри рук, шкірних покривів, для гігієнічної обробки рук, обробка слизових оболонок.

**Склад засобу:** спирт етиловий понад 60%, хлоргексидин диглюконат в межах 0,24-0,30%, пероксид водню в межах 0,22-0,28%.

Володіє антимікробною дією відносно грамнегативних та грампозитивних бактерій (включаючи збудників внутрішньо-лікарняних інфекцій та мікобактерій туберкульозу), вірусів, включаючи віруси поліомієліту параентеральних, гепатиту, вірусів птахів, герпесів та ВІЛ-інфекцію та грибів (кандидози). Володіє протимікробною дією протягом 3 год після обробки. Можливість використання в усіх лікувально-профілактичних закладах, лікарнях.

Не подразнює шкіру, клас токсичності не менше 4. Термін придатності не менше 5 років. Пакування - в літрових каністрах з дозатором. У складі засобу відсутні амфотезиди, триклозан, кислоти [45].

2) Засіб дезінфікуючий «Етасепт (Etasept)» (розчин) за ТУ У 20.2-36423868-033:2016 [46].

**Фірма виробник** – ТОВ «Бланідас», Україна. Компанія сертифікована за стандартами ISO 9001. 1.3.

**Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин:** етанол – 9,5-10,5 %, перекис водню – 0,285- 0,315 %, хлоргексидин диглюконат 0,252-0,475 % (діючі речовини), повідон, молочна кислота, гідроксид натрію, макрогліцерол гідроксистеарат, ароматична речовина, вода до 100%.

Засіб захищає руки, шкіру та слизові від сухості і подразнень. Зберігає еластичність і природний водно-жировий баланс шкіри. Засіб сумісний з використанням професійних засобів для гігієнічного миття рук та засобами по догляду за шкірою рук (емульсія/крем).

На сухі руки нанести 3 мл засобу або обробити руки серветкою просоченою розчином протягом 30 с.

Засіб «Етасепт (Etasept)» упаковують у поліетиленові флакони від 30 мл до 1000 мл (з дозуючим пристроєм, розпилювачем або без, з піноутворюючим тригером або без), у каністри від 5 л до 30 л, у сошетки від 3 мл до 30 мл. Термін придатності засобу - 3 роки з дати виготовлення [46].

**3) Засіб дезінфікуючий (антисептичний) «Ладоксин», виготовлений у відповідності із (ТУ У 20.2-40220141-001:2017) [47].**

**Фірма виробник** – ТОВ «ДАНА МЕДІКАЛ (Україна).

**Склад засобу на 100 мл.:** активно-діючі речовини - : 1-пропанол 30%, 2-пропанол 40%, хлоргексидину біглюконат 0,5%, перекис водню 0,5%, необхідні функціональні добавки, в т.ч. для посилення і пролонгації специфічної дії засобу, вода очищена - до 100,0%.

Засіб «Ладоксин» при застосуванні для антисептичної обробки рук полегшує надягання медичних рукавичок, має антиперспірантні властивості - зменшує кількість виділень під рукавичками. Застосування засобу сприяє ефективному прилипанню хірургічної плівки. «Ладоксин» володіє ранозагоювальною та протизапальною дією, не ускладнює загоєння штучно нанесених ран (розрізів, проколів).

Гігієнічна антисептика шкіри рук виконується шляхом нанесення 3мл засобу «Ладоксин» на сухі руки (без попереднього миття водою і милом) з подальшим втиранням в шкіру до висихання, час обробки у відповідності до прийнятого алгоритму гігієнічної антисептики рук - 30 сек. (дезінфікуючий засіб «Квікцид» забезпечує знищення транзиторної мікрофлори рук протягом 15 сек.). При цьому, звертають особливу увагу на обробку шкіри між пальцями та на кінчиках пальців.

Засіб «Ладоксин» упаковують у скляні та полімерні флакони, пляшки місткістю від 10 мл. до 2000 мл.,(може комплектуватись розпилювачем, дозатором), полімерні каністри місткістю від 2,0 до 10,0л., діжках від 20л до 200л. Термін придатності засобу – 5 років з дати виробництва [47].

Для визначення поверхонь, які мають підлягати миттю та дезінфекції слід використати специфікацію обладнання з його габаритними розмірами. У ферментаційному відділенні встановлені інокулятори та виробничий ферментер на 10 м<sup>3</sup>. Висота ферментера становить близько 6 м, висота поверху – 6 м.

Загальна площа приміщення, де встановлено дане обладнання становить 6 м × 3 м = 18 м<sup>2</sup>. Враховуючи, що поверхня стін даного приміщення теж підлягає миттю та дезінфекції на висоту 2,5 м, загальна площа обробки становитиме:

$$\sum F = (6 \text{ м} \times 3 \text{ м}) + (6 \text{ м} + 6 \text{ м} + 3 \text{ м} + 3 \text{ м}) \times 2,5 \text{ м} = 18 \text{ м}^2 + 45 \text{ м}^2 = 63 \text{ м}^2$$

Узагальнену інформацію про вказані миючі та дезінфікуючі засоби наведено у табл. 5.3.

Таблиця 5.3

## Розрахунок витрат миючих та дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, грн/л	Витрати робочого розчину, л/м <sup>2</sup>	Ефективність використання дез. розчину, Е <sub>дз</sub> , грн/м <sup>2</sup>
Біопагdez ензим	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога, обладнання	12%	231	27,72	0,1	0,44
ПЗ-стерил	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога, обладнання	1,75%	84,7	1,48	0,1	0,02
Квікцид	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога, обладнання	35%	330	115,5	0,05	1,83

Таким чином, за даними табл. 2.3., для обробки поверхонь та обладнання обираємо засіб ПЗ-стерил, що характеризується низькою вартістю та оптимальною ефективністю використання. Для усунення адаптації патогенів до даного засобу будемо чергувати його із засобом Біопагdez ензим.

#### **5.5. Обґрунтування способу приготування та стерилізації компонентів поживного середовища для вирощування *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB**

Відповідно до розрахунків, виробничий біосинтез  $\alpha$ -амілази здійснюється у ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup>, що міститиме 5,8 м<sup>3</sup> поживного середовища. Одержання посівного матеріалу проходить у 4 етапи: вирощування бактерій у колбах на качалці, інокуляторах об'ємами 10 і 100 л та посівному апараті на 1 м<sup>3</sup>.

Поживне середовище для отримання посівного матеріалу *B. stearothermophilus* WHS9GSAB та виробничого біосинтезу  $\alpha$ -амілази (35 779,5 Од/мл) має різний компонентний та кількісний склад [1], тому умови підготовки даних середовищ будуть різні. Для отримання посівного матеріалу використовують середовище Лурія-Бертані, яке має наступний компонентний склад (г/л):

- триптон – 10;
- NaCl – 10;
- дріжджовий екстракт – 5 [48].

В статті [14] було продемонстровано що для надсинтезу  $\alpha$ -амілази необхідно вносити додаткову кількість джерела вуглецю та азоту, так при культивуванні без внесення підживлювального розчину спостерігався менший кінцевий вихід продукту в порівнянні з внесенням підживлювального розчину. В якості підживлювального розчину використовували розчин з наступним компонентним складом: глюкоза, соєвий пептон, кукурудзяний сироп та розчин мікроелементів об'ємом 3 мл у розрахунок на 1 л середовища. Внесення підживлювального розчину відбувалось автоматично, часові проміжки не описано, але в статті наведено, що внесення розчину відбувалось

з 7 год культивування, і підтримувалось для забезпечення постійної концентрації глюкози 0,5 г/л. Отже, можна дійти висновку, що для збільшення активності  $\alpha$ -амілази потрібно вносити підживлювальний розчин починаючи з 7 год культивування, та необхідно під час синтезу рівномірно розподілити його на весь процес виробничого культивування (процес синтезу відбувається 93 год, врахуємо початкові 7 год та останні 2 год,  $93 - 7 - 2 = 84$  год коли необхідно вносити підживлювальний розчин, для рівномірного розподілу можна взяти інтервал 3 год, тоді кількість внесення підживлювального розчину буде становити 28 разів, приблизно по 64,3 л).

Отже, виробничий біосинтез відбувається із внесенням підживлювального розчину, для виробничого біосинтезу використовують поживне середовище, яке має наступний компонентний склад (г/л):

- соєвий пептон – 10;
- кукурудзяний сироп – 10;
- сахароза – 5;
- $\text{Na}_2\text{SO}_3$  – 2;
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 19,2;
- діамонію цитрат – 1,0;
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,68;
- розчин мікроелементів – 3 мл.

Розчин мікроелементів має наступний компонентний склад, г/л [49]:

- $\text{CaCl}_2$  – 0,5;
- $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,18;
- $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  – 0,1;
- $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  – 10,05;
- $\text{FeCl}_3$  – 8,35;
- $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,16;
- $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,18.

Підживлювальний розчин містить, г/л [49]:

- соєвий пептон – 35;

- кукурудзяний сироп – 35;
- глюкоза – 500;
- розчин мікроелементів – 20 мл, склад якого попередньо наведено.

Виробничий біосинтез відбувається в ферментері об'ємом  $10 \text{ м}^3$ , для якого необхідно приготувати  $5,8 \text{ м}^3$  поживного середовища. Дана кількість поживного середовища складається з  $4,0 \text{ м}^3$  початкового поживного середовища та  $1,8 \text{ м}^3$  підживлювального розчину. Зважаючи на необхідний об'єм поживного середовища, можна зробити висновок що доцільно проводити стерилізації в установці безперервної стерилізації продуктивністю  $5 \text{ м}^3$ , що дозволить зменшити кількість стадій приготування та стерилізації поживного середовища та зменшить кількість необхідного обладнання для даних стадій, що є більш економічно доцільним варіантом.

Підживлювальний розчин складається з термолабільних речовин та розчину мікроелементів, враховуючи що для виробничого синтезу розчин мікроелементів буде готуватись окремо, тому доцільно необхідну кількість розчину приготувати окремо. Для приготування  $1,8 \text{ м}^3$  підживлювального розчину обираємо стандартний реактор з робочим об'ємом  $2,5 \text{ м}^3$ . Враховуючи що розчин мікроелементів готується окремо, склад підживлювального розчину буде складатись лише з термолабільних компонентів, що дозволить нам проводити стерилізації в одному реакторі всіх компонентів, режим стерилізації 20 хв при  $112 \text{ }^\circ\text{C}$ . Після стерилізації термолабільних компонентів необхідну кількість стерильного розчину мікроелементів вносять в реактор. Необхідна кількість компонентів для приготування підживлювального розчину наведена в табл. 5.4.

У складі розчину мікроелементів немає фосфатних солей які при нагріванні з іншими компонентами можуть випасти в осад, тому готувати та стерилізувати компоненти можна разом, режим стерилізації 40 хв при  $131 \text{ }^\circ\text{C}$ . Для приготування  $1,8 \text{ м}^3$  підживлювального розчину необхідно  $1800 \times 20 \text{ мл} / 1000 = 36 \text{ л}$  розчину мікроелементів, а для  $4,0 \text{ м}^3$  поживного середовища необхідно  $4000 \times 3 \text{ мл} / 1000 = 12 \text{ л}$ , сумарно необхідно приготувати  $36 + 12 =$

48 л розчину мікроелементів. Для приготування та стерилізації даної кількості компонентів доцільно обрати стандартний за розмірами реактор-змішувач об'ємом 63 л.

Таблиця 5.4

**Кількість компонентів підживлювального розчину для виробничого синтезу  $\alpha$ -амілази**

<b>Компоненти поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 1,8 м<sup>3</sup> розчину, кг</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції, л</b>
Глюкоза	500	900	А	1764
Соевий пептон	35	63		
Кукурудзяний сироп	35	63		
Вода		562 (л)		
Конденсат		176,4 (л)		
Розчин мікроелементів	20 мл	36 л	Б	36
Разом				1800

Необхідна кількість компонентів для приготування розчину наведена в табл. 5.5.

**Кількість компонентів розчину мікроелементів для приготування  
необхідної кількості розчину на весь технологічний процес**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 38 л розчину, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Na <sub>2</sub> -EDTA	10,05	381,9	А	38
FeCl <sub>3</sub>	8,35	317,3		
CaCl <sub>2</sub>	0,5	19		
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,18	6,84		
CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,18	6,84		
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,16	6,08		
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,1	3,8		
Вода		33,5 (л)		
Конденсат		3,8 (л)		
Разом				38

**5.5.1. Вирощування інокуляту у колбах на качалці**

Для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці необхідно приготувати відносно невеликий об'єм поживного середовища (620 мл). Враховуючи даний об'єм стерилізація композицій буде відбуватись в автоклаві, поділ компонентів на композиції відбувається згідно температурних режимів стерилізації компонентів. Розглянувши склад поживного середовища для отримання посівного матеріалу, поділ компонентів на композиції буде виглядати наступним чином:

*Композиція А:* триптон та дріжджовий екстракт (112 °С, 0,05 МПа, 20 хв);

*Композиція Б:* NaCl (131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

Дріжджовий екстракт та триптон є термолабільними речовинами тому їх об'єднують в одну композицію та стерилізують впродовж 20 хв при температурі 112 °С. Потрібну наважку хлориду натрію поміщають в колбу розчиняють водою та стерилізують в автоклаві впродовж 40 хв при температурі 131 °С. Кількісний вміст композицій середовища, необхідного для вирощування інокуляту в колбах на качалці, наведено в табл. 5.6.

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,62 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Триптон	10	6,2	А	0,2
Дріжджовий екстракт	5	3,1		
Вода		200 (мл)		
NaCl	10	6,2	Б	0,42
Вода		420 (мл)		
Разом				0,62

**5.5.2. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах та посівному апараті**

*Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 10 л*

Склад поживного середовища на даній стадії не відрізняється від раніше згаданого, тому поділ композицій та температурні умови стерилізації на даних етапах будуть однаковими:

*Композиція А:* триптон та дріжджовий екстракт (112 °С, 0,05 МПа, 20 хв);

*Композиція Б:* NaCl (131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

Композицію А (4,1 л) пропонується готувати та стерилізувати у реакторі-змішувачі об'ємом 5 л. Композицію Б (2,05 л) через її менший об'єм стерилізуємо у колбі на 5 л. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 5.7.

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л**

<b>Компоненти поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 6,15 л середовища, г</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції, л</b>
Триптон	10	61,5	А	4,1
Дріжджовий екстракт	5	30,75		
Конденсат		410 (мл)		
Вода		3,6 л	Б	2,05
NaCl	10	61,5		
Вода		2,05 л		
Разом				6,15

*Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 100 л*

Склад поживного середовища на даній стадії не відрізняється від раніше згаданого, тому поділ композицій та температурні умови стерилізації на даних етапах будуть аналогічними:

*Композиція А:* триптон та дріжджовий екстракт (112 °С, 0,05 МПа, 20 хв);

*Композиція Б:* NaCl (131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

Композицію А (32 л) та композицію Б (35 л) пропонується готувати та стерилізувати у реакторах-змішувачах об'ємом 40 л кожен. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 5.8.

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 67 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Триптон	10	670	А	32
Дріжджовий екстракт	5	335		
Вода		27,8 (л)		
Конденсат		3,2 (л)		
NaCl	10	670	Б	35
Вода		30,8 (л)		
Конденсат		3,5 (л)		
Разом				67

*Вирощування інокуляту у посівному апараті на 1 м<sup>3</sup>*

Склад поживного середовища на даній стадії залишається аналогічним тим, що зазначені на попередніх стадіях, отже, композиційний поділ зберігається:

*Композиція А:* триптон та дріжджовий екстракт (112 °С, 0,05 МПа, 20 хв);

*Композиція Б:* NaCl (131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

Композицію А (220 л) та композицію Б (360 л) пропонується готувати та стерилізувати у реакторах-змішувачах об'ємом 250 та 400 л відповідно. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 5.9.

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1 м<sup>3</sup>**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 580 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, л
Триптон	10	5,8	А	220
Дріжджовий екстракт	5	2,9		
Вода		110		
Конденсат		11		
NaCl	10	4,2	Б	360
Вода		272		
Конденсат		27		
Разом				580

**5.5.3. Виробничий біосинтез  $\alpha$ -амілази у ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup>**

Так як стерилізація поживного середовища буде відбуватись в УБС, то процес приготування та стерилізації буде відбуватись наступним чином: компоненти поживного середовища об'єднують в одну композицію, змішують в окремому реакторі та подають в установку безперервної стерилізації, режим стерилізації 131 °С час стерилізації 5-7 хв. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 5.10.

**Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію виробничого біосинтезу  $\alpha$ -амілази в ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup>**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 4 м <sup>3</sup> середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, л
Соевий пептон	10	40	А	3988
Кукурудзяний сироп	10	40		
Сахароза	5	20		
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	2	8		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	19,2	76,8		
Диамонію цитрат	1	4		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,68	10,72		
Вода		3 400 (л)		
Конденсат		398,8 (л)		
Розчин мікроелементів	3 мл	12 (л)	Б	12
Разом				4 000

### 5.6. Обґрунтування вибору розчинів титрувальних агентів та піногасників

Оскільки біосинтез  $\alpha$ -амілази проходить при рН 7,0 – 7,5, а процесі підготовки середовища та подальшого культивування продуцента даний показник не змінюється, то підготовку титрувальних агентів не здійснюємо.

Під час виробничого культивування *B. stearothermophilus* WHS9GSAB можливим є утворення піни, оскільки такий процес відбувається в аеробних умовах. До піногасників відносять як механічні, так і хімічні, які в свою чергу, поділяються на натуральні та синтетичні. Для проєктованого виробництва обираємо синтетичний піногасник F1154 [50] на основі поліалкіленгліколю. Даний засіб не токсичний, його можна використовувати у надзвичайно малих кількостях, що робить його економічно ефективним допоміжним засобом для обробки.

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі стадії допоміжних робіт:

- підготовка стерильного аераційного повітря та очистка відпрацьованого;

- приготування і стерилізація підживлювального розчину, що містить розчин мікроелементів та термолабільних компонентів, для виробничого біосинтезу.

Також необхідно передбачити наявність таких реакторів-змішувачів:

- ❖ у цеху підготовки посівного матеріалу:

- для приготування і стерилізації композиції А: 5; 40 та 250 л;

- для приготування і стерилізації композиції Б: 40 та 400 л.

- ❖ у цеху виробничого біосинтезу:

- для приготування і стерилізації підживлювального розчину мікроелементів: 40 л;

- для приготування і стерилізації термолабільних компонентів підживлювального розчину: 2,5 м<sup>3</sup>;

- реактор-змішувач об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> для змішування композиції А перед стерилізацією в УБС.

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА $\alpha$ -АМІЛАЗИ

У табл. 6.1 представлено характеристику обладнання, зображеного у графічній частині роботи (апаратурна схема).

*Таблиця 6.1*

### Специфікація обладнання, використовуваного на ділянці допоміжних робіт і виробничого біосинтезу $\alpha$ -амілази

Позиція	Назва	Кількість	Характеристика позиції
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник РВ10000. Макс. роб. тиск: 10 бар. Виробник: Харківський завод промислових технологій [51].
Ф-2	Фільтр грубого очищення повітря	1	Фільтр Verfiltan V4. Матеріал: слабо промаслене скловолокно. Максимальна температура: до +180°C. Клас: G4. Виробник: New Filter [39].
К-3	Компресор	1	Компресор АВАС В5900В/500 FT5.5. Потужність: 4 кВт. Максимальний тиск: до 11 бар. Продуктивність: 653 л/хв. Габарити: 1400x670x2030 мм. Виробник: Італія [52].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Кожухотрубний охолоджувач. Матеріал: нерж. сталь AISI304. Діапазон температур: -60 ... +400 °С. Тиск: до 4 МПа. Виробник: ОПЕКС (TRANTER) [53].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер для стисненого повітря 900 літрів. Максимальний тиск: до 10 бар. Виробник: МАС Системз, Київ [54].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Рідинний калорифер. Матеріал труб: нержавіюча сталь, мідь. Теплоносії: вода, гліколі, термомасло. Максимальна робоча температура: до 400 °С. Тиск: до 25 бар. Виробник: ОПЕКС (TRANTER) [55].

					НУХТ БТЕК 04.03.17 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання для виробництва $\alpha$ -амілази			Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Марухіна В.В.							67	4
Перевір.		Буценко Л.М.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Реценз.										
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

Продовження таблиці 6.1

Ф-7	Фільтр головної очистки	1	Фільтр SYNFASAN C5G. Матеріал: слабо промаслене скловолокно. Товщина: 20 мм. Пропускна швидкість: 0,25 м/с. Клас: F5. Виробник: New Filter [39].
ІФ-8, ІФ-13, ІФ-20, ІФ-32	Індивідуальний фільтр	4	Кишеньковий фільтр 592x490x600-8 клас очищення F9. Матеріал: високоякісні синтетичні волокна з 100% поліестеру. Розміри: 592x490x600 мм. Виробник: «АС ФІЛЬТР» [56].
РЗ-9	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Двостінний скляний лабораторний реактор об'ємом 5 л. Матеріал: боросилікатне скло. Діапазон робочих температур: -80~200 °С. Потужність: 90 Вт. Швидкість перемішування: 50~500 об./хв. Розміри: 591×520×1594 мм [57].
І-10	Інокулятор	1	Інокулятор VLBIO 10SJ об'ємом 10 л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L. Потужність: 220Вт. Обладнаний сорочкою, датчиками температури, кислотності, кисню, мішалкою до 200 об/хв. Розміри: 890x660x1600 мм [58].
РЗ-11, РЗ-12	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А і Б	2	Реактор-змішувач об'ємом 40 л. Потужність двигуна: 0,75 кВт. Оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою із 100 об/хв. Температура середовища від -20 до +250°С. Габарити: 600x500x750 [59].
І-14	Інокулятор	1	Інокулятор VLBIO 100SC об'ємом 100 л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L. Потужність: 380Вт. Обладнаний сорочкою, датчиками температури, кислотності, кисню, мішалкою до 200 об/хв. Розміри: 1400x820x2200 мм [59].

Продовження таблиці 6.1

Д-15, Д-18	Ваговий дозатор	2	Ваговий дозатор АF – 25К. Матеріал: SS304, вуглецева сталь. Діапазон зважування: 5 – 25 кг. Точність: ±10г. Потужність: 220 Вт [60].
РЗ-16	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач Feldmeier ТК0323М об'ємом 250 л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L. Оснащений сорочкою (номінальна температура 662 °С) та магнітною мішалкою. Розміри: 1016 x 864 x 1600 мм. Виробник: США [61].
Н-17	Відцентровий насос	1	Насос харчовий відцентровий Г2-ОПА. Максимальна продуктивність: 6,3 м <sup>3</sup> /год. Матеріал: нерж. сталь AISI 304. Потужність: 0,75 кВт. Частота обертання: 3000 об/хв [62].
РЗ-19	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції Б	1	Реактор-змішувач об'ємом 400 л. Матеріал: нерж. сталь AISI 316. Макс. допустима робоча температура: 165 °С. Макс. надлишковий тиск: 4,0 бар. Оснащений подвійною сорочкою та магнітною мішалкою до 320 об/хв. Розміри: 910x770x1830 мм [63].
ПА-21	Посівний апарат	1	Посівний апарат Möbius об'ємом 1 м <sup>3</sup> . Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L. Обладнаний сорочкою, датчиками температури, кислотності, кисню, мішалкою до 300 об/хв. Розміри: 3000x2000x1670 мм [64].
РЗ-22	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації підживлювального розчину мікроелементів	1	Реактор-змішувач об'ємом 40 л. Потужність двигуна: 0,75 кВт. Оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою із 100 об/хв. Температура середовища від -20 до +250°С. Габарити: 600x500x750 [59].
Д-23, Д-26	Ваговий дозатор	2	Ваговий дозатор АF – 50К. Матеріал: SS304, вуглецева сталь. Діапазон зважування: 10 – 50 кг. Точність: ±20г. Потужність: 220 Вт [65].

Закінчення таблиці 6.1

РЗ-24	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації підживлювального розчину термолабільних компонентів	1	Реактор-змішувач об'ємом 2,5 м <sup>3</sup> . Матеріал: нерж. сталь AISI 316. Макс. допустима робоча температура: 200 °С. Макс. надлишковий тиск: 16,0 бар. Оснащений подвійною сорочкою та магнітною мішалкою до 320 об/хв. Розміри: 1590x1880x3250 мм [66].
Н-25, Н-28	Відцентровий насос	2	Насос харчовий відцентровий Г2-ОПБ. Максимальна продуктивність: 10 м <sup>3</sup> /год. Матеріал: нерж. сталь AISI 304. Потужність: 1,5 кВт. Частота обертання: 3000 об/хв [67].
РЗ-27	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 6,3 м <sup>3</sup> . Потужність двигуна: 7,5 кВт. Оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою із 100 об/хв. Температура середовища від -20 до +250°С. Габарити: 2630x2630x5880 [59].
УБС-29	Установка безперервної стерилізації	1	Матеріал: нержавіюча сталь; потужність – 5 м <sup>3</sup> /год; температура стерилізації – 131 °С; містить 2 теплообмінника. Виготовлення на замовлення.
Н-30	Перистальтичний насос	1	Насос перистальтичний ELRO. Продуктивність: 25 м <sup>3</sup> /год (415 л/хв). Максимальний тиск: 13 бар. Максимальна температура: до 80 °С. Виробник: «Emerem» (Україна) [68].
СІР-31	СІР-мийка	1	СІР-мийка виготовлена на замовлення об'ємом 500 л
ФР-33	Ферментер	1	Ферментер DIN-BE об'ємом 10 м <sup>3</sup> . Матеріал: нержавіюча сталь 304. Оснащений барботером, сорочкою, датчиками кислотності, кисню та температури, пробовідбірником, манометром, турбінною мішалкою: 320 об/хв; максимальний допустимий тиск: 6 бар. Розміри: 2500x5720 мм. Виробник: Німеччина [69].
Н-34	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини у збірник для зберігання	1	Насос харчовий 1Г2-ОПД. Продуктивність: 25 м <sup>3</sup> /год. Матеріал: нерж. сталь AISI 304. Потужність: 5,5 кВт. Частота обертання: 3000 об/хв [70].

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА $\alpha$ -АМІЛАЗИ

Технологічна схема біосинтезу  $\alpha$ -амілази *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB складається із етапів допоміжних робіт та основного технологічного процесу.

До етапів допоміжних робіт (ДР) відносять: підготовку стерильного аераційного повітря, приготування і стерилізацію підживлювальних розчинів мікроелементів та термолабільних компонентів, приготування і стерилізацію поживних середовищ. Стадії власне технологічного процесу (ТП) включають у себе: послідовні етапи підготовки посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

У графічній частині проекту представлено технологічну та апаратурну схеми біосинтезу  $\alpha$ -амілази.

### *ДР 1. Підготовка аераційного повітря*

#### *ДР 1.1. Забір атмосферного повітря*

За допомогою повітрязабірника (ПЗ-1) забирають атмосферне повітря у найвищій точці – на висоті 16 м (враховуючи висоту ферментера близько 6 м, висоту поверху будівлі 6 м, косий дах і те, що забір здійснюється на висоті ~ 3 м від даху будівлі), де розміщують обладнання для стиснення та очищення повітря.

#### *ДР 1.2. Очистка повітря від грубих часток*

У фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очистки до 90%, затримуючи при цьому частинки діаметром 50 мкм, проходить попереднє очищення повітря.

					НУХТ БТЕК 04.03.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Марухіна В.В.						
Перевір.		Буценко Л.М.					71	10
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

### *ДР 1.3. Стиснення повітря*

Стискання повітря проводять у компресорі (К-3), для подолання гідравлічного тиску стовпа рідини і забезпечення аерації у ферментері. Тиск – 0,35 МПа, температура – до 250°C - стандартні умови для проведення процесу.

### *ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи*

Після проходження компресування, стиснене повітря (від ДР 1.3) надходить до теплообмінника-охолоджувача (Т-4), де охолоджується до температури 25-30°C. Пізніше надмірну вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де здійснюється усунення коливань руху повітря. На цьому етапі вологість зменшується до 60%.

### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

Охоложене повітря (від ДР 1.4) подається до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де воно підігрівається до температури в діапазоні від 45 до 50 °С. Вологість на такому етапі поступово зменшується до 50%.

### *ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі*

Розігріте повітря (від ДР 1.5) подається до головного фільтра очищення (Ф-7), який розташований поруч із ділянкою ферментації. На цьому етапі ступінь очищення повітря становить 95%.

### *ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Повітря (від ДР 1.6) через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ІФ-8, ІФ-13, ІФ-20, ІФ-32) кожного з апаратів, передбачених ТП 4.5, ТП 4.6, ТП 4.7, ТП 5.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає близько 99,999% та КУО < 1.

## ***ДР 2. Приготування підживлювального розчину***

Обрахунок кількостей компонентів, необхідних для підготовки підживлювального розчину наведений у табл. 2.1 і 2.2 (підрозділ 2.2).

### ***ДР 2.1. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів***

За допомогою технічних ваг формують наважку Na<sub>2</sub>-EDTA масою 381,9 г, FeCl<sub>3</sub> – 317,3 г, CaCl<sub>2</sub> – 19 г, ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O та CoCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O – 6,84 г, CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O – 6,08 г, MnSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O – 3,8 г. Сформовані наважки поміщають в

реактор-змішувач (РЗ-22) об'ємом 40 л та подають за використання лічильника 33,5 л води питної. Після завантаження компонентів розчину вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів. В подальшому в даний реактор подають гостру пару для стерилізації розчину. Стерилізація відбувається 40 хв при температурі 131 °С. Отримавши стерильний розчин мікроелементів його охолоджують та зберігають в даному реакторі до використання на наступних етапах.

### ***ДР 2.2. Приготування підживлювального розчину на виробничий біосинтез***

Для приготування підживлювального розчину в реактор-змішувач (РЗ-24) об'ємом 2,5 м<sup>3</sup> за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-23) вносять 900 кг глюкози, 63 кг кукурудзяного сиропу та 63 кг соєвого пептону, а також 562 л води питної та вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв). Після рівномірного змішування компонентів проводять стерилізацію гострою парою впродовж 20 хв при 112 °С. Після стерилізації розчину в реактор-змішувач самоплином від (РЗ-22) подають 36 л стерильного розчину мікроелементів (від ДР 1.1) та вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для рівномірного розподілення компонентів.

### ***ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища***

#### ***ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в колбах на качалці***

Під час отримання посівного матеріалу в колбах на качалці потрібно приготувати 620 мл поживного середовища. Розрахунок потрібних кількостей компонентів для підготовки середовища з метою вирощування інокуляту у колбах на качалках наведений у табл. 2.3 (підрозділ 2.2.1).

##### ***ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А***

На технічних вагах важать 6,2 г триптону та 3,1 г дріжджового екстракту, зважені компоненти поміщають в колбу об'ємом 0,2 л та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 100 мл. Вміст колби перемішують до повного розчинення, закривають ватно-

марлевым корком і розміщують в автоклаві, де протягом 20 хв проводять стерилізацію при 112 °С (0,05 МПа).

### ***ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах важать 6,2 г хлориду натрію, сформовану наважку поміщають в колбу об'ємом 1 л та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 0,42 л. Вміст колби перемішують до повного розчинення солі, закривають ватно-марлевым корком і розміщують в автоклаві, де протягом 40 хв проводять стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа).

### ***ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л***

Під час отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л потрібно приготувати 6,15 л поживного середовища. Розрахунок кількостей компонентів, потрібних для підготовки середовища з метою вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л наведений у табл. 2.4 (підрозділ 2.2.2).

#### ***ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А***

На технічних вагах важать 61,5 г триптон у та 30,75 г дріжджового екстракту, зважені компоненти передають у реактор-змішувач (РЗ-9) об'ємом 5 л та вносять питну воду в кількості 3,6 л та вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв). Після рівномірного змішування компонентів проводять стерилізацію гострою парою впродовж 20 хв при 112 °С. Отримавши стерильний розчин композиції А його охолоджують та зберігають у даному реакторі до використання на наступних стадіях.

#### ***ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах важать 61,5 г хлориду натрію, сформовану наважку поміщають в колбу об'ємом 5 л та вносять попередньо відміряної за допомогою мірного циліндра питної води в кількості 2,05 л. Вміст колби перемішують до повного розчинення солі, закривають ватно-марлевым корком

і розміщуюють в автоклаві, де протягом 40 хв проводять стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа).

### ***ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л***

Під час отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л потрібно приготувати 67 л поживного середовища, так як стерилізація буде відбуватись гострою парою необхідно зменшити кількість внесеної води через утворення конденсату (10%). Обрахунок кількостей компонентів, необхідних для підготовки середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 100 л наведений у табл. 2.5 (підрозділ 2.2.2).

#### ***ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А***

На технічних вагах важать 670 г триптоні та 335 г дріжджового екстракту, зважені компоненти поміщають в реактор (РЗ-11) об'ємом 40 л та вносять 27,8 л питної води. Після внесення компонентів вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для їх рівномірного розподілу, та протягом 20 хв проводять стерилізацію гострою парою при 112 °С (0,05 МПа). Після завершення стерилізації розчин композиції А охолоджують та зберігають у даному реакторі до використання на наступних стадіях.

#### ***ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На технічних вагах важать 670 г хлориду натрію, сформовану наважку поміщають у реактор-змішувач (РЗ-12) об'ємом 40 л та вносять 30,8 л питної води та вмикають мішалку (100 об/хв). Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, для досягнення температури у реакторі на рівні 40°С. Приготований розчин перекачують самоплином у попередньо простерилізований інокулятор (І-14) об'ємом 100 л, і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

### ***ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м<sup>3</sup>***

Під час отримання інокуляту в посівному апараті об'ємом 1 м<sup>3</sup> потрібно приготувати 580 л поживного середовища, так як стерилізація буде

відбуватись гострою парою необхідно зменшити кількість внесеної води через утворення конденсату (10%). Обрахунок кількостей компонентів, необхідних для підготовки середовища з метою одержання інокуляту у посівному апараті на 1 м<sup>3</sup> наведений у табл. 2.6 (підрозділ 2.2.2).

#### ***ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А***

На ваговому дозаторі (Д-15) важать 5,8 кг триптонну та 2,9 кг дріжджового екстракту, зважені компоненти поміщають в реактор (РЗ-16) об'ємом 160 л та через лічильник вносять 110 л питної води. Після внесення компонентів вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для їх рівномірного розподілу, та протягом 20 хв проводять стерилізацію гострою парою при 112 °С (0,05 МПа).

#### ***ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

На ваговому дозаторі (Д-18) важать 4,2 кг хлориду натрію, сформовану наважку поміщають в реактор (РЗ-19) об'ємом 400 л та вносять 272 л питної води. Вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) та перемішують до повного розчинення солі, після розчин подають в посівний апарат (ПА-21) об'ємом 1 м<sup>3</sup>, вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для рівномірного розподілу солі, та протягом 40 хв проводять стерилізацію гострою парою при 131 °С (0,15 МПа).

#### ***ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу $\alpha$ -амілази в ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup>***

Під час синтезу  $\alpha$ -амілази в ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup> потрібно приготувати 4 м<sup>3</sup> поживного середовища, так як стерилізація буде відбуватись гострою парою в установці безперервної стерилізації, необхідно зменшити кількість внесеної води через утворення конденсату (10%).

#### ***ДР 3.5.1. Приготування композиції А***

Об'ємно-ваговим дозатором (Д-26) зважують 40 кг соєвого пептону та кукурудзяного сиропу, 20 кг сахарози, 8 кг сульфату натрію, 76,8 кг гідроортофосфату калію, 10,72 кг сульфату амонію та 4 кг диамонію цитрату, зважені компоненти поміщають в реактор (РЗ-27) об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> та за

лічильника подають 3,4 м<sup>3</sup> питної води. Для повного розчинення компонентів, вмикають перемішувач, та в сорочку реактора подають глуху пару нагріваючи розчин до температури 50 °С.

#### ***ДР 3.5.2. Стерилізація композиції А***

Приготована композиція А (від ДР 3.5.1) відцентровим насосом ((Н-28) подають в установку безперервної стерилізації (УБС-29) в якій проводиться стерилізація поживного середовища гострою парою впродовж 5 хв при 131 °С (0,15 МПа).

#### ***ТП 4. Отримання посівного матеріалу***

##### ***ТП 4.1. Підтримання колекційної культури***

Колекційну культуру *B. stearotherophilus* WHS9GSAB зберігають на скошеному Лурія-Бертані агарі (ЛБА) при температурі 5±1 °С. Через кожні 4 місяці проводять пересіви культури в строго асептичних умовах.

##### ***ТП 4.2. Отримання робочої культури***

Для отримання ізольованих колоній в строго асептичних умовах, бактеріологічною петлею культуру *B. stearotherophilus* WHS9GSAB розсівають методом виснажувального штриха на чашки Петрі з агаризованим Лурія-Бертані середовищем. Чашки Петрі ставлять в термостат, інкубують протягом 24 год при 37±1 °С.

##### ***ТП 4.3. Отримання посівного матеріалу на агаризованих поживних середовищах***

Ізольовані колонії, (від ТП 4.2), в асептичних умовах, пересівають бактеріологічною петлею у пробірки з агаризованим Лурія-Бертані середовищем (для засіву однієї пробірки використовують одну ізольовану колонію). Для пересіву відбирають колонії які знаходяться на відстані не менше 1 см. Інкубують в термостаті при 37±1 °С протягом 24 год.

##### ***ТП 4.4. Отримання посівного матеріалу в колбах на качалці***

В асептичних умовах до колби з стерильною композицією Б вносять стерильну композиції А (від ДР 3.1.1) вміст колби перемішують для рівномірного розподілу компонентів та розливають по 150 мл у п'ять

стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл. В асептичних умовах до пробірки з робочою культурою *B. stearothermophilus* WHS9GSAB додають 5 мл фізіологічного розчину для суспендування клітин. Одержану суспензію за допомогою піпетки вносять у колбу з отриманим стерильним поживним середовищем, для однієї колби використовують суспензію отриману з однієї пробірки.

Посівний матеріал вирощують в колбах на качалці (200 об/хв) протягом 24 год при 37 °С. По завершенню культивування відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 3 \pm 0,5$  г/л). Отриманий посівний матеріал із 5 колб в асептичних умовах об'єднують в одній стерильній засівній колбі об'ємом 1 л.

#### ***ТП 4.5. Отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л***

В асептичних умовах в інокулятор (I-10) об'ємом 10 л подають самоплином від РЗ-9 стерильну композицію А (від ДР 3.2.1), із колби композицію Б (від ДР 3.2.2) та від РЗ-22 самоплином подають розчин мікроелементів (від ДР 2.1). Помістивши компоненти поживного середовища вмикають перемішувачий пристрій для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вносять посівний матеріал (від ТП 4.4).

Посівний матеріал вирощують в інокуляторі протягом 24 год при 37 °С, з постійним перемішуванням (200 об/хв) та з швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 1 л/(л·хв). Впродовж культивування кожні 4 год, а також по завершенню культивування відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 3 \pm 0,5$  г/л).

#### ***ТП 4.6. Отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л***

До інокулятора (I-14) об'ємом 100 л зі стерильною композицією Б подають самоплином від РЗ-11 стерильну композицію А (від ДР 3.3.1), від РЗ-22 самоплином подають розчин мікроелементів (від ДР 2.1) та вмикають перемішувачий пристрій для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вносять посівний матеріал (від ТП 4.5).

Посівний матеріал вирощують в посівному апараті протягом 24 год при  $37\pm 1$  °С, з постійним перемішуванням (200 об/хв) та з швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 1 л/(л·хв). Впродовж культивування кожні 4 год, а також по завершенню культивування відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 3\pm 0,5$  г/л).

#### ***ТП 4.7. Отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1 м<sup>3</sup>***

До посівного апарату (ПА-21) об'ємом 1 м<sup>3</sup> зі стерильною композицією Б перекачують відцентровим насосом Н-17 від РЗ-16 стерильну композицію А (від ДР 3.4.1), від РЗ-22 самоплином подають розчин мікроелементів (від ДР 2.1) та вмикають перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вносять посівний матеріал (від ТП 4.6).

Посівний матеріал вирощують в посівному апараті протягом 24 год при  $37\pm 1$  °С, з постійним перемішуванням (200 об/хв) та з швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 1 л/(л·хв). Впродовж культивування кожні 4 год, а також по завершенню культивування відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ( $C_{\text{біомаси}} = 3\pm 0,5$  г/л).

#### ***ТП 5. Виробничий синтез $\alpha$ -амілази***

##### ***ТП 5.1. Виробничий біосинтез амілази в ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup>***

У ферментер (ФР-33) об'ємом 10 м<sup>3</sup> з установки безперервної стерилізації (УБС-29) за використання перистальтичного насосу (Н-30) подають стерильну композицію А (від ДР 3.5.2). Стерильний розчин мікроелементів подають від РЗ-22 самоплином (від ДР 2.1). Після внесення компонентів вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) та після перемішування за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 4.7).

Виробничий синтез відбувається в аеробних умовах тому після внесення поживного середовища та посівного матеріалу, в ферментер подають стерильне аераційне повітря з швидкістю подачі 1 л/(л·хв).

Під час виробничого синтезу починаючи з 7 год культивування кожні 3 год від РЗ-24 за використання відцентрового насосу Н-25 подають 64,3 л підживлювального розчину (від ДР 2.2), останнє внесення підживлювального розчину відбувається на 91 год культивування.

Вирощування *B. stearothermophilus* WHS9GSAB відбувається до досягнення кінцевої концентрації біомаси ( $62 \pm 0,5$  г/л) та активності амілази (35 779,5 Од/мл), впродовж 93 год при температурі  $37 \pm 1$  °С із постійним перемішуванням (400 об/хв).

Впродовж виробничого синтезу кожні 8 год, а також по завершенню культивування, відбирають проби культуральної рідини для визначення концентрації джерел вуглецю та азоту, амілази та біомаси для проведення мікробіологічного контролю.

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА $\alpha$ -АМІЛАЗИ

### 8.1. Мікробіологічний контроль

Під час мікробіологічного контролю необхідно здійснити перевірку стерильності поживних середовищ після стерилізації і контроль чистоти культури продуцента. Стерильність поживних середовищ перевіряють методом поверхневого висіву на чашки Петрі з агаризованими середовищами. Для аналізу використовують два види поживних середовищ: м'ясо-пептонний агар (МПА, для перевірки на наявність бактерій) і сусло-агар (СА, для перевірки на наявність дріжджів і грибів).

Аналіз виконують так: стерильною піпеткою відбирають пробу поживного середовища об'ємом 1 мл, переносять на поверхню агаризованого поживного середовища в чашці Петрі та рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Після цього засіяні чашки загортають у папір, поміщають у термостат і витримують за температури 32-34 °С протягом 24-48 год (для чашок з МПА) або за 24-26 °С протягом 72-120 год (для чашок з СА). Починаючи з 24 год після початку інкубування, здійснюють аналіз посівів. На поверхні поживних середовищ на повинно бути ознак росту мікроорганізмів [71].

Чистоту культури продуцента перевіряють шляхом висіву на агаризовані середовища (для визначення культуральних ознак продуцента, а також для виявлення можливої контамінації сторонніми мікроорганізмами) та мікроскопіюванням (для визначення зовнішнього вигляду клітин).

					НУХТ БТЕК 04.03.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва $\alpha$ -амілази	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Марухіна В.В.					81	13
Перевір.		Буценко Л.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ <sup>с</sup>			

Висів на агаризовані середовища здійснюють так: пробу культуральної рідини об'ємом 1 мл висівають мікробіологічною петлею на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром для виявлення бактерій, а також із сусло-агаром – для виявлення дріжджів і грибів. *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB при рості на м'ясо-пептонному агарі утворює круглі шорсткі непрозорі колонії діаметром 2-4 мм білого або кремового кольору з хвилястими краями (рис. 8.1) [72].

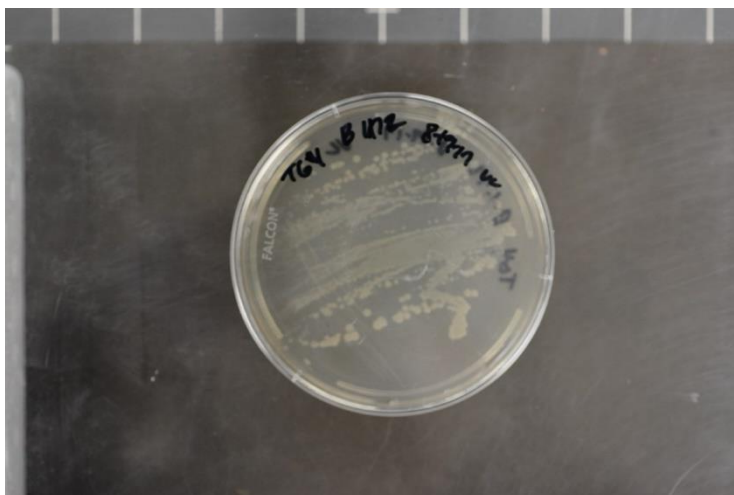


Рис. 5.1. Колонії *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB на м'ясо-пептонному агарі [73].

Мікроскопіювання здійснюють за допомогою світлового мікроскопа з імерсійною системою, використовуючи препарат «роздавлена крапля». Для приготування такого препарату на чисте знежирене предметне скло в асептичних умовах за допомогою стерильної мікробіологічної петлі наносять краплину культуральної рідини, яку розподіляють по склу таким чином, щоб діаметр мазка становив близько 1 см.

Отриманий мазок висушують без нагрівання за кімнатної температури, після чого на сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини гліцерину та здійснюють мікроскопіювання з імерсійним об'єктивом (збільшення 90x) [71]. Клітини *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB мають такий вигляд: паличкоподібні (зазвичай з заокругленими кінцями), довжиною 2,0-3,0 мкм і діаметром 0,7-0,8 мкм, можуть бути розташовані поодиноці, парами або (рідко) ланцюжками. [72].

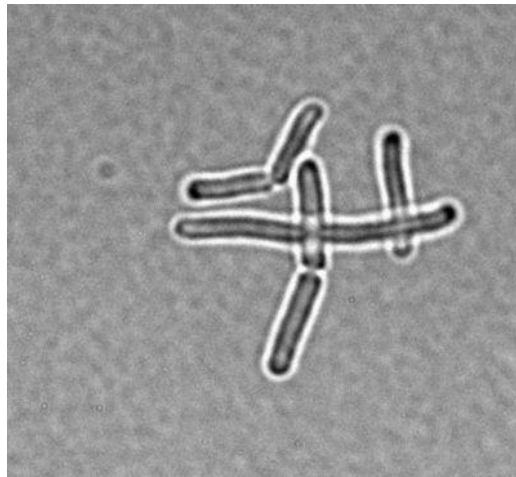


Рис. 5.2. Клітини *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB під мікроскопом.

## **8.2. Контроль показників росту та синтезу цільового продукту**

### **8.2.1. Визначення концентрації біомаси**

Визначення концентрації біомаси здійснюють так: відбирають пробу культуральної рідини об'ємом 5 мл, після чого її центрифугують за 12000g та 4 °C протягом 10 хв. Супернатант вилучають і використовують у подальшому на визначення концентрації  $\alpha$ -амілази, джерел вуглецю та азоту. Отриману біомасу ресуспендують у 0,9 % розчині натрію хлориду, після чого проводять центрифугування за тих умов, наведених вище. Осаджену біомасу висушують за 105 °C до постійної маси, після чого зважують (отримуючи значення ваги клітин, що містяться в 5 мл культуральної рідини) і здійснюють перерахунок на 1 л культуральної рідини [14].

### **8.2.2. Визначення активності $\alpha$ -амілази**

Визначення активності  $\alpha$ -амілази здійснюють за допомогою динітросаліцилової кислоти. Принцип методу базується на взаємодії ферменту з нітритами та динітросаліциловою кислотою, що призводить до утворення продукту з червоним забарвленням. Утворований продукт має спектрофотометрично вимірювану абсорбцію при характерній довжині хвилі.

Визначення активності  $\alpha$ -амілази здійснюють так: пробірку з 1,9 мл 1 %-го розчину розчинного крохмалю в буфері  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  (20 мМ, рН 6,0) витримують на водяній бані за температури 70 °C протягом 10 хв, після чого в пробірку додають супернатант, отриманий після відділення біомаси, в

кількості 0,1 мл. Утворений розчин витримують протягом 5 хв там же, після чого в пробірку додають 3 мл 3,5-динітросаліцилової кислоти. Утворену суміш витримують на водяній бані за температури 100 °С упродовж 7 хв, далі – охолоджують у льодяній воді (4 °С).

До охолодженого розчину додають 10 мл деіонізованої води, після чого вимірюють оптичну густину утвореної суміші за допомогою фотоелектроколориметра при довжині хвилі 540 нм і визначають активність  $\alpha$ -амілази за калібрувальним графіком [14].

### **8.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецю**

Джерел вуглецю в поживному середовищі є декілька: кукурудзяний сироп (кінцева концентрація 21 г/л), сахароза (5 г/л) і глюкоза (кінцева концентрація 222 г/л). Враховуючи те, що концентрація глюкози є значно вищою за концентрацію інших джерел вуглецю (а отже, глюкоза є основним субстратом), визначенню підлягатиме лише концентрація цього вуглецевого субстрату.

Контроль концентрації глюкози здійснюють так: 2 мл супернатанту, отриманого після відділення біомаси, вносять у пробірку, після чого додають 2 мл динітросаліцилового реактиву (отриманого розчиненням 1 г динітросаліцилової кислоти, 200 мг кристалічного фенолу та 50 мг натрію сульфату в 100 мл 1 %-го розчину натрію гідроксиду). Отриманий розчин витримують на водяній бані за температури 100 °С протягом 5 хв. До утвореної реакційної суміші додають 1 мл 40 % розчину солі Рошеля (тартрату калію-натрію). Утворену суміш темно-червоного кольору охолоджують, далі здійснюють вимірювання її оптичної густини на фотоелектроколориметрі за 510 нм. Визначають концентрацію глюкози в пробі за калібрувальним графіком [75].

### **8.2.4. Визначення концентрації джерела азоту**

Азотвмісних сполук у поживному середовищі є декілька: соєвий пептон (кінцева концентрація 21 г/л), амонію сульфат (2,68 г/л) та діамонію цитрат (1,0 г/л). Таким чином, азот представлений як у вигляді амінокислот,

так і іонів амонію. Враховуючи цей факт, доцільно буде визначати загальний азот. Для цього придатна методика, наведена в пункті 2.5.9 Державної Фармакопеї України [76]: до 2 мл супернатанту, отриманого після відділення біомаси, додають 4 мл деіонізованої води, після чого утворений розчин (який повинен містити близько 2 мг азоту) поміщають у колбу для спалювання. До розчину додають 4 г подрібненої суміші, що включає 100 г калію сульфату, 5 г міді сульфату, 2,5 г селену та три скляні кульки. Далі додають 5 мл кислоти сірчаної таким чином, щоб вона змивала всі частки, що прилипли до шийки колби, і стікала по стінках колби. Вміст колби перемішують і нагрівають протягом 30 хв, поступово доводячи до кипіння з конденсацією пари сірчаної кислоти у шийці колби.

Отриману суміш охолоджують, розчиняють твердий залишок, додаючи до суміші обережно 25 мл води очищеної, знову охолоджують і приєднують до приладу для перегонки з водяною парою. Додають 30 мл концентрованого розчину натрію гідроксиду та негайно починають перегонку, пропускаючи водяну пару крізь суміш. Близько 40 мл відгону збирають у приймач, що містить 20,0 мл 0,01 М розчину хлоридної кислоти і достатню кількість води очищеної для того, щоб кінець холодильника був занурений.

Наприкінці перегонки приймач опускають таким чином, щоб кінець холодильника знаходився над поверхнею рідини. Відгін титрують 0,01 М розчином натрію гідроксиду, використовуючи як індикатор змішаний розчин метилового червоного, до переходу забарвлення з червоно-фіолетового в зелене. Випробування повторюють, використовуючи замість проби культуральної рідини 50 мг глюкози. Вміст азоту розраховують за формулою:

$$\text{Вміст азоту} = 0,01401(n_2 - n_1)/V \%,$$

де  $V$  – об'єм проби культуральної рідини, мл;  $n_1$  – об'єм 0,01 М розчину натрію гідроксиду, витрачений на титрування розчину, одержаного після спалювання проби, мл;  $n_2$  – об'єм 0,01 М розчину натрію гідроксиду, витрачений на титрування розчину, одержаного після спалювання глюкози, мл.

### 8.3. Карта постадійного контролю виробництва $\alpha$ -амілази

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю виробництва  $\alpha$ -амілази

Номер та назва контрольної точки	Об'єкт контролю і показник	Методики та засоби проводжуваного контролю	Порядок відбору проби та періодичність контролю	Нормативний показник
1	2	3	4	5
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	<b>Повітрязабірник</b> Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	H (висота) = 16 м
Кт 1.2 Очистка повітря від грубих домішок	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після пропускання через фільтр грубої очистки	E (ступінь очистки) = 90%
Кт 1.3 Стиснення повітря	<b>Стиснене повітря</b> Тиск, температура	Манометр, термометр	Після завершення компресування	P = 0,35-0,5 МПа, t = 120-250°C
Кт 1.4 Охолодження повітря і видалення зайвої вологи	<b>Охоложене повітря</b> Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°C, W = 60%
Кт 1.5 Нагрівання повітря	<b>Нагріте повітря</b> Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після закінчення нагрівання	t = 40-50°C, W = 50%
Кт 1.6 Очищення повітря у головному фільтрі	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 95%
Кт, Км 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	E = 99,999%, КУО - 0

Продовження таблиці 8.1

<p>Кт, Км 2.1 <i>Приготування та стерилізація розчину мікроелементів</i></p>	<p><b>Розчин мікроелементів</b> Тиск, час, температура, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, температуру і тривалість визначаються безперервно протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після закінчення стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 2.2 <i>Приготування підживлювального розчину на виробничий біосинтез</i></p>	<p><b>Розчин термолабільних компонентів</b> Тиск, час, температура, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, температуру і тривалість визначаються безперервно протягом стерилізації, мікробіологічний контроль після закінчення стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 3.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту у колбах на качалках</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p><b>Композиція А</b> Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 3.1.2, 3.2.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p><b>Композиція Б</b> Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>

<p>Кт, Км, Кх 3.2.1, 3.3.1, 3.4.1</p> <p><i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для вироцуння посівного матеріалу в інокуляторах об'ємами 10, 100 л та у посівному апараті на 1 м<sup>3</sup></i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p><b>Композиція А</b> Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 20 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 3.3.2, 3.4.2</p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p><b>Композиція Б</b> Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 3.5.1</p> <p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері 10 м<sup>3</sup></i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А в УБС</i></p>	<p><b>Композиція А</b> Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 5-7 хв, відсутність мікробіоти</p>

Кт, Км 4.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	<b>Колекційна культура <i>Bacillus stearothermophilus</i> WHS9GSAB</b> температура, мік- робиологічна чис- тота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мік- робиологічний контроль – кожні 3-4 місяці	$t = 5 \pm 1$ °C, $\tau = 3 - 4$ місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 <i>Одержання робочої культури</i>	<b>Робоча культура <i>Bacillus stearothermophilus</i> WHS9GSAB на чашках Петрі</b> температура, мік- робиологічна чис- тота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вищування, мікробіологічний контроль проводять після вищування	$t = 37 \pm 1$ °C, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 <i>Вищування культури на щільному середовищі</i>	<b>Робоча культура <i>Bacillus stearothermophilus</i> WHS9GSAB у пробірках</b> температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вищування, мікробіологічний контроль проводять після вищування	$t = 37 \pm 1$ °C, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4. 4 <i>Отримання посівного матеріалу у колбах на качалках</i>	<b>Посівний матеріал</b> температура, час, швидкість пере- мішування, кон- центрація біома- си, мікробіологіч- на чистота	Термометр, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вищування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після вищування	$t = 37 \pm 1$ °C, $\tau = 24$ год, $w = 200$ об/хв, $C_b = 3 \pm 0,5$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Км, Кх 4.5, 4.6, 4.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 л, 100 л та посівному апараті на 1 м<sup>3</sup></p>	<p><b>Посівний матеріал</b> Температура, час, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО<sub>2</sub>, ротаметр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування</p>	<p>t = 37±1 °С, τ = 24 год, рО<sub>2</sub> = 20 – 30%, w = 200 об/хв Сб 3±0,5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м<sup>3</sup></p>	<p><b>Культуральна рідина</b> Температура, час, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, активність α- амілази, мікробіологічна чистота,</p>	<p>Датчик температури, годинник, тахометр, датчик рО<sub>2</sub>, ротаметр, центрифуга, електронні терези, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси, активність α- амілази і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування</p>	<p>t = 37±1 °С, τ = 93 год, рО<sub>2</sub> = 20 – 30%, w = 100 об/хв Сб = 62±0,5 г/л, А = 35779,5 Од/мл, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

#### 8.4. Методи ідентифікації амілази

Цільовим продуктом є амілаза, тому методом її ідентифікації є визначення її амілолітичної активності (АА) [77].

За одиницю АА беруть таку кількість ферменту, що в чітко визначених умовах (температура 30°С, рН 4,7-4,9 і тривалість реакції 10 хв) каталізує гідроліз до декстринів різної молекулярної маси 1 г розчинного крохмалю, що становить 30 % введеного до реакції.

В основу визначення АА покладена залежність ступеня гідролізу крохмалю від числа одиниць ферменту, який взято на аналіз. Ступінь гідролізу визначають візуально або за допомогою фотоелектроколориметру.

При візуальному способі ферментативна реакція проводиться до повного перетворення крохмалю в низькомолекулярні вуглеводи, що не забарвлюються йодом. Активність визначають за часом, що пішов на ці перетворення крохмалю. Для порівняння з результатами фотоколориметричного методу одиниці, що отримані візуальним методом, потрібно помножити на 5.

#### Приготування досліджуваної проби препарату

Для приготування витяжки зважують 0,1-1,0 г ферментного препарату. Переводять наважку у мірну колбу на 100 см<sup>3</sup>, додають 10 см<sup>3</sup> ацетатного буфера з рН 4,7 і доводять вміст колби до мітки дистильованою водою. Суміш ретельно перемішують, витримують в термостаті при температурі 30°С 1 год., а потім фільтрують через паперовий фільтр. Одержаний фільтрат використовують для проведення ферментативної реакції [77].

#### Проведення реакції

Суміш ставлять у термостат при температурі 30°С і починають відлік часу витримки. Через кожну хвилину відбирають з пробірки на білу порцелянову пластину одну-дві краплі суміші і фіксують час, коли йод перестане змінювати своє забарвлення при змішуванні з сумішшю. Аналіз триває 10-20 хв. Якщо забарвлення йоду зникає менше ніж через 10 хв., визначення проводять з 1 см<sup>3</sup> солодової витяжки і 24 см<sup>3</sup> води. Якщо реакція триває довше ніж 20 хв., треба збільшити кількість солодової витяжки. Але за будь-яких умов загальний об'єм реакційної суміші має бути 50 см<sup>3</sup>. Величину АА розраховують за формулою, од./г [77]:

$$AA = \frac{0,25 \times 60}{a \times t} \frac{\text{од.}}{г},$$

де 0,25 – маса крохмалю в 25 см<sup>3</sup> розчину, г;

60 – перерахунок на одиницю часу;

$a$  – маса солоду в реакційному середовищі, г;

$t$  – тривалість оцукрювання, хв [77].

## **8.5. Показники якості амілази**

### *1. Зовнішній вигляд*

Порошкоподібна субстанція від світло-коричневого до коричневого кольору. Визначають візуально [78].

### *2. Розчинність амілази*

Розчинність — це властивість речовини розчинятися в різних розчинниках. Розчинність препарату амілази можна визначити ваговим методом [79].

Розчинність визначають наступним чином: наважку масою 0,1 г попередньо розтертого в порошок препарату вносять в відміряний об'єм розчинника, відповідний мінімальному його об'єму. Потім додають розчинник до максимального його об'єму, при якому в розчині неозброєним оком не виявляються частинки препарату. Процес розчинення здійснюється в розчинниках, які мають температуру 20°C, масу препарату відважують на вагах з точністю до 0,01 г з таким розрахунком, щоб на встановлення розчинності води витрачалася не більше 100 мл, а органічних розчинників - не більше 10-20 мл [79].

### *3. Вміст білка*

Визначення кількості білка проводять згідно з Бредфордом, використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт [80].

Аналіз білка Бредфорда базується принципі зв'язування молекули барвника кумасі блискучого блакитного з білками, що призводить до зміни спектра поглинання барвника. Коли барвник зв'язується з білком, його максимум поглинання зміщується з 465 нм до 595 нм, що призводить до зміни кольору з коричневого на синій. Кількість білка в зразку визначають шляхом вимірювання поглинання розчину синього кольору при 595 нм і порівняння його зі стандартною кривою, отриманою з використанням відомих концентрацій білка [81].

#### 4. Кількісний вміст

Активність амілази оцінюють за методикою [82].

Принцип: 3,5-динітросаліцилова кислота широко використовується в біохімії для оцінки відновлюючих цукрів. Відбувається виявлення наявності вільної карбонільної групи (C=O) відновлюючих цукрів, які виникають при дії ферменту на крохмаль.

Для приготування реакційної суміші 1 мл досліджуваного зразка змішують з 1 мл солубілізованого розчину крохмалю і потім інкубують при 60 °C протягом 10 хв. Реакцію зупиняють додаванням 2 мл реагенту динітросаліцилової кислоти (DNS). Суміш охолоджують на водяній бані з льодом протягом 10-15 хвилин, а потім центрифугують при 5000 об/хв протягом 5 хвилин при 4 °C. Кількість ферменту вимірюють при 540 нм за допомогою UV-Vis спектрофотометра, проти холостого розчину як стандарту.

Одну одиницю активності ферменту визначають як кількість амілази, необхідної для виробництва 1 мкмоль мальтози за хвилину в умовах аналізу. Визначення активності амілази проводять в трьох повторах, значення обчислюють за середніми результатами разом із середнім значенням стандартної помилки [82].

#### 5. Питома активність

Активність ферментів виражають в міжнародних одиницях активності. Кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мікромоль субстрату на продукт реакції за 1 хв у стандартних (оптимальних) умовах з розрахунку на 1 г тканини називається міжнародною одиницею (МО) [83].

Для оцінки кількості молекул фермента серед інших білків досліджуваної тканини визначають **питому активність** – це кількість одиниць фермента в досліджуваному зразку, розділену на масу білка (мг) у цьому зразку. За цією величиною аналізують ступінь очистки фермента: чим менше сторонніх білків, тим вища питома активність [83].

Значення активності амілази *Bacillus stearothermophilus* WHS9GSAB має становити 35 779,5 Од/мл [14].

## РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Під час біотехнологічного виробництва утворюються відходи, які не використовуються далі. Ці відходи можуть бути рідкими, газоподібними або твердими. Важливо правильно їх знешкоджувати та утилізувати, адже вони можуть бути небезпечними для людей, тварин та навколишнього середовища.

### 9.1. Система знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи під час виробництва  $\alpha$ -амілази *Bacillus stearothermophilus*, представляють собою:

- відпрацьовані залишки мийних засобів
- відпрацьованої води для ополіскування обладнання

Культуральна рідина при цьому не є рідким відходом.

Розрахуємо залишки мийно-дезінфікуючих засобів.

Відомо, що для миття та дезінфекції обладнання за допомогою мобільної циркуляційної СІР-мийки необхідно приготувати робочі розчини із розрахунку 20-30% від об'єму ємкісного обладнання. Відповідно до специфікації обладнання, для цього розрахунку будемо використовувати реактори-збірники, збірники-змішувачі, інокулятори та ферментери.

$$V_{\text{ємностей}} = V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{ферментер}} = 5 + 10 + 40 + 100 + 250 + 400 + 1000 + 40 + 2500 + 6300 + 10\,000 = 20\,645 \text{ л}$$

Тоді об'єм мийних-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,2 = 20645 \times 0,2 = 4\,129 \text{ л.}$$

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,3 = 20645 \times 0,3 = 6\,193,5 \text{ (6\,194) л.}$$

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 4 129-6 194 л.

Також слід підсумувати обсяги відпрацьованої води після ополіскування обладнання.

					НУХТ БТЕК 04.03.17 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Марухіна В.В.			РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					94	7
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання. Як розраховано вище, цей параметр дорівнює 4 129-6 194 л.

Таким чином, в сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме:  $6194+6194 = 12\ 388$  л

### **Опис системи очищення стічних вод**

Наразі популярними є способи анаеробного біологічного очищення стічних вод, які можуть бути застосовані для очищення побутових та промислових стічних вод.

В основу корисної моделі [84] поставлено задачу підвищити ефективність біологічного очищення стічних вод за рахунок інтенсифікації процесу масообміну шляхом оснащення біореактора запропонованими елементами та їх взаємним розташуванням.

Влаштування перфорованого трубопроводу для розподілу стічних вод дозволяє досягти високого ступеня перемішування стічних вод, унеможлиблює утворення "мертвих зон". Перфорований трубопровід розміщено співвісно з корпусом анаеробного біореактора, що дозволяє створити сприятливий гідравлічний режим розподілу стічних вод в об'ємі споруди. Встановлення теплообмінника на рециркуляційному трубопроводі дозволяє інтенсифікувати процес шляхом підвищення температури стічних вод у анаеробному реакторі.

На поверхні мікробної клітини внаслідок метаболізму утворюються пухирці газу, які перешкоджають живленню мікроорганізму. Пухирці газу відриваються самостійно від клітини тільки при досягненні певного розміру, що є досить тривалим процесом. Розподіл стічних вод через перфорований рециркуляційний трубопровід забезпечує оновлення шару іммобілізованих мікроорганізмів та своєчасне відділення пухирців газу з поверхні мікробної клітини, що дозволяє інтенсифікувати процес живлення мікроорганізмів, тим самим збільшити поверхню контакту стічної води та мікроорганізмів.

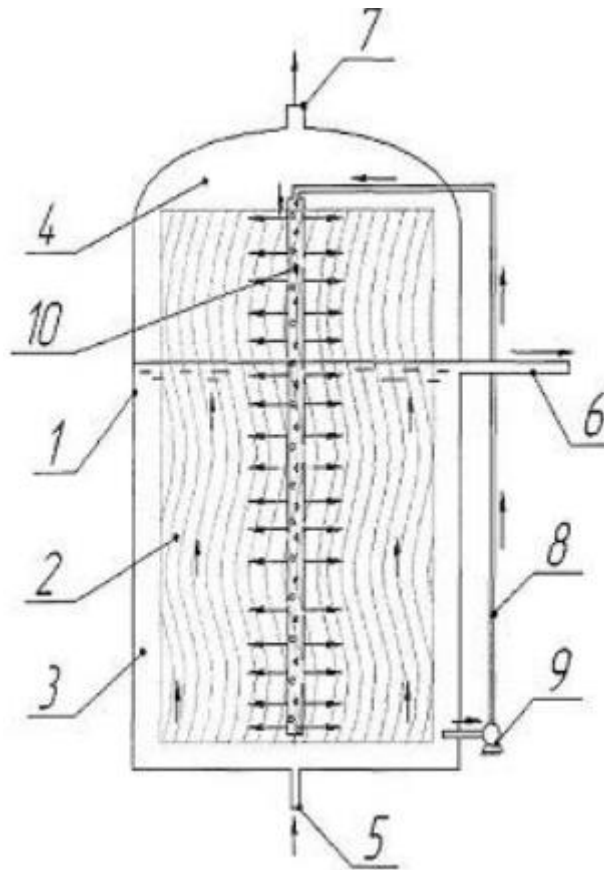


Рис. 9.1. Пристрій для анаеробного очищення стічних вод [84].

Пристрій працює наступним чином. Стічна вода надходить по трубопроводу 5 у водне середовище 3, анаеробний біореактор, який знаходиться у корпусі 1. Процес очищення стічних вод забезпечується закріпленими на волокнистому носії 2 та вільноплаваючими мікроорганізмами. Анаеробне біологічне очищення стічних вод полягає у деструкції органічних забруднень, які містяться в стічних водах. Постійний відбір стічних вод для рециркуляції з нижньої частини біореактора насосом 9 попереджає утворення осаду та замулення насоса, який може встановлюватися як зовні, так і всередині споруди. Підведення стічних вод рециркуляційним трубопроводом 8 і розподіл через перфорований трубопровід 10 дозволяє досягти високого ступеня перемішування стічних вод, унеможливорює утворення "мертвих зон", значно підвищує ефективність масообмінних процесів. Розташування волокнистого носія і розбризкування рециркуляційних стічних вод у газовому середовищі 4 дозволяє інтенсифікувати процес очищення стічних вод та збільшити окисну

потужність споруди. В анаеробному біореакторі влаштовано пристрої для збору газу 7, викиди якого призводять до погіршення екологічного стану довкілля. Очищена стічна вода відводиться трубопроводом 6 з анаеробного біореактора.

Використання такої установки не вимагає додаткового застосування складного механічного, аераційного чи іншого обладнання і у порівнянні з відомими способами дозволяє збільшити ступінь очищення стічних вод на 5-10 % шляхом збільшення швидкості масообмінних процесів очищення стічних вод. Такий пристрій знайде широке застосування при очищенні господарсько-побутових та промислових стічних вод [84].

## **9.2. Система знешкодження газоподібних відходів**

Утворення газоподібних відходів, що містять аерозоль клітин у вигляді відпрацьованого повітря після аерації культуральної рідини на стадіях:

- отримання посівного матеріалу в інокуляторі 10 л
- отримання посівного матеріалу в інокуляторі 100 л
- отримання посівного матеріалу в посівному апараті 1м<sup>3</sup>
- отримання посівного матеріалу в ферментері 10м<sup>3</sup>

Розрахуємо об'єм відпрацьованого повітря, знаючи, що він приблизно дорівнює об'ємам аераційного повітря

1. В інокуляторі 10 л, робочий об'єм 6 л, отже аераційного повітря потрібно 12л/хв, тобто 720 л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 24 год, для цього необхідно 17 280 л аераційного повітря на виробничий цикл.

2. В інокуляторі 100 л, робочий об'єм 60 л, отже аераційного повітря потрібно 120л/хв, тобто 7200 л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 24 год, для цього необхідно 172 800 л аераційного повітря на виробничий цикл.

3. В посівному апараті 1м<sup>3</sup> (1000 л), робочий об'єм 600 л, отже аераційного повітря потрібно 1200 л/хв, тобто 72000 л/год. Процес отримання

посівного матеріалу займає 24 год, для цього необхідно 1 728 000 л аераційного повітря на виробничий цикл.

4. У ферментері 10м<sup>3</sup> (10 000л), робочий об'єм 6000 л, отже аераційного повітря потрібно 12 000 л/хв, тобто 720 000 л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 24 год, для цього необхідно 17 280 000 л аераційного повітря на виробничий цикл.

У сумі  $17,28 \text{ м}^3 + 172,8 \text{ м}^3 + 1728 \text{ м}^3 + 17280 \text{ м}^3 = 19 198,08 \text{ м}^3$  відпрацьованого повітря на цикл.

### **Опис системи очистки повітря**

Для очищення відпрацьованого аераційного повітря можна застосувати спосіб, описаний у патенті [85].

В основу корисної моделі поставлено задачу створення такого пристрою для очищення та регенерації повітря, в якому за рахунок конструктивних змін з'являється можливість підвищення ефективності його експлуатації та розширення функціональних можливостей, за рахунок регенерації повітря - відновлення його нормального хімічного складу, зміненого внаслідок життєдіяльності людей, роботи технічних пристроїв і ін.

Поставлена задача досягається тим, що пристрій для очищення та регенерації повітря, що містить корпус, в якому в напрямку повітряного потоку розташовано щонайменше один вентилятор, фільтр та блок іонізації повітря, щонайменше одну очисну матрицю, що розташована в корпусі; озоновий генератор, що розміщений біля очисної матриці; блок увімкнення, що розташований на бічній стороні корпусу; блок управління, що розміщений в верхній частині корпусу та поєднаний з блоком увімкнення, щонайменше одним вентилятором, очисними матрицями, блоком іонізації повітря та озоновим генератором; фільтр розташовано в задній частині корпусу [85].

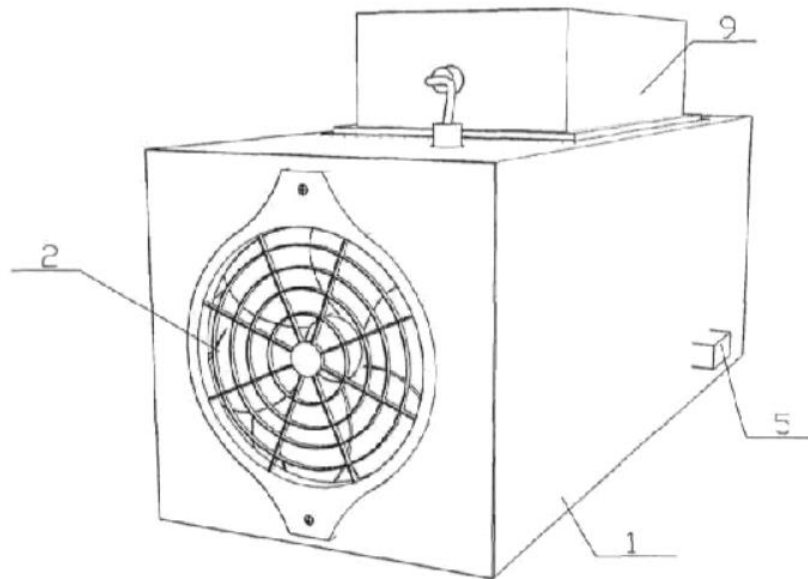


Рис. 9.2. Пристрій для очищення забрудненого повітря [85].

Пристрій для очищення та регенерації повітря, що містить корпус 1, в якому в напрямку повітряного потоку розташовано щонайменше один вентилятор 2 та блок іонізації повітря 3. Вентилятор 2 розміщено в передній частині корпусу 1. Фільтр 4 розташовано в задній частині корпусу 1. Блок увімкнення 5 розташовано на бічній стороні корпусу 1. Дві очисні матриці 6, 7 (приклад) розташована в корпусі 1. Біля очисних матриць 6, 7 розміщено озоновий генератор 8. Блок управління 9 розміщено в верхній частині корпусу 1 та поєднаний з вентилятором 2, блоком увімкнення 5, очисними матрицями 6, 7, блоком іонізації повітря 3 та озоновим генератором 8.

Пристрій для очищення та регенерації повітря працює наступним чином: вмикається блок увімкнення 5, що розташований на бічній стороні корпусу 1. Після чого приводяться в дію блок управління 9 та вентилятор 2, розміщений на передній стороні корпусу 1. Забруднене повітря за допомогою вентилятора 2 надходить в корпус 1. Після чого блок управління 9 вмикає щонайменше дві очисні матриці 6, 7 (приклад), озоновий генератор 8 та блок іонізації повітря 3. Забруднене повітря за допомогою блока іонізації повітря 3 очищується від домішок пилу, плісняви та ін. Очисні матриці 6, 7 окислюють повітря, створюючи в ньому природні окислювачі, які очищують повітря від вірусів, патогенів та шкідливих мікроорганізмів. Озоновий генератор 8 підсилює

процес окислення запахів, що дозволяє швидше та ефективніше видалити їх з повітря. Природні окислювачі поступають в робочу зону приміщення, очищують його, створюючи природний мікроклімат безпечний для людини та тварин. Фільтр 4 розташований на задній частині корпусу 1 захищає очисні матриці 6, 7 від попадання великих забруднюючих частинок. Під час робочого циклу блок управління 9 розміщений в верхній частині корпусу 1 вмикає та контролює роботу пристрою для очищення та регенерації повітря.

Запропонована конструкція пристрою для очищення та регенерації повітря на відміну від існуючих аналогів забезпечує сприяє підвищенню ефективності експлуатації та розширенню функціональних можливостей. Це забезпечується розробленими конструктивними змінами пристрою для очищення та регенерації повітря. Одною з яких є використання в якості елементів очищення очисних матриць Active Pure, RCI, PCO, REME, PHI [85].

### **9.3. Система знешкодження твердих відходів**

Тверді відходи на підприємстві:

- Бруд на фільтрах
- Непридатні хімічні реактиви (порошки для приготування композицій, розсипані солі)
- Пакувальні матеріали (картон, поліетилен та ін.)
- Скло

**Тверді відходи на фільтрах.** На фільтрах можуть залишитись клітини продуценту, тому використані фільтри піддають обробці в убойному автоклаві та передають організаціям, які займаються їх утилізацією.

**Непридатні хімічні реактиви.** Варто зберігати в окремо відведеній шафі, а потім передавати спеціальним організаціям на утилізацію.

**Інші відходи.** Варто складати в окремі контейнери з кришками (мукулатура, скло, ін) та передавати на переробку до пунктів вторсировини.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Sundarram, A. & Murthy, T. (2014).  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 2(4), 166-175. doi: 10.12691/jaem-2-4-10.
2. Lee C.Y., deMan J.M. Enzymes. *Food Science Text Series*. 2018, 397–433. doi:10.1007/978-3-319-63607-8\_10
3. Кузьо Н. Є., Косар Н. С., Пагута М. Г. Дослідження ринку хліба та хлібобулочних виробів України та обґрунтування товарних інновацій виробників на ньому. *Економіка і суспільство*. 2017, (12): 284-291.
4. Жигунов Д. О., Ковальова В. П., Жиронкіна Д. С. (2017). Використання  $\alpha$ -амілази для покращення хлібопекарських властивостей борошна. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Технології харчових продуктів і комбікорнів», (Одеса, ОНАХТ, 25-30 вересня 2017 р.) С. 4 – 5.
5. de Souza, P. M., & de Oliveira Magalhães, P. (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - A review. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 41(4), 850–861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>.
6. Saini, Ritu & Saini, Harnek & Dahiya, Anjali & Correspondence, Harnek & Saini. (2017). Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(4), 1865–1871.
7. Технологія переробки сільськогосподарської продукції [Електронний ресурс] : [міжпредмет. тренінг для студ. спеціалізації «Економіка агропромислових формувань»] / Ф. В. Іваненко, А. Т. Соколовський. — К. : КНЕУ, 2014. — 268 с.
8. AMYLASE, LIQUID Termamyl® SC DS [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.novozymes.com/en/products/brewing/cereal-cooking/termamyl-sc-ds> .

9. Novozymes launches new enzyme for improved texture and shelf life in baked goods [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://issuu.com/foodworldmedia/docs/milling\\_meat\\_issue\\_4\\_digital/s/27815935](https://issuu.com/foodworldmedia/docs/milling_meat_issue_4_digital/s/27815935).

10. AMYLASE, GRANULATE Novamyl® BestBite [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.novozymes.com/en/products/baking/freshness/novamyl-bestbite> .

11. Гайдук, К. П., Подобій, О. В. (2019). Розробка комплексного поліпшувача на основі альфа амілази. *Молодий вчений*, 1(2), 262-265.

12. van der Maarel, M. J., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of biotechnology*, 94(2), 137–155. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00407-2).

13. Simair, A. A., Qureshi, A. S., Khushk, I., Ali, C. H., Lashari, S., Bhutto, M. A., Mangrio, G. S., & Lu, C. (2017). Production and Partial Characterization of  $\alpha$ -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. *BioMed research international*, 2017, 9173040. <https://doi.org/10.1155/2017/9173040>.

14. Yao, Dongbang & Zhang, Kang & Su, Lingqia & Liu, Zhanzhi. (2021). Enhanced extracellular *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase production in *Bacillus stearothermophilus* by balancing the entire secretion process in an optimal strain. *Biochemical Engineering Journal*. 168. 107948. [10.1016/j.bej.2021.107948](https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107948)..

15. Wang, Y. C., Zhao, N., Ma, J. W., Liu, J., Yan, Q. J., & Jiang, Z. Q. (2019). High-level expression of a novel  $\alpha$ -amylase from *Thermomyces dupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production. *International journal of biological macromolecules*, 127, 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.162>.

16. Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: a review. *Archives of microbiology*, 203(4), 1281–1292. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>.

17. Elyasi Far, B., Ahmadi, Y., Yari Khosroshahi, A., & Dilmaghani, A. (2020). Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 10(3), 350–358. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.043>.
18. Rana, N., Walia, A. Gaur, A. (2013).  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources and Its Potential Applications in Various Industries. *National Academy Science Letters*. 36, 9 – 17. doi: 10.1007/s40009-012-0104-0.
19. Muthusamy, Chandrasekaran & Basheer, Soorej & Chellappan, Sreeja & G Krishna, Jissa & Ps, Beena. (2015). Enzymes in Food and Beverage Production: An Overview. *Enzym Food Beverage Process CRC Press*. 25,133-154.
20. Mojsov, K., Andronikov, D., Janevski, A., Jordeva, S., Kertakova, M., Golomeova, S., Ignjatov, I. (2018). Production and application of  $\alpha$ -amylase enzyme in textile industry. *Tekstilna industrija*. 66 (1), 23-28.
21. Elizabeth, Ojewumi & Akwayo, Iniobong & Taiwo, Olugbenga & Obanla, Oyinlola & Ayoola, Ayodeji & Ojewumi, Emmanuel & Oyenyi, Esther. (2018). Bio-Conversion of Sweet Potato Peel Waste to BioEthanol Using *Saccharomyces Cerevisiae*. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*.8 (3), 46-54.
22. Paul, J. S., Gupta, N., Beliya, E., Tiwari, S., & Jadhav, S. K. (2021). Aspects and Recent Trends in Microbial  $\alpha$ -Amylase: a Review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 193(8), 2649–2698. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03546-4>.
23. Sridharan, Jagadeeswari & Santhi, R. (2016). Optimization of Agroresidues for  $\alpha$ -Amylase Production by *Bacillus stearothermophilus* PS03 and its Application in Detergent Industry. *Journal of Academia and Industrial Research*. 5, 109-113.
24. Ніколаєнко С. М., Куліш С. Г. Аналіз виробництва хліба та хлібобулочних виробів в Україні. Приазовський економічний вісник. 2020, 3 (20): 252 – 257. doi: 10.32840/2522-4263/2020-3-43.

25. Жигунов Д. О., Марченков Д. Ф. Застосування ферментних препаратів при виробництві хлібу в Україні: актуальні питання та можливі шляхи їх вирішення. Матеріали 79 наукової конференції викладачів Одеської національної академії харчових технологій (Одеса, ОНАХТ, 16 – 19 квітня 2019 р.) С. 14 – 16.
26. Rizk, M. A., Helal, M. S., El-Kholan, y E. A. (2018). Improvement of wheat dough baking properties using  $\alpha$ -Amylase isolated from *Aspergillus niger*. *Curr. Sci. Int.* 7 (4), 835-844.
27. Новойтенко І. В., Малиновський В. В. Стан та основні тренди розвитку хлібопекарської промисловості України. *Ефективна економіка*. 2020, 11. doi: 10.32702/2307-2105-2020.11.52.
28. Демографічна та соціальна статистика. Споживання продуктів харчування в домогосподарствах у 2019 р. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.ukrstat.gov.ua>.
29. Ait Kaki El-Hadef El-Okki, A., Gagaoua, M., Bourekoua, H., Hafid, K., Bennamoun, L., Djekrif-Dakhmouche, S., El-Hadef El-Okki, M., & Meraihi, Z. (2017). Improving Bread Quality with the Application of a Newly Purified Thermostable  $\alpha$ -Amylase from *Rhizopus oryzae* FSIS4. *Foods (Basel, Switzerland)*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.3390/foods6010001>.
30. Подпрятков Г. І., Скалецька Л. Ф., Сеньков А. М., Хилевич В. С. Зберігання і переробка продукції рослинництва: Навч. посіб. — К.: Мета, 2002. — С. 495.
31. Hussain, Iltaf & Siddique, Faisal & Mahmood, M.S. & Ahmed, S.I.. (2013). A review of the microbiological aspect of  $\alpha$ -amylase production. *International Journal of Agriculture and Biology*. 15. 1029-1034.
32. Starch and sucrose metabolism – *Geobacillus stearothermophilus* [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/gse00010>

33. Берегова Т.В., Островська Г.В., Рибальченко Т.В. та ін. Цитофізіологія й біохімія травлення. Практикум: навч. посібник. – ВПЦ «Київський університет», 2006. – 272 с.

34. Nucleotide sugar biosynthesis [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.genome.jp/module/gse\\_M00549](https://www.genome.jp/module/gse_M00549).

35. Fatty acid biosynthesis [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.genome.jp/module/gse\\_M00082](https://www.genome.jp/module/gse_M00082)

36. Phosphate acetyltransferase-acetate kinase pathway [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.genome.jp/module/gse\\_M00579](https://www.genome.jp/module/gse_M00579)

37. Біосинтез амінокислот. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.genome.jp/pathway/gse01100+GT50\\_11585](https://www.genome.jp/pathway/gse01100+GT50_11585).

38. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.

39. Фільтруючий матеріал G4 від NEW FILTER. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html>.

40. Фільтруючі матеріали F5-F9. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchi-materiali-f5-f9.html>.

41. ІНСТРУКЦІЯ щодо застосування засобу дезінфікуючого «Біопагdez» з метою дезінфекції, дезінфекції високого рівня (ДВР), передстерилізаційного очищення та стерилізації [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin\\_upload/dana/biopacdez-enzim.pdf](http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/dana/biopacdez-enzim.pdf)

42. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%92%D1%96%D0%B4%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%82%D1%96%20%D0%B4%D0%B0%D0%BD%D1%96/20\\_20\\_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2%201-1006%20\(1\).pdf](https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%92%D1%96%D0%B4%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%82%D1%96%20%D0%B4%D0%B0%D0%BD%D1%96/20_20_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2%201-1006%20(1).pdf)

43. ПЗ-стерил дез.засіб, 5 л (Ecolab) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vettorg.info/atcvet/qv/qv07/p3-steril-dezsr-5-l-ecolab>

44. Інструкція щодо застосування засобу "КВІКЦИД" з метою антисептичної обробки шкіри рук та шкірних покривів, екстреної дезінфекції (термінового знезараження) інструментів, виробів, невеликих поверхонь [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin\\_upload/dana/kvikcid.pdf](http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/dana/kvikcid.pdf)

45. ОБГРУНТУВАННЯ відповідно до вимог п.4 Постанови КМУ від 11 жовтня 2016 року №710 до процедури закупівлі № UA-2022-01-11-003036-a [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://shpola.crl.net.ua/wp-content/uploads/2022/01/obhruntuvannia-dyzinfektsijni-1.pdf>

46. ІНСТРУКЦІЯ щодо використання засобу дезінфікуючого «Етасепт (Etasept)» з метою дезінфекції шкіри, слизових, поверхонь та ВМП [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lysoform.shop/wp-content/uploads/2020/07/instrukciya-%C2%ABetasept-etasept%C2%BB.pdf>

47. Методичні рекомендації щодо застосування засобу «Ладоксин» з метою дезінфекції шкіри рук та шкірних покривів, екстреної дезінфекції [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin\\_upload/dana/ladokcin.pdf](http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/dana/ladokcin.pdf)

48. Zhang, K., Su, L., Duan, X., Liu, L., & Wu, J. (2017). High-level extracellular protein production in *Bacillus stearothermophilus* using an optimized dual-promoter expression system. *Microbial cell factories*, 16(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0649-1>.

49. Wenzel, M., Müller, A., Siemann-Herzberg, M., & Altenbuchner, J. (2011). Self-inducible *Bacillus stearothermophilus* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), 6419–6425. <https://doi.org/10.1128/AEM.05219-11>.

50. Піногасник F1154 на 500 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://mirbeer.com.ua/ru/pivovarenie/3755-penogasitel-f1154-na-500-l.html>.

51. Повітрозбірник. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://entech-ukraine.dp.ua/ua/p1740365703-vozduhosbornik-resiver-dlya.html>.

52. Компресор АВАС В5900В/500 FT5.5. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://storgom.ua/ua/product/kompressor-ceccato-b5900b-500-ft55.html#properties-tab>.

53. Кожухотрубні охолоджувачі. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-oxolodzhuvachi/?utm\\_source=google&utm\\_content=&utm\\_term=&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=Sales\\_Performance\\_Max&gclid=Cj0KCQjwj5mpBhDJARIsAOVjBdqD6CFSBYdrBq0kS50A-GWlPnqIFpTYx4x7IV7a91PEq5zo5KXeu7gaAvydEALw\\_wcB](https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-oxolodzhuvachi/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cpc&utm_campaign=Sales_Performance_Max&gclid=Cj0KCQjwj5mpBhDJARIsAOVjBdqD6CFSBYdrBq0kS50A-GWlPnqIFpTYx4x7IV7a91PEq5zo5KXeu7gaAvydEALw_wcB).

54. Ресивер стисненого повітря 900 літрів. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kyiv.prom.ua/ua/p1882844999-vozdushnye-resivery-vozduhosborniki.html?&primelead=NC4z>.

55. Рідинні калорифери (нагрівачі та охолоджувачі). [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://opeks.ua/ua/ridinni-kaloriferi-nagrivachi-ta-oxolodzhuvachi-/?utm\\_source=google&utm\\_content=&utm\\_term=&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=Sales\\_Performance\\_Max&gclid=Cj0KCQjw7JOpBhCfARIsAL3bobd6LlFlxR26YtzhIHKJW5XyLclheWN49Fg3ZPbycJN21TYTr1yovqoaAhlREALw\\_wcB](https://opeks.ua/ua/ridinni-kaloriferi-nagrivachi-ta-oxolodzhuvachi-/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cpc&utm_campaign=Sales_Performance_Max&gclid=Cj0KCQjw7JOpBhCfARIsAL3bobd6LlFlxR26YtzhIHKJW5XyLclheWN49Fg3ZPbycJN21TYTr1yovqoaAhlREALw_wcB).

56. Кишеньковий фільтр ФЯК F9 592x490x600-8. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://asfilter.com.ua/ua/catalog/karmannye-filtry/karmannyu-filtr-592kh490kh600-8-f9/>.

57. DOUBLE-WALL GLASS LABORATORY REACTOR - 5 LITER. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.mrclab.com/reactor\\_5liter\\_up\\_to\\_500rpm](https://www.mrclab.com/reactor_5liter_up_to_500rpm).

58. CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>.

59. Апарати сталіні емальовані з механічним змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс] – режим доступу: [http://euromash.kiev.ua/ua/aparati\\_emal\\_mehaniceskim\\_perem\\_ustroystvom\\_ua.php](http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehaniceskim_perem_ustroystvom_ua.php).

60. ВАГОВИЙ ДОЗАТОР АF – 25К. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://tenzomir.com/katalog/vesovie\\_dozatori/%d0%b2%d0%b5%d1%81%d0%be%d0%b2%d0%be%d0%b9-%d0%b4%d0%be%d0%b7%d0%b0%d1%82%d0%be%d1%80-af-25k/](https://tenzomir.com/katalog/vesovie_dozatori/%d0%b2%d0%b5%d1%81%d0%be%d0%b2%d0%be%d0%b9-%d0%b4%d0%be%d0%b7%d0%b0%d1%82%d0%be%d1%80-af-25k/).

61. Feldmeier TK0323M 250 Liter Stainless Steel Jacketed Reactor. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.labx.com/item/feldmeier-tk0323m-250-liter-stainless-steel-jacketed/LV41840925>.

62. Насос молочний Г2-ОПА. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bts.net.ua/ua/pumping-equipment-distillery/sanitary-hygienic-pumps/nasos-molochniy-g2-opa-6-3m3-h-0-75kw-380v/>.

63. 400 liter heat-/coolable pressure tank, Aisi 316 with magnetic agitator. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.behaelter-kg.de/en/400-liter-heat-coolable-pressure-tank-aisi-316-with-magnetic-agitator-8372-2.html>.

64. Mobius® 1000 L and 2000 L Single-use Bioreactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/20150603\\_201512?RedirectedFrom=%2Fmobius-twist](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/20150603_201512?RedirectedFrom=%2Fmobius-twist).

65. ВАГОВИЙ ДОЗАТОР АF – 50К. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://tenzomir.com/katalog/vesovie\\_dozatori/%d0%b2%d0%b5%d1%81%d0%be%d0%b2%d0%be%d0%b9-%d0%b4%d0%be%d0%b7%d0%b0%d1%82%d0%be%d1%80-f103a-50k/](https://tenzomir.com/katalog/vesovie_dozatori/%d0%b2%d0%b5%d1%81%d0%be%d0%b2%d0%be%d0%b9-%d0%b4%d0%be%d0%b7%d0%b0%d1%82%d0%be%d1%80-f103a-50k/).

66. 2500 liter heat-/coolable pressure tank, Aisi 316. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.behaelter-kg.de/en/2500-liter-heat-coolable-pressure-tank-aisi-316-8126-2.html>.

67. Насос харчовий відцентровий Г2-ОПБ. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bts.net.ua/ua/pumping-equipment-distillery/sanitary-hygienic-pumps/nasos-kharchoviy-v-dcentroviy-g2-opb-10m3-h-1-5kw-380v/>.

68. Перистальтичний дозувальний насос. [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://agro-teh.com.ua/p643581922-peristalticheskij-doziruyuschij-nasos.html?source=merchant\\_center&gclid=CjwKCAjwwL6aBhBlEiwADycBIKt6azvaejLVK41nGJIwecNHEl1qIZQctY5rPbeDgO3ydO-I07XwRoCxrKQAvD\\_BwE](https://agro-teh.com.ua/p643581922-peristalticheskij-doziruyuschij-nasos.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwwL6aBhBlEiwADycBIKt6azvaejLVK41nGJIwecNHEl1qIZQctY5rPbeDgO3ydO-I07XwRoCxrKQAvD_BwE).

69. Pfaudler DIN BE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf>.

70. Насос харчовий 1Г2-ОПД. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bts.net.ua/ua/pumping-equipment-distillery/sanitary-hygienic-pumps/nasos-kharchoviy-1g2-opd-25m3-h-5-5kw-380v/>.

71. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.

72. Logan N. A., Vos P. D. *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015, 1–163. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00530.

73. Logan N. A., De Vos P. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015, (174): 1–163. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00530.

74. Incorporating Soil Microbes in Climate Change Models. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.the-scientist.com/news-opinion/incorporating-soil-microbes-in-climate-change-models-36807>.

75. ESTIMATION OF REDUCING SUGARS [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.studocu.com/in/document/vellore-institute-of-technology/biochemistryembedded-lab/dns-method-for-glucose-estimationwritten-format/16150462>.

76. Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: PIPEГ, 2001. — 556 с.

77. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму з розділу “Технологія бродильних виробництв“ студ. денної форми навчання напряму підготовки 6.051701 “Харчові технології та інженерія“ / Укл.: А.М. Куц, В.М. Кошова, Р.Г. Кириленко. – К: НУХТ, 2010. – 31 с.

78. Alpha Amylase [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.bestzyme.com/products/alpha-amylase.html>.

79. Методичні вказівки для виконання лабораторних робіт з фармацевтичної хімії призначені для студентів денної та заочної форми навчання, що навчаються за першим (бакалаврським) рівнем освіти, спеціальності 102«Хімія» / Кобернік А.О., Радаєва І.М. - О.: 2019.- 41 с.

80. Wajdi, Thebti & Riahi, Yosra & Gharsalli, Rawand & Belhadj, Omrane. (2016). Screening and characterization of thermo-active enzymes of biotechnological interest produced by thermophilic *Bacillus* isolated from hot springs in Tunisia. *Acta biochimica Polonica*. 63. 10.18388/abp.2016\_1271.

81. Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor protocols*, 2020(4), 102269. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>.

82. Rengasamy, Sathya & Thangaprakasam, Ushadevi. (2018). ISOLATION, SCREENING AND DETERMINATION OF A-AMYLASE ACTIVITY FROM MARINE STREPTOMYCES SPECIES. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 10. 10.22159/ijpps.2018v10i4.24447.

83. Визначення активності ферментів в біологічних середовищах. Одиниці активності ферментів. Ензимопатії. Медична ензимологія : методичний посібник з дисципліни «Біологічна хімія» для викладачів / К. В. Александрова, О. С. Шкода, Д. А. Васильєв [та ін.]. – Запоріжжя : [ЗДМУ], 2015. – 45 с.

84. Анаеробний біореактор для очищення стічних вод: пат. 64416 Україна: С02F 3/34 (2006.01), С02F 3/28 (2006.01). № u201103743; заявл. 28.03.2011; опубл. 10.11.2011, Бюл. № 21. 3 с.

85. Пристрій для очищення та регенерації повітря: пат. 116967 Україна: A61L 9/22 (2006.01), B01D 46/00, A61L 101/00 (2006.01). № у 2016 13382; заявл. 26.12.2016; опубл. 12.06.2017, Бюл. № 11. 6 с.