

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

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

**«До захисту в ЕК»**

**«До захисту допущено»**

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

Наталія ГРЕГІРЧАК  
(підпис) (прізвище та ініціали)

Віктор СТАБНІКОВ  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«  » лютого 2024 р.

«  » лютого 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: Культивування *Bacillus subtilis* для одержання амілосубтиліну

Виконав: здобувач V курсу, групи 1

КБАЛІ Софія Джаведівна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти  
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Салавор Оксана  
(прізвище та ініціали) (підпис)

Я, як здобувачка Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержувала незгодованої 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 СТАБНИКОВ

“ 30 ” жовтня 2023 року

## ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ІКБАЛ Софії Джаведівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus subtilis* для одержання  
амілосубтиліну керівник роботи РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович, к.т.н.,  
доц.,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023 року № 915-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 29.01.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus subtilis*, цільовий  
продукт: амілосубтилін, геометричний об'єм ферментеру 5 мз, коефіцієнт  
заповнення

0,6.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
зробити характеристику цільового продукту, обґрунтувати вибір  
біологічного агента та охарактеризувати схему біотрансформації ростового  
субстрату, зробити техніко-економічне обґрунтування виробництва  
амілосубтиліну, обґрунтувати допоміжні стадії виробництва, розробити  
апаратурну та технологічні схеми виробництва, скласти специфікацію  
обладнання, описати технологічну схему, розробити заходи із контролю  
виробництва та охорони довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу, апаратурна схема, технологічна  
схема

Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Скласти характеристику цільового продукту	30.10.2023 - 05.11.2023	
2	Обґрунтувати вибір та здійснити характеристику біологічного агента	06.11.2023 - 19.11.2023	
3	Виконати техніко-економічне обґрунтування	20.11.2023 - 03.12.2023	
4	Скласти схему біотрансформації ростового субстрату у біологічного агента	04.12.2023 - 10.12.2023	
5	Обґрунтувати вибір допоміжних стадій виробництва	11.12.2023 - 17.12.2023	
6	Розробити апаратурну схему виробництва	18.12.2023 - 21.12.2023	
7	Розробити технологічну схему виробництва	22.12.2023 - 26.12.2023	
8	Скласти специфікацію обладнання	27.12.2023 - 28.12.2023	
9	Описати технологічну схему	29.12.2023 - 07.01.2024	
10	Здійснити вибір заходів із контролю виробництва	08.01.2024 - 14.01.2024	
11	Здійснити вибір заходів із охорони довкілля	15.01.2024 - 17.01.2024	
12	Оформити кваліфікаційну роботу та всю супровідну документацію згідно вимог	18.01.2024 - 22.01.2024	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Софія ІКБАЛ**  
(ім'я та прізвище)

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

**Юрій РЕЗНІЧЕНКО**  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена проектуванню ділянки виробничого біосинтезу амілосубтиліну з використанням штаму *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. Робота складається зі вступу, дев'яти розділів, графічної частини (технологічної та апаратурної схем), списку використаної літератури з 42 найменувань та додатків. Загальний обсяг роботи – 89 сторінок, 9 рисунків, 14 таблиць, 2 креслення формату А1.

У роботі проведено аналіз потреб у амілолітичних ферментах і, на основі цього, здійснено розрахунок планових потужності виробництва, кількості та технічних характеристик необхідного обладнання, проведено вибір допоміжних стадій виробництва.

Виходячи із проведених розрахунків складено технологічну схему процесу виробництва із зазначенням параметрів, точок контролю та матеріальних потоків. Складено карту постадійного контролю виробництва та охарактеризовано методики контролю. Здійснено вибір заходів із охорони довкілля.

**Ключові слова:** амілосубтилін, *Bacillus subtilis*, ферментний препарат, амілаза, біосинтез, культивування.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	9
1.1. Ферментний препарат амілосубтилін та його активність щодо субстратів..	9
1.2. Стандартизація амілосубтиліну.....	12
1.3. Можливості корисного застосування амілосубтиліну.....	14
2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	18
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	18
2.2. Визначення складу поживного середовища.....	24
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	25
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	27
3. БІОТРАНСФОРМАЦІЯ РОСТОВОГО СУБСТРАТУ У БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	28
4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	30
4.1. Потреба у цільовому продукті.....	30
4.2. Розрахунок потужності виробництва.....	32
4.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і геометричного об'єму ферментера.....	33
4.4. Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу..	34
5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА..	36
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	36
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	38
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	39
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	40
6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	42

7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	45
8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	59
8.1. Карта постадійного контролю виробництва.....	59
8.2. Визначення концентрацій джерел азоту та карбону.....	66
8.3. Мікробіологічний контроль.....	68
8.4. Визначення $\alpha$ -амілазної активності амілосубтиліну.....	68
9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	70
9.1. Актуальність та основні завдання знешкодження відходів на виробництві.....	70
9.2. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	71
9.3. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	73
ВИСНОВКИ.....	76
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	78
ДОДАТКИ.....	83

## ВСТУП

**Актуальність.** Виробництво ферментних препаратів є важливим напрямком біотехнології. Ферментні препарати використовують у харчовому, текстильному, целюлозно-паперовому та шкіряному виробництві, у медичній та хімічній промисловостях. Однією з пріоритетних задач є розробка технології виробництва ферментів, здатних розщеплювати полісахариди, зокрема крохмаль та глікоген. До таких ферментів належать амілази. Їх біосинтез здійснюється з використанням різних штамів мікроорганізмів. Зокрема, амілосубтилін — один із основних ферментних препаратів, що містить  $\alpha$ -амілазу бактеріального походження. Враховуючи, що біосинтез цього ферментного препарату є достатньо дорогим, актуальною задачею є скорочення витрат на його виробництво, а отже і собівартості препарату. Крім того, необхідною є розробка технології біосинтезу, яка дозволила б отримати амілосубтилін з вищою ферментативною активністю, що збільшило б ефективність використання цього препарату.

**Мета роботи.** Вдосконалення технології культивування промислового штаму *Bacillus subtilis* для одержання амілосубтиліну.

**Об'єкт роботи.** Біосинтез амілосубтиліну з використанням бактерій *Bacillus subtilis*.

**Предмет роботи.** Конкретні технологічні аспекти із промислового культивування *Bacillus subtilis* для одержання амілосубтиліну.

**Завдання.** Для досягнення мети були поставлені і виконувались наступні завдання:

- розглянути стан ринку амілолітичних ферментованих препаратів, визначити потребу у виробництві амілосубтиліну;

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробила		Ікбал С. Д.			<i>Культивування <i>Bacillus subtilis</i> для одержання амілосубтиліну</i>	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірила		Резніченко Ю. М.					7	89
Н. Контр.					<i>Кафедра БТМ</i>			
Затвердив		Стабніков В. П.						

- розрахувати річну потужність виробництва;
- розрахувати кількість виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для отримання необхідної кількості продукції;
- розрахувати кількість стадій підготовки посівного матеріалу;
- обґрунтувати необхідні заходи із підготовки виробництва та допоміжні операції;
- здійснити підбір технологічного обладнання та складсти його специфікацію;
- описати постадійну схему технологічного процесу;
- обґрунтувати необхідні заходи контролю виробництва.

**Методи дослідження.** Під час виконання кваліфікаційної роботи були використані наступні методи: аналіз, синтез, порівняння, розрахунковий та проектний методи.

**Новизна та практичне значення.** Результати, отримані у ході виконання кваліфікаційної роботи дозволяють вдосконалити технологію промислового одержання амілосубтиліну. Використання з метою біосинтезу амілосубтиліну високопродуктивного штаму *Bacillus subtilis* KIBGE HAS дозволить підвищити вихід кінцевого продукту, зменшить його собівартість і зробить виробництво більш ефективним. Одержаного обсягу готової продукції буде достатньо для покриття існуючого ринкового попиту на амілолітичні ферментні препарати.

# 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

## 1.1. Ферментний препарат амілосубтилін та його активність щодо субстратів

Амілосубтилін — це ферментний амілолітичний препарат бактеріального походження, що містить  $\alpha$ -амілазу (КФ 3.2.1.1, 1,4- $\alpha$ -глюканглюканогідролаза, глікогенеза). Амілосубтилін є однією із комерційно доступних форм  $\alpha$ -амілази поряд із амілоризином (ферментний препарат грибного походження).

$\alpha$ -Амілаза, що є основним компонентом препарату амілосубтилін, належить до сімейства ендоамілаз, які каталізують початковий гідроліз крохмалю на більш короткі олігосахариди шляхом розщеплення  $\alpha$ -D-(1-4) глікозидних зв'язків. Ані кінцеві залишки глюкози, ані  $\alpha$ -1,6-зв'язки не можуть бути розщеплені  $\alpha$ -амілазою. Кінцевими продуктами дії  $\alpha$ -амілази є олігосахариди різної довжини з  $\alpha$ -конфігурацією та  $\alpha$ -граничні декстрини, які становлять суміш мальтози, мальтотріози та розгалужених олігосахаридів із 6–8 одиниць глюкози, які містять як  $\alpha$ -1,4 і  $\alpha$ -1,6 зв'язки. Інші амілолітичні ферменти беруть участь у процесі розщеплення крохмалю, але внесок  $\alpha$ -амілази є найважливішим для ініціації цього процесу.

Амілаза має тривимірну структуру, здатну зв'язуватися з субстратом і під дією високоспецифічних каталітичних груп сприяти розриву глікозидних зв'язків.  $\alpha$ -Амілаза є класичним кальційвмісним ферментом, характерним для широкого кола тварин, рослин та мікроорганізмів. Білок містить 3 домени: А, В і С. Домен А є найбільшим, представляючи типову бочкоподібну суперструктуру ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. Домен В вставляється між доменами А і С і приєднується до домену А дисульфідним зв'язком. Домен С має  $\beta$ -пластову структуру, пов'язану з доменом А простим поліпептидним ланцюгом і є незалежним доменом із невідомою функцією.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 1. Характеристика цільового продукту</i>	<i>Літ.</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробила</i>	<i>Ікбал С. Д.</i>						9	89
<i>Перевірила</i>	<i>Резніченко Ю. М.</i>							
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затвердив</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							
						<i>Кафедра БТМ</i>		

Активний центр (субстратне зв'язування)  $\alpha$ -амілази розташований у довгій щілині, розташованій між карбоксильним кінцем доменів А і В. Кальцій ( $\text{Ca}^{2+}$ ) розташований між доменами А і В і може діяти в стабілізації тривимірної структури та як алостеричний активатор. Зв'язування аналогів субстрату свідчить про те, що Asp206, Glu230 і Asp297 беруть участь у каталізі. Сайт зв'язування субстрату містить 5 субсайтів з каталітичним сайтом, розташованим на субсайті 3. Субстрат може зв'язуватися з першим залишком глюкози в субсайті 1 або 2, дозволяючи відбутися розщеплення між першим і другим або другим і третім залишками глюкози.

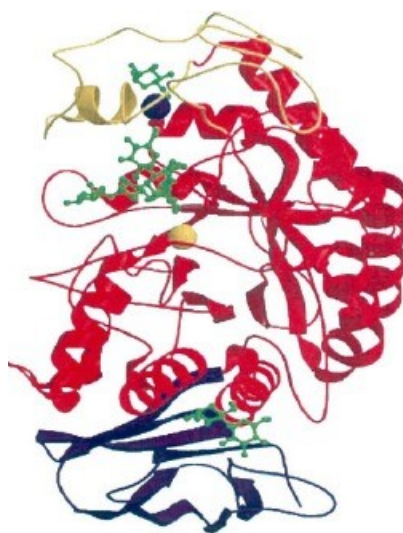


Рис. 1.1. Будова  $\alpha$ -амілази

Домен А показано червоним кольором, домен В — жовтим, а домен С — фіолетовим. У каталітичному центрі іон кальцію показано в блакитній сфері, а іон хлориду в жовтій сфері. Зелені структури зв'язані з активним центром і поверхневими сайтами зв'язування

Крохмаль є важливою складовою харчового раціону людини, і для цієї мети його використовують хімічно та ферментативно для отримання різноманітних продуктів, таких як гідролізати крохмалю, глюкозні сиропи, фруктоза, похідні мальтодекстрину або циклодекстрини, що використовуються в харчовій промисловості. Крім того, отриманий цукор можна ферментувати для отримання етанолу. Незважаючи на велику кількість рослин, здатних виробляти крохмаль, лише деякі рослини важливі для промислової переробки

крохмалю. Основними промисловими джерелами є кукурудза, тапіока, картопля та пшениця, але такі обмеження, як низький опір зсуву, термічний опір, термічне розкладання та висока тенденція до ретроградації, обмежують його використання в деяких промислових харчових цілях. Серед вуглеводних полімерів крохмаль в даний час користується підвищеною увагою через його використання в різних харчових продуктах. Крохмаль значною мірою сприяє структурним властивостям багатьох харчових продуктів і широко використовується в харчових продуктах і промисловому застосуванні як загусник, колоїдний стабілізатор, гелеутворювач, наповнювач і водоутримувач.

Крохмаль — це полімер глюкози, з'єднаний з іншим глікозидним зв'язком. У крохмалі присутні два типи полімерів глюкози: амілоза та амілопектин. Амілоза та амілопектин мають різну структуру та властивості. Амілоза — це лінійний полімер, що складається з до 6000 одиниць глюкози з  $\alpha$ -1,4 глікозидними зв'язками. Амілопектин складається з коротких  $\alpha$ -1,4, з'єднаних з лінійними ланцюгами з 10–60 одиниць глюкози, і  $\alpha$ -1,6, з'єднаних з бічними ланцюгами з 15–45 одиниць глюкози.  $\alpha$ -Амілаза здатна розщеплювати  $\alpha$ -1,4 глікозидні зв'язки, присутні у внутрішній частині ланцюга амілози або амілопектину.

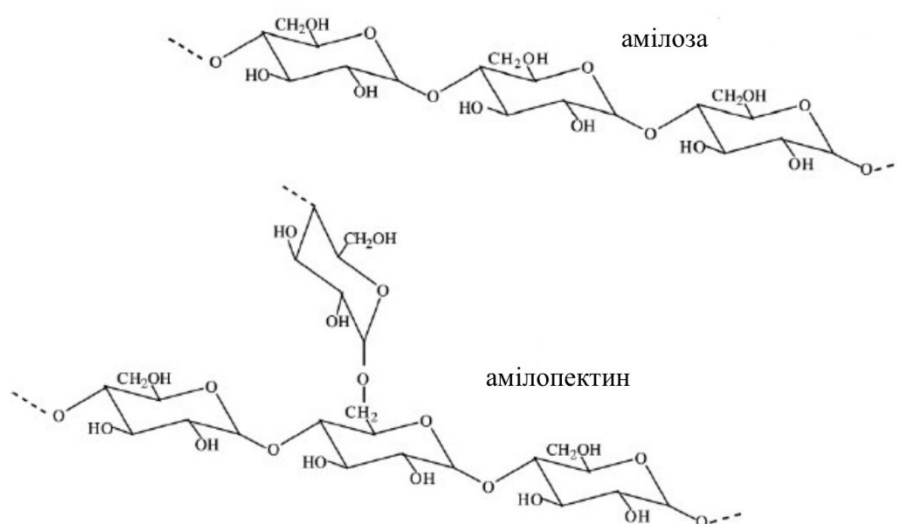


Рис. 1.2. Структура амілози та амілопектину

Крохмаль гідролізується на менші олігосахариди за допомогою  $\alpha$ -амілази, яка є одним із найважливіших комерційних ферментних процесів. Амілази

знаходять застосування в усіх промислових процесах, таких як харчова, миюча, текстильна та паперова промисловість, для гідролізу крохмалю. Сахаридний склад, отриманий після гідролізу крохмалю, сильно залежить від впливу температури, умов гідролізу та походження ферменту. Специфічність, термостабільність і відповідь на рН ферментів є критичними властивостями для промислового використання.

Незважаючи на те, що амілази широко доступні з різних джерел, у минулому увага була зосереджена лише на мікробних амілазах через їх переваги над амілазами рослин і тварин. Мікробним ферментам, як правило, віддають перевагу через їх легшу ізоляцію у великих кількостях, дешеве виробництво за короткий час і стабільність у різних екстремальних умовах. Вироблені мікробами ферменти, які виділяються в середовище, дуже надійні для промислових процесів і застосувань. Крім того, виробництво та експресія рекомбінантних ферментів також легші за допомогою мікробів як клітини-господаря.

## **1.2. Стандартизація амілосубтиліну**

Амілосубтилін (кінцевий продукт) являє собою тонкоподрібнений порошок чи світло-сірого кольору вологістю не більше 13%, добре розчинний у воді без стороннього запаху та смаку.

Залежно від амілолітичної активності амілолітичні препарати розділяють на три групи. Загальні технічні умови до ферментних препаратів зазначені у ДСТУ 4457:2005. Стандартизовані фізико-хімічні показники амілосубтиліну зазначені у табл. 1.1. Визначення органолептичних фізико-хімічних та мікробіологічних показників проводиться за ДСТУ 7899:2015, визначення амілолітичної активності проводиться за ДСТУ 8453:2015.

## Фізико-хімічні показники амілолітичних ферментів (амілосубтиліну)

Найменування показника	Значення			Метод аналізу
	Групи			
	1	2	3	
Зовнішній вигляд	Дрібнозернистий продукт			за ДСТУ 7899:2015
Колір	Світло - сірий чи бежевий			за ДСТУ 7899:2015
Розмір частинок, мм, не більш ніж	5	5	5	за ДСТУ 7899:2015
Масова доля вологи, %, не більш ніж	13	13	13	за ДСТУ 7899:2015
Амілолітична активність (АС), од/г	250±25	200±20	150±15	за ДСТУ 8453:2015
Оцукрююча активність (ОС), од/г, не менш ніж	800	700	600	за ДСТУ 8453:2015
Протеолітична активність (ПС), од/г, не менш ніж	2,3	2,3	2,3	за ДСТУ 8452:2015
Прозорість водної витяжки	Витяжка не повинна бути мутною, допускається опалесценція			за ДСТУ 7899:2015

Пакування готового продукту здійснюється у поліетиленові пакети, місткістю 1 кг за допомогою автоматичної машини для фасування.

Маркування упаковки передбачає позначення:

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

- умови зберігання;
- маса нетто

Транспортне маркування здійснюється за ГОСТ 141-92 з нанесенням маніпуляційного знаку «Оберігати від вологи» і наступних позначень:

- товарний знак, назва підприємства-виробника, його адреса і місце виготовлення;
- назва продукту;
- дата виготовлення;
- номер партії (серії);
- умови зберігання;
- термін придатності;
- кількість пакувальних одиниць
- ферментативна активність;
- маса нетто кожної пакувальної одиниці в г або кг;
- позначення технічних умов.

Транспортування відбувається згідно з ДСТУ 4457:2005 у закритих транспортних засобах згідно до санітарних вимог і правил, що діють для даного виду транспорту.

Зберігання відбувається згідно з ДСТУ 4457:2005 у сухих чистих і добре вентиляованих, захищених від прямих сонячних променів складських приміщеннях при температурі від +2°C до +15°C. Термін придатності – 12 місяців від дати виготовлення.

### **1.3. Можливості корисного застосування амілосубтиліну**

Сфери застосування амілосубтиліну визначаються ферментативною дією  $\alpha$ -амілази (як основного компонента амілосубтиліну), а тому амілосубтилін може використовуватись в усіх напрямках промисловості, де схема виробництва передбачає повне або часткове розщеплення (розрідження) крохмалю.

*Переробка крохмалю.* Найпоширеніші застосування  $\alpha$ -амілази у виробництві крохмалю, яка використовується для гідролізу крохмалю в процесі розрідження крохмалю, який перетворює крохмаль у сиропи фруктози та глюкози. Ферментативне перетворення всього крохмалю включає: желатинізацію, яка включає розчинення гранул крохмалю, утворюючи таким чином в'язку суспензію; розрідження, що включає частковий гідроліз і втрату в'язкості; і оцукрювання, що включає виробництво глюкози та мальтози шляхом подальшого гідролізу. Ферменти з видів *Bacillus* представляють особливий інтерес для великомасштабних біотехнологічних процесів завдяки їхній термостабільності та тому, що для цих ферментів доступні ефективні системи експресії.

*Виробництво мийних засобів.* Промисловість мийних засобів є основними споживачами ферментів як за обсягом, так і за вартістю. Використання ензимів у складі миючих засобів покращує здатність миючих засобів видаляти стійкі плями та робить миючий засіб екологічно безпечним. Амілази є другим типом ферментів, які використовуються у складі ферментативних миючих засобів, і 90% усіх рідких мийних засобів містять ці ферменти. Ці ферменти використовуються в мийних засобах для прання та автоматичного миття посуду для розкладання залишків крохмалистих продуктів, таких як картопля, соуси, заварний крем, шоколад тощо, до декстринів та інших менших олігосахаридів. Амілази мають активність при більш низьких температурах і лужному рН, зберігаючи необхідну стабільність в умовах миючого засобу, а окислювальна стабільність амілаз є одним з найважливіших критеріїв для їх використання в мийних засобах, де середовище для прання є дуже окислювальним. Видалення крохмалю з поверхонь також важливе для забезпечення білизни, оскільки крохмаль може бути атрактантом для багатьох типів твердих ґрунтів.

*Виробництво біоетанолу.* Етанол є найбільш використовуваним рідким біопаливом. Для виробництва етанолу крохмаль є найбільш використовуваним субстратом через його низьку ціну та легкодоступну сировину в більшості регіонів світу. У цьому виробництві крохмаль необхідно розчинити, а потім

піддати двом ферментативним стадіям, щоб отримати ферментовані цукру. Біоконверсія крохмалю в етанол включає зрідження та оцукрювання, де крохмаль перетворюється на цукор за допомогою амілолітичного мікроорганізму або ферментів, таких як  $\alpha$ -амілаза, з подальшим спиртовим бродінням. Серед бактерій на першому етапі гідролізу крохмальних суспензій використовується  $\alpha$ -амілаза, отримана з терморезистентних бактерій, таких як *Bacillus licheniformis*, або з модифікованих штамів *Escherichia coli* або *Bacillus subtilis*.

*Харчова промисловість.* Амілаза широко використовується в харчовій промисловості, такій як випічка, пивоваріння, приготування травних засобів, виробництво тістечок, фруктових соків і крохмальних сиропів.  $\alpha$ -амілаза знайшла широке застосування в хлібопекарській промисловості. Цей фермент можна додавати до хлібного тіста, щоб розкласти крохмаль у борошні на менші декстрини, які згодом ферментують дріжджами. Додавання  $\alpha$ -амілази до тіста призводить до підвищення швидкості бродіння та зменшення в'язкості тіста, що призводить до покращення об'єму та текстури продукту. Крім того, фермент утворює додатковий цукор у тісті, що покращує смак, колір скоринки та властивості підсмажування хліба. Окрім утворення ферментованих сполук,  $\alpha$ -амілази також мають ефект проти черствіння при випічці хліба, і вони покращують збереження м'якості хлібобулочних виробів, збільшуючи термін зберігання цих продуктів. Амілази також використовуються для освітлення пива чи фруктових соків або для попередньої обробки кормів для тварин, щоб покращити засвоюваність клітковини.

*Текстильна промисловість.* Амілаза використовується в текстильній промисловості для процесу дешліфування. Проклеювальні речовини, такі як крохмаль, наносяться на пряжу перед виготовленням тканини, щоб забезпечити швидкий і безпечний процес ткання. Крохмаль має дуже привабливий розмір, тому що він дешевий, легко доступний у більшості регіонів світу, і його можна досить легко видалити. Крохмаль пізніше видаляється з тканини мокрим способом у текстильно-оздоблювальній промисловості. Дешліфування

передбачає видалення крохмалю з тканини, який служить зміцнювальним агентом для запобігання розриву нитки основи під час процесу ткацтва.  $\alpha$ -амілази вибірково видаляють розмір і не атакують волокна. Амілаза з бактерій *Bacillus* використовуються в текстильній промисловості.

*Паперова промисловість.* Використання  $\alpha$ -амілази у целюлозно-паперовій промисловості призначене для модифікації крохмалю крейдованого паперу, тобто для виробництва крохмалю з низькою в'язкістю та високою молекулярною масою. Обробка покриття служить для того, щоб зробити поверхню паперу достатньо гладкою та міцною, щоб покращити якість письма паперу. У цьому застосуванні в'язкість природного крохмалю є занадто високою для проклеювання паперу, і це можна змінити частковим розкладанням полімеру за допомогою  $\alpha$ -амілаз у періодичному або безперервному процесі. Крохмаль є хорошим проклеювальним агентом для фінішної обробки паперу, покращуючи якість і здатність до стирання, крім того, він є гарним покриттям для паперу.

## 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Мікробні амілази, отримані з бактерій, грибів і дріжджів, використовуються переважно в промислових секторах і наукових дослідженнях. Рівень виробництва амілази варіюється від одного мікроорганізма до іншого, навіть серед одного роду, виду та штаму. Крім того, рівень виробництва амілази також відрізняється залежно від походження мікроба, де штами, виділені з середовища, багатого крохмалем або амілозою, природним чином виробляють більшу кількість ферменту. Такі фактори, як рН, температура та джерела вуглецю та азоту, також відіграють важливу роль у швидкості виробництва амілази, особливо в процесах бродіння. Оскільки мікроорганізми піддаються генній інженерії, штами можна вдосконалити для отримання вищого виходу амілази. Мікроорганізми також можуть бути налаштовані для виробництва ефективних амілаз, які є термостабільними та стабільними в суворих умовах. Такі покращення можуть також зменшити забруднення фоновими білками та мінімізувати час реакції та призвести до менших витрат енергії в амілазній реакції. Відбір галофільних штамів також є корисним для виробництва амілази в екстремальних умовах.

Серед широкого спектру видів мікроорганізмів, які виділяють амілазу, її виробництво з бактерій є дешевшим і швидшим, ніж з інших мікроорганізмів. Для секреції амілази було виділено широкий спектр видів бактерій.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</i>					
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>					
<i>Розробила</i>	<i>Ікбал С. Д.</i>							<i>Літ.</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірила</i>	<i>Резніченко Ю. М.</i>								18	89
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затвердив</i>	<i>Стабніков В.П.</i>									

Більшість із них є видами *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. vulgaris*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. halodurans* та *Bacillus sp. Ferdowsicus*), але також виділено амілази з *Rhodothermus marinus*, *Corynebacterium gigantea*, *Chromohalobacter sp.*, *Caldimonas taiwanensis*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus manihotivorans* і *Pseudomonas stutzeri*. Галофільні штами, які продукують амілази, включають *Haloarcula hispanica*, *Halobacillus sp.*, *Chromohalobacter sp.*, *Bacillus dipsosauri* та *Halomonas meridiana*. Більше досліджень із виділення та вдосконалення нових штамів прокладуть шлях до створення важливих штамів.

Термостабільність є бажаною характеристикою більшості промислових ферментів. Термостабільні ферменти, виділені з термофільних організмів, знайшли ряд комерційних застосувань завдяки своїй стабільності. Оскільки ферментативне розрідження та оцукрювання крохмалю здійснюються при високих температурах (100–110 °C), термостабільні амілолітичні ферменти в даний час досліджуються для покращення промислових процесів розкладання крохмалю та представляють великий інтерес для виробництва цінних продуктів, таких як глюкоза, кристалічна декстроза, сироп декстрази, мальтоза та мальтодекстрини. Наприклад, штам *Bacillus subtilis* JS-2004 культивували в рідкому середовищі, що містить відходи картопляного крохмалю, для отримання  $\alpha$ -амілази. Було вивчено вплив добавки кальцію, дріжджового екстракту та глюкози до продуктивного середовища на ріст бактерій і продукцію ферментів. Максимальна продукція ферменту 72 Од/мл була досягнута після 48 годин культивування при рН 7,0 і 50 °C [5].

Штам *Bacillus subtilis* КСС103 з дерепресією катаболіту був використаний для отримання  $\alpha$ -амілази в середовищі, що містить гідролізат цукрової тростини (ГЦТ) [6]. Продукція  $\alpha$ -амілази в середовищі ГЦТ була збільшена до 144,5 Од/мл за методологією поверхні відповіді, де рівні СВН та інших компонентів середовища змінювалися (ГЦТ). Модифіковане середовище

складалося з ГЦТ (24 г/л); пептону (17,43 г/л); дріжджового екстракту (1,32 г/л) і м'ясного екстракту яловичини (1,82 г/л) [6].

Культивування *Bacillus subtilis* KIBGE HAS дозволило отримати  $\alpha$ -амілазу з надзвичайно високою активністю 1773 Од/мл при культивуванні на середовищі з крохмалю, дріжджового екстракту, пептону та мінеральних солей [7].

Інший штам *Bacillus subtilis* B2 методом глибинного культивування при освітленні синіми діодними (LED) лампами продукував  $\alpha$ -амілазу з активністю 310,56 Од/л при використанні середовища з крохмалю, дріжджового екстракту та мінеральних солей [8].

Таким чином, використовуючи різні штами *B. subtilis* можна досягнути різної продукції за  $\alpha$ -амілазою. Порівняльна характеристика штамів, поживних середовищ та умов культивування наведена у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

**Особливості поживних середовищ для одержання  $\alpha$ -амілази різними штамми *B. subtilis***

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Активність амілази, Од/мл	Особливості процесу біосинтезу	Джерело
	Компонент	Концентрація г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus subtilis</i> JS-2004	Крохмаль	10	48	72	рН 7.0 t=50 °C глибинне культивування	[5]
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0				
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5				
	NaCl	1,0				
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0				
	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,05				
	CaCl <sub>2</sub>	0,05				
	Триптон	2,0				

## Продовження табл. 2.1

<i>Bacillus subtilis</i> KCC103	Гідролізат цукрової тростини	24	36	144,5	рН=6,5 t=37 °С глибинне культивування	[6]
	Пептон	17,43				
	Дріжджовий екстракт	1,32				
	М'ясний екстракт	1,82				
<i>Bacillus subtilis</i> KIBGE HAS	Крохмаль	20,0	24	1773	рН=7 t=35°С глибинне культивування	[7]
	Пептон	10,0				
	Дріжджовий екстракт	4,0				
	NaCl	0,5				
	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,5				
	CaCl <sub>2</sub>	0,2				
<i>Bacillus subtilis</i> B2	Крохмаль	5	48	310,56	рН=7 t=37°С глибинне культивування, синє діодне освітлення	[8]
	Дріжджовий екстракт	5				
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5				
	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,1				
	CaCl <sub>2</sub>	5				

Вибір того чи іншого штаму продуцента не є очевидним. Певні штами використовують простіші за складом поживні середовища, інші за рахунок використання складніших багатокomпонентних середовищ продукують α-амілазу з вищою активністю. Тому проведемо економічні розрахунки вартості одного літру поживних середовищ (табл. 2.2).

## Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів

Біологічний агент	Компонент ПС	Концентрація компоненту в ПС, г/л	Ціна компоненту грн/кг	Вартість компоненту на 1 л ПС	Джерело
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus subtilis</i> JS-2004	Крохмаль	10	51	0,510	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	96	0,096	1
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5	450	1,125	1
	NaCl	1,0	15	0,015	1
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0	35	0,070	1
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05	24	0,001	1
	CaCl <sub>2</sub>	0,05	62	0,003	4
	Триптон	2,0	7000	14,000	2
	Вартість літра поживного середовища				15,82
<i>Bacillus subtilis</i> KCC103	Гідролізат цукрової тростини	24	120	2,88	2
	Пептон	17,43	1600	27,89	3
	Дріжджовий екстракт	1,32	1100	1,45	3
	М'ясний екстракт	1,82	7000	12,74	3
	Вартість літра поживного середовища				44,96
<i>Bacillus subtilis</i> KIBGE HAS	Крохмаль	20,0	51	1,02	1
	Пептон	10,0	1600	16,00	3
	Дріжджовий екстракт	4,0	1100	4,40	3
	NaCl	0,5	15	0,01	1
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	24	0,01	1
	CaCl <sub>2</sub>	0,2	62	0,01	4
	Вартість літра поживного середовища				21,45

Продовження табл. 2.2

<i>Bacillus subtilis</i> B2	Крохмаль	5	51	0,26	1
	Дріжджовий екстракт	5	1100	5,50	3
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	96	0,05	1
	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,1	24	0,00	1
	CaCl <sub>2</sub>	5	62	0,31	4
	Вартість літра поживного середовища				6,12

**Примітка:** 1 — <http://prom.ua>, 2 — <https://ua.all.biz/uk/>, 3 — <http://agar.com.ua>, 4 — <https://chemtest.com.ua/>

На основі розрахунків можна переконатися, що вартість поживного середовища є більшою у тих випадках, коли у його складі присутні більш дорогі компоненти (дріжджовий екстракт, пептон, м'ясний екстракт). Найдешевшим є середовище культивування для терmostійкого штаму *Bacillus subtilis* B2, яке складається із крохмалю та дріжджового екстракту із додаванням мінеральних солей. Щоб остаточно зробити вибір на користь того чи іншого штаму необхідно також розрахувати, яка ціна припадає на одиницю активності  $\alpha$ -амілази, яка продукується (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

**Умовна вартість за 1 Од/мл  $\alpha$ -амілази, синтезованої різними штамми продуцентів**

Біологічний агент	Активність амілази, Од/мл	Вартість 1 л ПС	Умовна вартість за 1 Од/мл $\alpha$ -амілази (значення *1000)
1	2	5	6
<i>Bacillus subtilis</i> JS-2004	72	15,82	0,2197
<i>Bacillus subtilis</i> KCC103	144,5	44,96	0,3111
<i>Bacillus subtilis</i> KIBGE HAS	1773	21,45	0,0121
<i>Bacillus subtilis</i> B2	310,56	6,11	0,0197

Результати розрахунків вказують, що найменшою є умовна вартість за Од/мл  $\alpha$ -амілази отриманий шляхом біосинтезу із штаму *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, зважаючи на надзвичайно високу активність продукованого ферменту. Таким чином, обґрунтованим є використання штаму *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, оскільки на середньому за вартістю і збалансованому за вістом компонентів поживному середовищі досягається продукція високоякісної  $\alpha$ -амілази з активністю 1773 Од/мл. Отже, собівартість такого виробництва є найнижчим.

Таким чином, було здійснено обґрунтування вибору продуцента та умов культивування. У якості біологічного агента було обрано штам *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, що відзначається продукцією  $\alpha$ -амілази з надзвичайно високою активністю.

## 2.2. Визначення складу поживного середовища

Вибір складу поживного середовища обумовлений літературними даними, щодо культивування *Bacillus subtilis* KIBGE HAS за яких досягається надпродукція  $\alpha$ -амілази.

Таблиця 2.4

### Склад поживного середовища

№ з/п	Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л
1	Крохмаль	20,0
2	Пептон	10,0
3	Дріжджовий екстракт	4,0
4	NaCl	0,5
5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
6	CaCl <sub>2</sub>	0,2

У наведеному поживному середовищі крохмаль є основним джерелом карбону та забезпечує енергетичний обмін, пептон та дріжджовий екстракт є

джерелами азоту для пластичного обміну, також присутні три мінеральні солі (натрій хлорид, магній сульфат та кальцій хлорид).

### 2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

*Bacillus subtilis* KIBGE HAS — грампозитивна, каталазопозитивна бактерія. Клітини мають паличкоподібну форму, довжину близько 4–10 мікрометрів (мкм) і діаметр 0,25–1,0 мкм, об'єм клітини близько  $4,6 \cdot 10^{-15}$  л у стаціонарній фазі. Бактерії мають жорсткі клітинні стінки, що складаються з товстого пептидоглікану, який допомагає підтримувати стрижневу форму клітини і може витримувати високий внутрішньоклітинний тиск. *B. subtilis* має багато перитрихіально розташованих джгутиків, що забезпечує здатність швидко рухатися в рідині [7, 9].

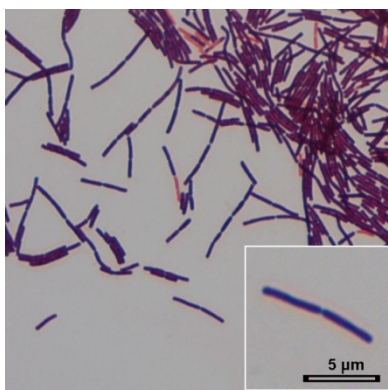


Рис. 2.1. Мікроскопія клітин *B. subtilis*

*Bacillus subtilis* KIBGE HAS може утворювати центральні ендоспори, зеленуватого кольору і не були опуклими із закругленими кінцями, які переносять екстремальних умовах навколишнього середовища (температура та висихання) [7, 9].

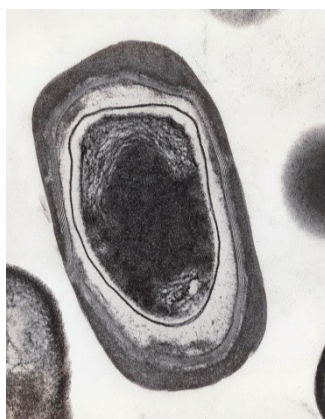


Рис. 2.2. Ендоспори *B. subtilis*

Бактерії утворюють колонія ризоїдної форми непрозорого білого або блідо-жовтого кольору [10].

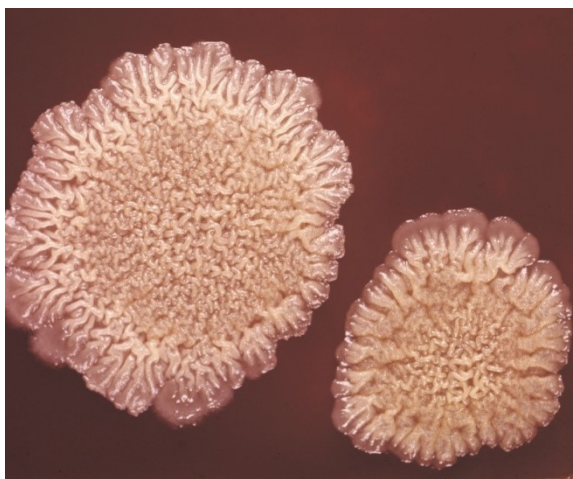


Рис. 2.3. Зовнішній вигляд колоній *B. subtilis*

*Bacillus subtilis* KIBGE HAS є факультативним анаеробом. За типом живлення — хемоорганогетеротроф. Культури *Bacillus subtilis* KIBGE HAS характеризуються позитивністю за реакцією Фогеса Проскауера за розвитком рожевого забарвлення через 2–3 хв. Штам є каталазопозитивним на поживному агарі. Жовте забарвлення в тесті метилового червоного вказувало на негативну реакцію і індол не утворювався. Тести на ферментацію глюкози та маніту дали позитивний результат за зміною кольору з червоного на жовтий для утворення кислоти та відсутності газу. Рівень рН для росту становив 7,0, а оптимальна температура для росту була 50 °С. Штам *Bacillus subtilis* KIBGE HAS володів здатністю продукувати  $\alpha$ -амілазу та гідролізувати крохмаль [7].

Бактерії *B. subtilis* мають високу чутливість до цефалексину (цефалоспоринів) та енрофлоксацину (фторхінолонів), а також стійкість до оксациліну (пеніцилінів) [11].

#### **2.4. Таксономічний статус біологічного агента**

Сучасна класифікація ґрунтується на філогенетичному аналізі. Таксономічний статус *B. subtilis* з урахуванням аналізу даних баз ITIS (Integrative taxonomic information system) [12] та GBIF (Global Biodiversity Information Facility) [13]:

Царство – *Bacteria*

Підцарство — *Posibacteria*

Філа — *Firmicutes*

Клас – *Bacilli*

Порядок – *Bacillales*

Родина – *Bacillaceae*

Рід – *Bacillus*

Вид – *Bacillus subtilis*

Штам – *Bacillus subtilis* KIBGE HAS

### 3. БІОТРАНСФОРМАЦІЯ РОСТОВОГО СУБСТРАТУ У БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

*B. subtilis* віддають перевагу вуглеводам та аміаку як джерела вуглецю та азоту відповідно. Переважним джерелом вуглецю та енергії є глюкоза. Цей цукор поглинається і одночасно фосфорилується бактеріальною системою фосфоенолпіруват:цукрова фосфотрансфераза. Подальший метаболізм включає гліколіз, пентозофосфатний шлях і цикл Кребса, що призводить до окислення глюкози до вуглекислого газу та утворення АТФ та проміжних продуктів для всіх анаболічних реакцій. Аналогічно, інші вуглеводи та поліоли можуть бути фосфорилізовані та катаболізуються подібним чином. Використання органічних кислот вимагає перетворення цих кислот у проміжні продукти циклу Кребса, глюконеогенезу та пентозофосфатного шляху. Центральним проміжним продуктом метаболізму азоту є глутамат, універсальний донор аміногруп для біосинтезу амінокислот, нуклеотидів та всіх інших азотовмісних сполук у клітинах [14]. Схема біотрансформацію ростового субстрату визначена на основі даних Kegg Pathway Maps [15] та представлена на рис. 3.1.

Перелік найбільш важливих ферментів задіяних у катаболізмі ростового субстрату: КФ.2.7.1.199 — протеїн-Npi-фосфогістидин-D-глюкоза фосфотрансфераза — ензим II фосфоенолпіруват:цукрової фосфотрансферази; КФ.5.3.1.9 — глюкозо-6-фосфатізомераза; КФ.5.4.2.2 — фосфоглюкомутаза; КФ.2.7.1.11 — 6-фосфофруктокіназа; КФ.4.1.2.13 — фруктоза-1,6-дифосфатальдолаза; КФ.5.3.1.1 — тріозофосфатізомераза; КФ.1.2.1.12 — гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа; КФ.2.7.2.3 — фосфогліцераткіназа; КФ.5.4.2.12 — фосфогліцераткіназа; КФ.4.2.1.11 — енолаза; КФ.2.7.1.40 — піруваткіназа; КФ.1.2.4.1 — піруватдегідрогеназа; КФ.2.3.1.12 — дигідроліпоїлтрансацилаза; КФ.1.8.1.4 — дигідроліпоїлдегідрогеназа;

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробила</i>	<i>Ікбал С. Д.</i>				<i>Розділ 3. Біотрансформація ростового субстрату у біологічного агента</i>		
<i>Перевірила</i>	<i>Резніченко Ю. М.</i>						
<i>Н. Контр.</i>					<i>Літ.</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Затвердив</i>	<i>Стабніков В.П.</i>					28	89
					<i>Кафедра БТМ</i>		

фосфоенолпіруваткарбоксікіназа.

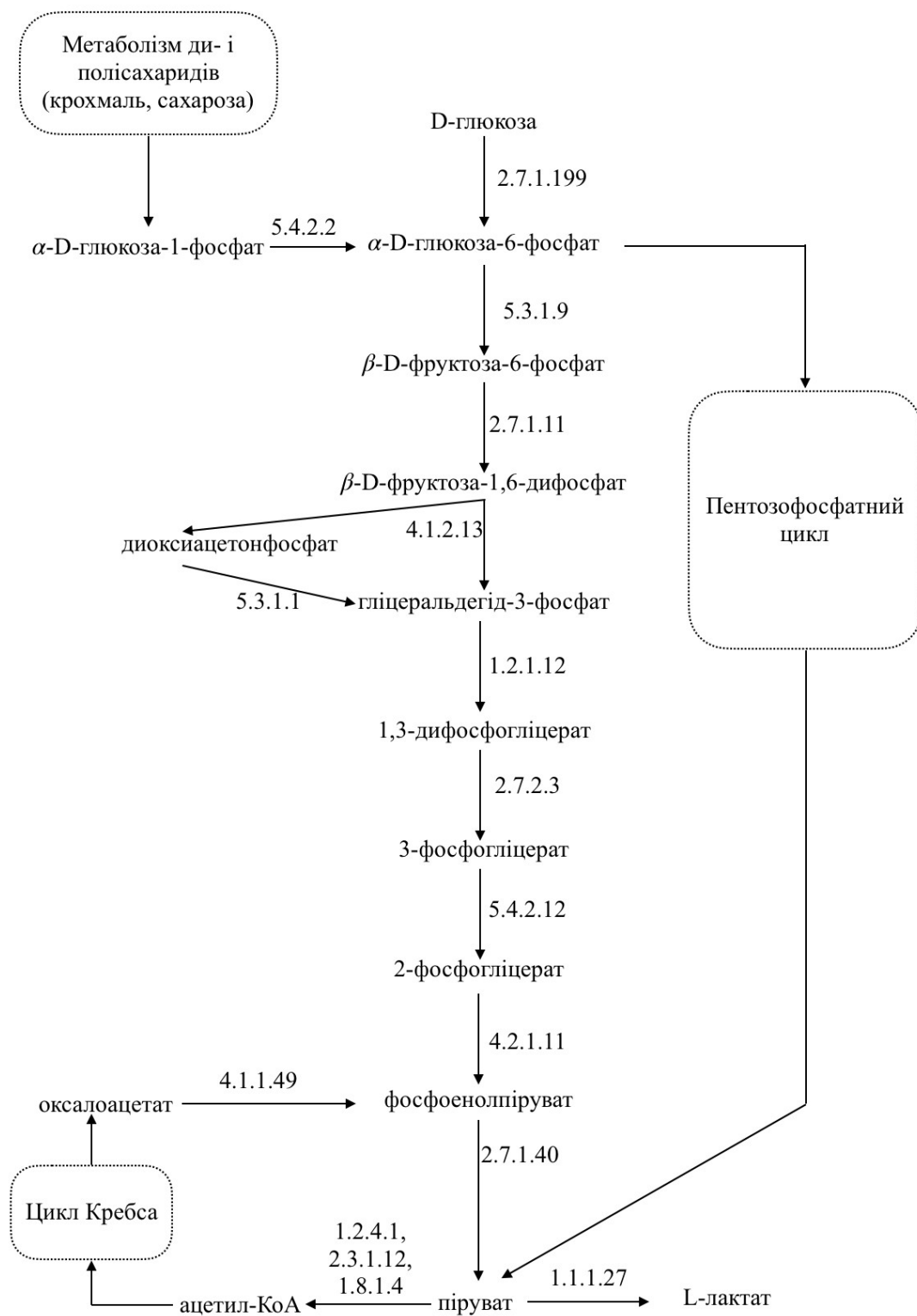


Рис. 3.1. Катаболічні шляхи у *B.subtilis* [15]

## 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### 4.1. Потреба у цільовому продукті

Основне застосування ферменту амілосубтиліну полягає у гідролізі крохмалю з одержанням гідролізованого крохмалю як продукту. Гідролізований крохмаль використовується як інгредієнт для виробництва у багатьох галузях промисловості, включаючи харчову, паперову, фармацевтичну тощо. Фізико-хімічно гідролізований крохмаль надає текстури та об'єму, а також діє як зволожувач, утримуючи вологу [16].

Світовий ринок гідролізованих крохмалів розвивається, створюючи численні можливості галузі гідролізованих крохмалів. Гідролізовані крохмалі використовуються як наповнювач у різних фармацевтичних цілях, включаючи сиропи, таблетки та інші продукти. Зростання використання гідролізованих крохмалів у фармацевтичній промисловості створило можливості для інвестицій у фармацевтичну промисловість для різних компаній [17].

Оскільки у різних продуктах харчування та напоях використовується все більше гідролізованих крохмалів, очікується, що протягом наступного періоду попит на гідролізовані крохмалі зросте. Одним з основних драйверів ринку гідролізованих крохмалів є зростання попиту з боку хлібопекарської та кондитерської промисловості. Гідролізовані крохмалі все частіше використовуються у виробництві морозива, джемів, спредів, жувальних гумок та випічки.

Очікується, що зростання попиту на готові до вживання продукти харчування сприятиме розвитку ринку картопляного крохмалю. Готові до вживання продукти стійкі при зберіганні та не вимагають охолодження, щоб залишатися вільними від бактерій, що спрощує їх зберігання та використання за потреби.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</i>					
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 4. Техніко- економічне обґрунтування</i>					
<i>Розробила</i>	<i>Ікбал С. Д.</i>							<i>Літ.</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірила</i>	<i>Резніченко Ю. М.</i>								30	88
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затвердив</i>	<i>Стабніков В. П.</i>									

Картопляний крохмаль зазвичай використовується в консервованих супах і сумішах через його здатність до загущення. Він також використовується як основа для желуючих агентів у кондитерських виробках, загусників у начинках для випічки та пирогів, а також у пудингах швидкого приготування [18, 19].

Світовий ринок споживання крохмалю становить 92 млн т щорічно, при цьому більша частина використовується саме як модифікований або гідролізований крохмаль. За прогнозами, світовий ринок гідролізованих крохмалів досягне 18,28 млрд доларів США до 2029 року із відмітки у 12,4 млрд доларів США в 2020 році при середньорічному темпі росту 5,66% з 2022 до 2029 року [18].



Рис. 4.1. Прогнозований ринок гідролізованого крохмалю на 2022–2029 (за даними Exactitude Consultancy [18])

Відповідно виробництво ферментативного препарату амілосубтиліну, споживання якого тісно пов'язано із розвитком ринку крохмалю має чітку перспективи у період часу. Очікується, що ринок ферментних препаратів на основі альфа-амілази зросте приблизно на 3,40% у період з 2021 по 2028 рік і досягне 377,01 млн доларів США до 2028 року [20].

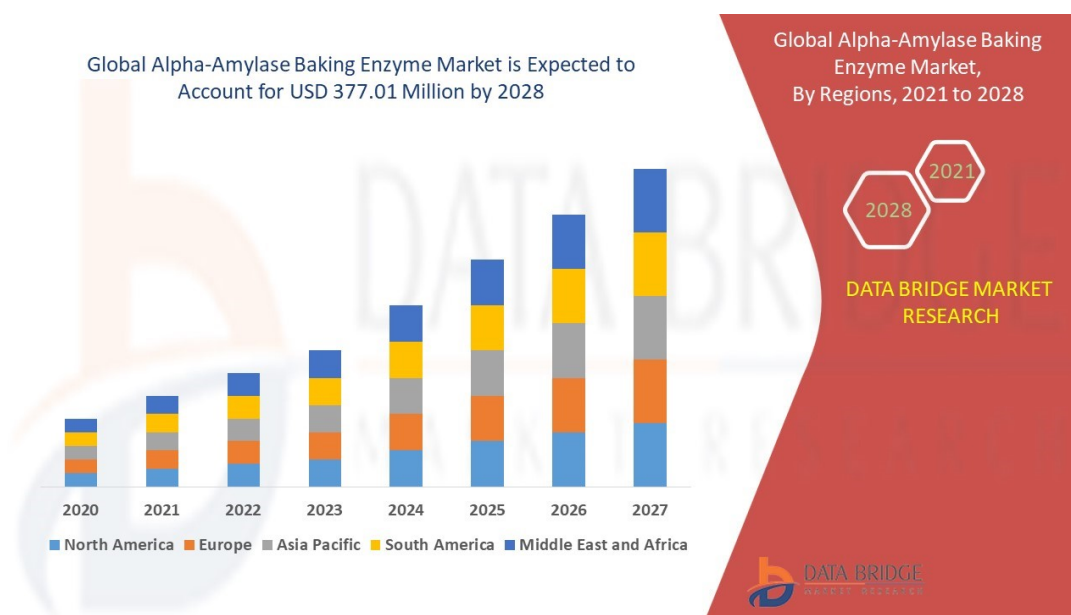


Рис. 4.2. Прогнозований ринок альфа-амілази на 2021–2023 (за даними Data Bridge Market Research [20])

Вважається, що крім попиту на гідролізований крохмаль, на розвиток ринку ферментів з альфа-амілази впливатиме також зростаюча популярність ферменту альфа-амілази в хімічній промисловості, оскільки він використовується як каталізатор у виробництві біопалива та миючих засобів для підвищення виходу продукту та скорочення часу виготовлення. Зростання попиту на фермент у харчовій промисловості (хлібобулочні, кондитерські виробі, пивоваріння), кормів для тварин і лабораторних досліджень сприяє зростанню ринку альфа-амілази. Крім того, збільшення витрат на продукти харчування, зміни в уподобаннях споживачів і поширення фаст-фуду [20-23].

#### 4.2. Розрахунок потужності виробництва

Враховуючи, що дані про обсяги використання ферментних препаратів на основі альфа-амілази у світі та Україні залишаються недоступними, проведемо розрахунок у потенційній потребі у амілосубтиліні базуючись на даних про споживання крохмалю, оскільки гідроліз крохмалю є одним із основних напрямків використання цього ферментного препарату.

Річне виробництво крохмалю в Європі до 2030 року можна очікувати в обсязі до 20 млн т, при цьому крохмаль різними галузями промисловості

використовується здебільшого у гідролізованому або модифікованому вигляді, зокрема на гідролізований крохмаль припадає 49 % від усього спожитого крохмалю [23]. Відповідно очікуваний обсяг крохмалю, який може бути підданий ферментації з використанням амілосубтиліну становить:

$$\frac{20 \times 49}{100} = 9,8 \text{ млн т}$$

Враховуючи конкуренцію приймемо цільову частку ринку як 10 %. Відповідно обсяг крохмалю, що буде піддаватися гідролізу з використанням ферментного препарату:

$$9,8 \cdot 0,1 = 0,98 \text{ млн т} = 980 \text{ тис т}$$

Проведемо розрахунок потреб у амілосубтиліні та здійснимо вибір об'єму ферментера для виробництва.

Обраний штам *Bacillus subtilis* KIBGE HAS здійснює ферментацію з виходом альфа-амілази 1773 Од/мл культурального середовища. Витрати ферменту на гідроліз крохмалю в середньому становлять 1 Од/г [7].

Сумарні втрати на виробництві приймемо як 30 %.

Таким чином, можемо знайти необхідний об'єм культурального середовища:

$$V_{\text{культ}} = \frac{980 \times 10^3 \times 10^6}{(1-0,3) \times 1773 \times 1 \times 10^6} = 789,6 \text{ м}^3 / \text{рік}$$

#### **4.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і геометричного об'єму ферментера**

Враховуючи необхідність проведення технічних робіт на підприємстві (до 30 днів на рік), приймемо ефективний робочий час рівним 335 днів на рік.

Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{ц}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 24 + 6,5 = 30,5 \text{ (год)},$$

де  $T_{\text{ф}}$  – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{\text{др}}$  – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів (0,5 год),

стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (0,5 год).

Кількість циклів на рік :

$$N = \frac{335 \times 24}{30,5} = 263$$

Необхідний об'єм культуральної рідини на цикл становить:

$$V_{ц} = \frac{V_{культ}}{N} = \frac{789,6}{263} = 3,002 \text{ м}^3$$

Прийнявши коефіцієнт заповнення ферментера рівним 0,6, розрахуємо об'єм ферментера:

$$V = \frac{V_{ц}}{K} = \frac{3,002}{0,6} \approx 5,0 \text{ м}^3$$

Приймаємо стандартний об'єм ферментера  $5 \text{ м}^3$ .

#### **4.4. Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу**

Враховуючи, що геометричний об'єм ферментера становить  $5 \text{ м}^3$ , коефіцієнт заповнення становить 0,6, а кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища (робочого об'єму ферментера), проведемо розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу:

Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{роб} = 5,0 \cdot 0,6 = 3 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання  $3 \text{ м}^3$  культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб.1} = 3 \cdot 0,1 = 0,3 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у посівному апараті об'ємом  $0,5 \text{ м}^3$  (500 л) з коефіцієнтом заповнення 0,6.

$0,3 \text{ м}^3$  (300 л) культуральної рідини можна одержати з використанням:

$$V_{\text{роб.2}} = 300 \cdot 0,1 = 30 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом 50 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для одержання 30 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.3}} = 30 \cdot 0,1 = 3 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість посівного одержують культивуванням бактерій в інокуляторі об'ємом 5 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для одержання 3 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.4}} = 3 \cdot 0,1 = 0,3 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість посівного одержують культивуванням бактерій у колбах на качалці.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде відбуватися у чотири етапи. Перший етап здійснюватиметься у колбах на качалці, другий та третій — в інокуляторах різного об'єму, четвертий — в посівному апараті.

## 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

### 5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Вибір способу культивування обумовлюється специфічними особливостями біологічного продуцента, який використовується у виробництві. Оскільки до цього було обґрунтовано використання штам бактерії *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, що забезпечує біосинтез  $\alpha$ -амілазу з активністю 1773 Од/мл шляхом глибинного культивування, то конструкція ферментера має підходити для такого типу ферментації.

Аналіз літературних джерел показує [7, 24-25], що різні штами *Bacillus subtilis*, у разі використання крохмалю в якості основного компонента поживного середовища, мають найкращі показники продукції  $\alpha$ -амілази за наступних умов:

- культивування протягом до двох діб (24-48 год);
- рН стерилізованого середовища 7,0
- температура культивування 37 °С або 50 °С;
- швидкості перемішування та аерації 150 об/хв

В той же час, повідомляється, що аерацію можна припинити після 12 год культивування подача повітря на аерацію може бути припинена, оскільки культура переходить на стаціонарну фазу.

Враховуючи дані, щодо умов культивування, за яких була досягнута надпродукція  $\alpha$ -амілази штамом *Bacillus subtilis* KIBGE HAS приймемо наступні параметри: час - 24 год; рН - 7,0; температура - 50 °С, аерація - протягом перших 12 год; перемішування - постійне. Спосіб – глибинне періодичне культивування.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</i>					
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва					
Розробила		Ікбал С. Д.						Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірила		Резніченко Ю. М.							36	89
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затвердив		Стабніков В. П.								

Виходячи із обґрунтованого способу культивування та необхідного геометричного об'єму ферментера у 5 м<sup>3</sup>, оберемо промислову модель, яка б відповідала вище переліченим вимогам.

Оберемо ферментер виробництва Solaris I-серії на 5000 л, що відповідає всім вимогам [26].



Рис. 5.1. Ферментер Solaris I-серії об'ємом 5000 л [26]

Даний ферментер забезпечує ефективне перемішування біомаси, контроль дозування (масової витрати) поживних речовин, контроль рН тощо.

Контролери термічної масової витрати дозволяють точно контролювати швидкість потоку газів. До 5 контролерів можна налаштувати в кожному пристрої та інтегрувати в програмне забезпечення керування. Це забезпечує гнучкі варіанти аерації для широкого спектру застосувань.

Різні конфігурації мішалки є ключовими для кожного процесу. Даний ферментер може бути обладнаний системою мішалки Раштона, або ж мішалкою осьового типу.

Програмне забезпечення та платформа керування на ферментері дозволяють точно регулювати всі необхідні параметри для керування подачею газу, забезпечуючи оптимальний розвиток культури.

## 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Оскільки передбачений метод культивування передбачає аерацію ферментера, то необхідно розробити заходи, які б забезпечували очищення повітря, що спрямовується на аерацію. Забруднене повітря становить значну небезпеку для процесу біосинтезу, тому процес підготовки очищеного аераційного повітря має бути багатоступеневим, що спрямовано на усунення забруднень і досягнення високого ступеня чистоти повітря.

Спочатку атмосферне повітря забирається з навколишнього середовища через вертикальну трубу, розташовану на оптимальній висоті, мінімізуючи потенційні забруднення. Початкові фільтри грубого очищення, що встановлені у трубі допомагають усунути великі частинки, досягаючи на цьому етапі рівня чистоти 90%. З цією метою пропонується використовувати фільтри панельного типу класу G4 (EU4) виробництва Alter Air (Україна) [27].

Повітря потім проходить через компресор де піддається стисненню з подальшим охолодженням до точки роси, в результаті чого волога та мастильні матеріали конденсуються та видаляються з повітря.

На наступному етапі повітря проходить очищення через фільтри типу HEPA. Дані фільтри являють собою гофрований фільтрувальний папір на основі ультра та мікротонкого скловолокна. У фільтруючому матеріалі використовуються скляні волокна діаметром 0,25... 1,0 мкм, що дозволяє забезпечувати очистку повітря до рівня 99,99 %

Щоб забезпечити постійну ефективність фільтри можуть також бути оснащені манометрами для контролю різниці тиску. На підприємстві доцільно складати графіки регулярної заміни фільтрів, щоб запобігти таким проблемам, як розвиток небажаних мікроорганізмів. Такий підхід зменшує ризик зараження, зберігаючи відсутність сторонньої мікробіоти у культуральній рідині та оптимізуючи виробничий процес.

### 5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Вибір мийних та дезінфікуючих засобів обумовлюється джерелами забруднень, які передбачається видаляти та поверхнею, яку передбачається обробляти цим засобом. Виходячи із цього необхідно обрати окремі засоби для миття приміщення та поверхонь обладнання.

Метою чищення обладнання є видалення забруднюючих речовин, що часто може бути здійснено шляхом їх нейтралізації. Для видалення лужних забруднень, необхідний вибір засобу для чищення з кислим рН. При очищенні поверхонь із кислотними забрудненнями слід вибирати продукти з лужним рН. Таким чином, для максимально повного видалення забруднюючих речовин необхідна комбінація із двох засобів із різним рН.

Для видалення кислотних забруднювачів із поверхонь обладнання (зокрема ферментера) можна використовувати засіб «Бланідас-ОПЦ Термо» [28]. Це Високоєфективний лужний миючий засіб, який може також видаляти сильні карбонові відкладення. Цей засіб запобігає утворенню мінеральних відкладень, дає стійку піну; працює в воді будь-якої жорсткості; легко змивається.

Спосіб застосування засобу «Бланідас-ОПЦ Термо» передбачає концентрації від 2 до 10% (за об'ємом) в залежності від типу і ступеня забруднення. Концентрація робочого розчину і час обробки залежить від ступеня забруднення і частоти миття.

Для видалення лужних забруднювачів можна використовувати засіб «Бланідас-А Б Супер» [29]. Це кислий комбінований засіб для чищення з дезінфікуючим ефектом на основі перекису водню. Препарат містить неорганічні кислоти та змочуючу добавку, яка забезпечує швидке та якісне чищення навіть у разі сильного забруднення. Вже при низьких концентраціях засіб виявляє надійний дезінфікуючий вплив. Розчини «Бланідас-А Б Супер» легко споліскуються, не залишаючи слідів на поверхнях.

Спосіб застосування «Бланідас-А Б Супер» передбачає концентрації – 1 – 3%, при температурі 50 – 75°C, час дії 15-20 хв.

Для миття приміщення може використовуватися засіб Kiter Beta [30]. Він підходить для миття захищених або не захищених поверхонь (зокрема з металу, ПВХ, гуми, мікропористих, гранітних і мармурових),

Спосіб застосування: 1 доза об'ємом 25 мл на 8 літрів води (= 0,3%). Якщо поверхня не відштовхує воду, використовують подвійну дозу на 8 літрів води. Склад: водорозчинні речовини, неіоногенні поверхнево-активні речовини, ізолюючі речовини. рН в розчинному вигляді становить 7,5 +/- 0,5. Розчинність в воді повна.

З метою дезінфекції після миття необхідно передбачити використання спеціальних дезінфікуючих засобів. Добре підходить для біотехнологічного виробництва засіб «Лізоформін 3000» [31].

Склад засобу «Лізоформін 3000»: глутаровий альдегід, ЧАС.

Властивості:

- засіб має виражені миючі, дезодоруючі, змочувальні, емульгуючі властивості;
- якісна дезінфекція при мінімальних концентраціях;
- засіб зберігає свої властивості після замерзання та розморожування;
- термін придатності робочих розчинів – 28 днів;
- має бактерицидну, туберкулоцидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дію.

Цей універсальний комбінований альдегідний засіб може бути використаний для дезінфекції всіх типів поверхонь.

#### **5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

Склад поживного середовища для культивування *B. subtilis* наведено у таблиці 5.1.

## Склад поживного середовища

№ з/п	Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л
1	Крохмаль	20,0
2	Пептон	10,0
3	Дріжджовий екстракт	4,0
4	NaCl	0,5
5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
6	CaCl <sub>2</sub>	0,2

Характер стерилізації поживного середовища залежить фізико-хімічних властивостей тих сполук, які входять до його складу. Виходячи з таких міркувань, окремо необхідно стерилізувати джерела вуглеводів, джерела амінного азоту (білки, пептиди тощо), мінеральні солі. При цьому необхідно розділяти солі магнію та кальцію з фосфатами, щоб попередити утворення осадів.

Обране поживне середовище складається з шести компонентів, які можна розділити на три композиції з різними умовами приготування та стерилізації:

Композиція I: крохмаль спочатку підігрівається для його часткового розварювання, після чого передається на стерилізацію; режим стерилізації: 112°C (0,05 МПа) впродовж 30 хв.

Композиція II: пептон та дріжджовий екстракт змішуються та передаються на стерилізацію; режим стерилізації: 120 °C (0,08 МПа) впродовж 30 хв.

Композиція III: мінеральні солі (натрію хлорид, магнію сульфат, кальцію хлорид) розчиняють у воді і передають на стерилізацію; режим стерилізації: 131°C (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв.

Отже, для підготовки заповнення посівним матеріалом ферментера об'ємом 5 м<sup>3</sup> необхідна його підготовка у чотири етапи. Умови культивування:

час - 24 год; рН - 7,0; температура - 50 °С, аерація - протягом перших 12 год; перемішування - постійне. Склад поживного середовища (г/л): крохмаль - 20,0; пептон - 10,0; дріжджовий екстракт - 4,0; NaCl - 0,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,5; CaCl<sub>2</sub> - 0,2. Компоненти середовища готуються та стерилізуються окремо, будучи розділеними та три композиції (I - крохмаль; II - пептон та дріжджовий екстракт; III - мінеральні солі). Очікуваний вихід α-амілази за даних параметрів здійснення виробничого біосинтезу: 1773 Од/мл.

## 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

*Таблиця 6.1*

№ з/п	Позначення	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний сіткою для видалення механічних забруднень
2	Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр панельного типу Alter Air, клас чистоти G4 (EU4), E=90 % [27]
3	К-3	Компресор	1	Гвинтовий компресор ВК15Е-8(10/15)-500ДВС. Максимальний тиск 11 атм. Продуктивність 1100 л/хв, 11 кВт [32]
4	Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач С-ФКО-50-30 [33]
5	Р-5	Ресивер	1	Ресивер РВ900.818.01, 900 л, 10 бар [34]
6	Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач ПНП 113-Х01-01. Продуктивність 1600-2500 м <sup>3</sup> /год. Максимальна температура 150 °С, максимальний тиск 1,6 МПа [35]
7	Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр тонкої очистки E=99,0 %
8	Ф-8	Індивідуальний фільтр	4	Фільтри НЕРА, 0,25... 1,0 мкм, E>99,99 %
9	ЗБ-9	Збірник для миючих та дезінфікуючих засобів	1	Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 50 л, стійкий до корозії
10	І-10	Інокулятор 1	1	Ферментер Solaris S-серія, 5 л, мішалка осевого типу, з автоматичним керуванням, 2 бар, сталь AISI 310 [26].
11	З-11	Збірник для змішування компонентів поживного середовища	1	Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 30 л, нержавіюча сталь AISI 304

<i>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</i>				
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розробила		Ікбал С. Д.		
Перевірила		Резніченко Ю. М.		
Н. Контр.				
Затвердив		Стабніков В. П.		
<i>Розділ 6. Специфікація обладнання</i>				
		Літ.	Аркуш	Аркушів
			43	89
<i>Кафедра БТМ</i>				

Продовження табл. 6.1

12	Н-12	Насос	1	Насос відцентровий. Продуктивність 100 л год, 2,6 кВт.
13	З-13	Збірник для змішування компонентів поживного середовища	1	Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 30 л, нержавіюча сталі AISI 304
14	Н-14	Насос	1	Насос відцентровий. Продуктивність 100 л год, 2,6 кВт.
15	І-15	Інокулятор 2	1	Ферментер Solaris S-серія, 50 л, мішалка осьового типу, з автоматичним керуванням, 2 бар, сталь AISI 310 [26]
16	З-16	Збірник для змішування компонентів поживного середовища	1	Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 300 л, нержавіюча сталі AISI 304
17	Н-17	Насос	1	Насос відцентровий. Продуктивність 1 м <sup>3</sup> год, 2,6 кВт.
18	З-18	Збірник для змішування компонентів поживного середовища	1	Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 300 л, нержавіюча сталі AISI 304
19	Н-19	Насос	1	Насос відцентровий. Продуктивність 1 м <sup>3</sup> год, 2,6 кВт.
20	З-20	Збірник для змішування компонентів поживного середовища	1	Циліндричний вертикальний збірник з плоским дном, об'єм 20 л, нержавіюча сталі AISI 304
21	Н-21	Насос	1	Насос відцентровий. Продуктивність 1 м <sup>3</sup> год, 2,6 кВт.
22	ПА-22	Посівний апарат	1	Ферментер Solaris І-серія, 500 л, мішалка осьового типу, з автоматичним керуванням, 2 бар, сталь AISI 310 [26]
23	УБС-5	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації УБС-5. Продуктивність 5 м <sup>3</sup> /год.
24	ФР-24	Ферментер	1	Ферментер Solaris І-серія, 5000 л, мішалка осьового типу, з автоматичним керуванням, сталь AISI 310 [26]
25	Н-25	Насос	1	Насос відцентровий. Продуктивність 5 м <sup>3</sup> год, 2,6 кВт.

## 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема передбачає проведення допоміжних робіт (підготовка виробництва, підготовка і стерилізація поживного середовища) та технологічних робіт (вирощування посівного матеріалу, виробничих біосинтез). Розглянемо послідовно кожну з них.

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

Санітарна підготовка виробництва включає приготування миючих та дезінфікуючих засобів, підготовку приміщень та підготовку обладнання.

#### ***ДР.1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих засобів***

##### ***ДР. 1.1.1. Приготування розчину «Бланідас-ОПЦ Термо»***

У стійкому до корозії збірнику готують розчин лужного миючого засобу «Бланідас-ОПЦ Термо». Для цього у воді розчиняють цей засіб у концентрації 5%.

##### ***ДР. 1.1.2. Приготування розчину «Бланідас-А Б Супер»***

У стійкому до корозії збірнику готують розчин кислого миючого засобу «Бланідас-А Б Супер». Для цього у воді розчиняють цей засіб у концентрації 2%.

##### ***ДР. 1.1.3. Приготування розчину «Kiter Beta»***

У стійкому до корозії збірнику готують розчин миючого засобу для приміщень «Kiter Beta». Для цього у воді розчиняють цей засіб у концентрації 0,3%.

##### ***ДР. 1.1.4. Приготування розчину «Лізоформін 3000»***

Дезінфікуючий засіб переносять до порожньої ємності. Засіб готовий для використання, водою не розбавляють.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</b>		
<b>Зм.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<b>Розділ 7. Опис технологічної схеми</b>		
Розробила	Ікбал С. Д.						
Перевірила	Резніченко Ю. М.						
Н. Контр.							
Затвердив	Стабніков В.П.						
					<b>Літ.</b>	<b>Аркуш</b>	<b>Аркушів</b>
						45	89
					<b>Кафедра БТМ</b>		

## ***ДР. 1.2. Санітарна підготовка виробничих приміщень***

Підготовка виробничих приміщень на біотехнологічному підприємстві вимагає ретельного дотримання гігієнічних протоколів для підтримки стерильності та чистоти. Цей підхід передбачає чіткі процедури очищення та дезінфекції:

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

Щоденне прибирання передбачає систематичний процес спрямований на санітарію поверхонь приміщень (стіл, підлоги тощо). Використовуючи підготовлений розчин «Kiter Beta», поверхні миються поступово, забезпечуючи повне покриття без пропуску жодної ділянки.

Спочатку видаляються промислові відходи, якщо вони присутні під час прибирання. Використовуючи підготовлений розчин «Kiter Beta», поверхні миються поступово, забезпечуючи повне покриття без пропуску жодної ділянки. Після завершення прибирання утилізують відпрацьований розчин «Kiter Beta» у спеціально відведеному для цього місці.

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

Щомісяця, або за призначенням мікробіолога на підставі оцінки забруднення проводиться генеральне прибирання. Воно передбачає комплексну дезінфекцію. Спочатку миють поверхні, як під час щоденного прибирання. Далі розчин «Лізоформін 3000» використовується для ретельного очищення поверхонь, стін, столів і підлоги. Цей процес забезпечує знищення життєздатних мікроорганізмів з виробничих приміщень. Відпрацьований розчин належним чином утилізується з дотриманням гігієнічних норм. Перевіряють, що на поверхнях, які були оброблені безпосередньо після очищення, немає життєздатних мікроорганізмів.

## ***ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій***

### ***ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій***

Обладнання промивають 2% розчином їдкого натру, нагрітого до 50°C гарячою парою, з наступним 15 хвилинним перемішуванням. Після миття

обладнання ретельно промивається водою, контролюється зміна рН, щоб забезпечити повне видалення миючого засобу.

### ***ДР 1.3.2. Перевірка герметичності***

Після миття проводяться візуальні огляди та перевірки на наявність витоків у з'єднаннях та обладнанні. Для усунення будь-яких виявлених витоків негайно виконується підтяжка з'єднань або ремонт.

### ***ДР 1.3.3. Стерилізація обладнання та комунікацій***

Стерилізація виконується при температурі 120°C та тиску 0,2 МПа протягом 30 хвилин шляхом подачі гарячої пари на ферментери, фільтри та комунікації. Після закінчення стерилізації припиняють подачу пари, поступово знижують тиск в апараті шляхом відкриття патрубку відпрацьованого повітря. Знижують температуру шляхом подачі холодної води в сорочку апарату. Апарат продувають стерильним повітрям.

## ***ДР. 1.3. Підготовка персоналу***

### ***ДР.1.3.1. Навчання персоналу***

Персонал проходить комплексний інструктаж під час найму та безперервні сесії, необхідні для дотримання виробничих протоколів. Технологічний інструктаж проводиться не рідше одного разу на місяць і ретельно оформлюється в журналі. Проводяться регулярні оцінки знань персоналу, щоб забезпечити розуміння та дотримання вимог.

### ***ДР. 1.3.2. Санітарна підготовка персоналу***

Весь виробничий персонал перед прийняттям на роботу повинен пройти попередні медичні та бактеріологічні огляди згідно з встановленими рекомендаціями щодо обов'язкових профілактичних та медичних оглядів. Ці огляди проводяться не рідше одного разу на рік для дотримання стандартів здоров'я.

Під час участі у виробничих процесів персонал дотримується суворого режиму гігієни. За потреби руки обробляють дезінфікуючими гелями або 76 % етиловим спиртом. Верхній одяг знімають у відведених гардеробах, а персонал

після миття рук переодягається у спеціальний виробничий одяг, що забезпечує гігієнічний перехід у виробниче середовище.

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

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

Атмосферне повітря збирається з висоти 10 метрів, забезпечуючи чисте джерело подалі від технологічних викидів.

### ***ДР. 2.2 Грубе очищення повітря***

Повітря проходить попередню очистку через фільтри грубої очистки, панельного типу з класом чистоти G4. Ці фільтри усувають великі частки, досягаючи ефективності очищення до 90%.

### ***ДР 2.3 Компресування***

Тиск повітря доводять до рівня від 0,4 до 0,5 МПа, викликаючи підвищення температури.

### ***ДР 2.4. Охолодження та видалення вологи***

Далі стиснене повітря охолоджується в теплообміннику до температури від 25°C за допомогою холодної води. Повітря надходить у ресивер для видалення вологи, стабілізуючи рівень вологості на рівні 60%.

### ***ДР 2.5 Підігрів повітря***

Нагрівання для запобігання утворенню конденсату: подальше нагрівання повітря до температури від 40°C допомагає запобігти утворенню конденсату на поверхнях фільтрів.

### ***ДР. 2.6. Тонке очищення***

Очищення продовжується через фільтри тонкої очистки HEPA, виготовлені із скляних волокон діаметром 0,25... 1,0 мкм. Перед ферментерами ступінь очищення повітря становить >99,99%.

## ***ДР 3. Підготовка поживного середовища***

***ДР 3.1. Підготовка поживного середовища для вирощуванні інокуляту в колбах на качалках***

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 3 л поживного середовища. Джерелом вуглецю є крохмаль (Композиція I), джерелом азоту — пептон та дріжджовий екстракт (Композиція II), джерелами мінеральних солей — натрій хлорид, магній сульфат та кальцій хлорид (Композиція III). Розчинник (вода) розподілений між компонентами.

Таблиця 7.1

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 300 мл середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст (г) у 300 мл поживного середовища	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	20,0	6,0	I	0,17
Пептон	10,0	3,0	II	0,12
Дріжджовий екстракт	4,0	1,2		
NaCl	0,5	0,15	III	0,01
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	0,15		
CaCl <sub>2</sub>	0,2	0,06		

***ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції I***

На технічних вагах зважують 6,0 г крохмалю. Наважку поміщають у колбу об'ємом 300 мл, доливають 170 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою, підігривають до температури 50 °С для його часткового розварювання і потім стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С (тиск 0,05 МПа) упродовж 30 хв. (Кт, Км 3.1.1).

***ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції II***

На технічних вагах зважують 3,0 г пептону та 1,20 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 300 мл, доливають 120 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 120 °С (0,08 МПа) впродовж 30 хв. (Кт, Км 3.1.2).

### ***ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції III***

На технічних вагах зважують 0,15 г натрію хлориду, 0,15 г магній сульфату та 0,06 г кальцію хлориду. Наважки переносять у колбу об'ємом 50 мл, доливають 10 мл води питної. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C (0,15 МПа) упродовж 60 хв. (Кт, Км 3.1.3).

### ***ДР 3.2. Підготовка поживного середовища для вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л.***

Вміст компонентів для для отримання 3 л поживного середовища аналогічного складу наведено в табл. 4.2.

*Таблиця 7.2*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст (г) у 3 л поживного середовища	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	20,0	60,0	I	1,7
Пептон	10,0	30,0	II	1,2
Дріжджовий екстракт	4,0	12,0		
NaCl	0,5	1,5	III	0,1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	1,5		
CaCl <sub>2</sub>	0,2	0,6		

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

На технічних вагах зважують 60,0 г крохмалю. Наважку поміщають у колбу об'ємом 3 л, доливають 1,7 л дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою, підігривають до температури 50 °C для його часткового розварювання і потім стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C (тиск 0,05 МПа) упродовж 30 хв. (Кт, Км 3.2.1).

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

На технічних вагах зважують 30,0 г пептону та 12,0 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 3 л, доливають 1,2 л дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 120 °С (0,08 МПа) впродовж 30 хв. (Кт, Км 3.2.2).

### ***ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції III***

На технічних вагах зважують 1,5 г натрію хлориду, 1,5 г магній сульфату та 0,6 г кальцію хлориду. Наважки переносять у колбу об'ємом 200 мл, доливають 100 мл води питної. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 60 хв. (Кт, Км 3.2.3).

### ***ДР 3.3. Підготовка поживного середовища для вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л.***

Вміст компонентів для отримання 30 л поживного середовища аналогічного складу наведено в табл. 4.3.

*Таблиця 7.3*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 30 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст (г) у 30 л поживного середовища	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	20,0	600,0	I	17,0
Пептон	10,0	300,0	II	12,0
Дріжджовий екстракт	4,0	120,0		
NaCl	0,5	15,0	III	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	15,0		
CaCl <sub>2</sub>	0,2	6,0		

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

На технічних вагах зважують 600,0 г крохмалю. Наважку завантажують у збірник об'ємом 30 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 17,0 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом  $10 \pm 1$  хвилин паралельно підігрівуючи розчин для розварювання крохмалю. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.3.1).

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

На технічних вагах зважують 300 г пептону та 120 г дріжджового екстракту. Наважки завантажують у збірник об'ємом 30 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 12,0 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом  $10 \pm 1$  хвилин. Після цього композицію II передають до інокулятора, об'ємом 50 л, де проводять стерилізацію. Параметри процесу стерилізації: тиск 0,08 МПа тривалість 30 хв, температура 120 °С (Кт, Км 3.3.2).

### ***ДР 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції III***

На технічних вагах зважують 15 г натрію хлориду, 15 г магній сульфату та 6 г кальцію хлориду. Наважки переносять у колбу об'ємом 2 л, доливають 1 л води питної. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°С (0,15 МПа) упродовж 60 хв. (Кт, Км 3.3.3).

### ***ДР 3.4. Підготовка поживного середовища для вирощуванні посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 0,5 м<sup>3</sup>.***

Вміст компонентів для отримання 300 л поживного середовища аналогічного складу наведено в табл. 4.4.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 300 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст (г) у 300 л поживного середовища	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	20,0	6000,0	I	170,0
Пептон	10,0	3000,0	II	120,0
Дріжджовий екстракт	4,0	1200,0		
NaCl	0,5	150,0	III	10,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	150,0		
CaCl <sub>2</sub>	0,2	60,0		

***ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції I***

6 кг крохмалю через об'ємно-ваговий дозатор завантажують у збірник об'ємом 300 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 170 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом  $10 \pm 1$  хвилин паралельно підігриваючи розчин для розварювання крохмалю. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.4.1).

***ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції II***

3 кг пептону та 1,2 кг дріжджового екстракту через об'ємно-ваговий дозатор завантажують у збірник об'ємом 300 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 120 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом  $10 \pm 1$  хвилин. Після цього композицію II передають до посівного апарату, об'ємом 0,5 м<sup>3</sup>, де проводять стерилізацію. Параметри

процесу стерилізації: тиск 0,08 МПа тривалість 30 хв, температура 120 °С (Кт, Км 3.4.2).

### ***ДР 3.4.3. Приготування і стерилізація композиції III***

На технічних вагах зважують 150 г натрію хлориду, 150 г магній сульфату та 60 г кальцію хлориду. Наважки завантажують у збірник об'ємом 20 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 10 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом  $10 \pm 1$  хвилин паралельно підігриваючи розчин для розварювання крохмалю. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,15 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 60 хв при температурі 131 °С. У рубашку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.4.3).

### ***ДР 3.5. Підготовка поживного середовища для вирощуванні посівного матеріалу в ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup>***

Вміст компонентів для для отримання 3 м<sup>3</sup> поживного середовища аналогічного складу наведено в табл. 4.5.

*Таблиця 7.5*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3 м<sup>3</sup> л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст (кг) у 3 м <sup>3</sup> поживного середовища	Композиція	Об'єм композиції, м <sup>3</sup>
Крохмаль	20,0	60,0	I	1,7
Пептон	10,0	30,0	II	1,2
Дріжджовий екстракт	4,0	12,0		
NaCl	0,5	1,5	III	0,1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	1,5		
CaCl <sub>2</sub>	0,2	0,6		

### ***ДР 3.5.1. Приготування та стерилізація композиції I***

60 кг крохмалю через об'ємно-ваговий дозатор завантажують до УБС-5. Відкривають вентиль подачі води питної і подають 1,7 м<sup>3</sup> води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин паралельно підігрівачу розчин для розварювання крохмалю. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С. У рубашку для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.5.1).

### ***ДР 3.5.2. Приготування та стерилізація композиції II***

30 кг пептону та 12 кг дріжджового екстракту через об'ємно-ваговий дозатор завантажують до збірника. Відкривають вентиль подачі води питної і подають у збірник 1,2 м<sup>3</sup> води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин. Після цього передають до посівного апарату де проводять стерилізацію проводять стерилізацію. Параметри процесу стерилізації: тиск 0,08 МПа тривалість 30 хв, температура 120 °С (Кт, Км 3.5.2).

### ***ДР 3.5.3. Приготування і стерилізація композиції III***

1,5 кг натрію хлориду, 1,5 кг магній сульфату та 0,6 кг кальцію хлориду. через об'ємно-ваговий дозатор завантажують об'ємом в УБС-5. Відкривають вентиль подачі води питної і подають 0,1 м<sup>3</sup> води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,15 МПа за показниками манометра починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 60 хв при температурі 131 °С. У рубашку для зменшення енерговтрат подається глуха пара (Кт, Км 3.5.3).

#### ***ТП.4. Підготовка посівного матеріалу***

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

Колекційну культуру *Bacillus subtilis* KIBGE HAS зберігають у пробірках. Пересіви здійснюють кожні 2–3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять у суворо асептичних умовах (Кт, Км 4.1).

##### ***ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах***

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 50 °С упродовж 24 год (Кт, Км 4.2).

##### ***ТП. 4.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках***

Отримані ізольовані колонії (від ТП 3.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год. Засіяні пробірки ставлять у термостат з температурою 50 °С та витримують впродовж 12 – 24 год. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням (Кт, Км 4.3)

##### ***ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.***

У колбу об'ємом 500 мл в асептичних умовах вносять 170 мл розчину композиції I (від ДР 3.1.1), 120 мл розчину композиції II (від ДР 3.1.2) та 10 мл розчину композиції III (від ДР 3.1.3). Перемішують і розливають по 30 мл в десять стерильних качалочних колб об'ємом 50 мл.

У пробірку з робочою культурою *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, вирощеною на МПА, вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), стерильною піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках проводять за наступних умов: температура – 50 °С, частота обертання – 150 об/хв, час

вирощування – 12 год. Після вирощування культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 5 л (Кт, Км 4.4).

#### ***ТП 4.5. Вирощування культури у інокуляторі 5 л***

В інокулятор об'ємом 5 л в асептичних умовах передають охолоджені до кімнатної температури стерильні розчини: 1,70 л композиції I (від ДР 3.2.1), 1,20 л композиції II (від ДР 3.2.2) та 0,1 л композиції III (від ДР 3.2.3). Доводять рівень рН до 7,0 стерильним розчином гідроксиду натрію контролюючи за показами рН-метра.

Посівний матеріал із засівної колби дотримуючись правил асептики, переносять в інокулятор. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 50 °С, швидкість перемішування – 150 об/хв, час вирощування – 12 год., аерація – 1 л/л\*хв, при рН=7,0, стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа. (Кт, Км 4.5).

#### ***ТП 4.6. Вирощування культури у інокуляторі 50 л.***

В інокулятор об'ємом 50 л (що вже містить попередньо простерилізовані 12 л композиції II) в асептичних умовах передають охолоджені до кімнатної температури стерильні розчини: 17,0 л композиції I (від ДР 3.3.1) та 1,0 л композиції III (від ДР 3.3.3). Доводять рівень рН до 7,0 стерильним розчином гідроксиду натрію контролюючи за показами рН-метра.

Посівний матеріал із інокулятора 5 л дотримуючись правил асептики, переносять в інокулятор. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 50 °С, швидкість перемішування – 150 об/хв, час вирощування – 12 год., аерація – 1 л/л\*хв, при рН=7,0, стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа. (Кт, Км 4.6)

#### ***ТП 4.7. Вирощування культури у посівному апараті 0,5 м<sup>3</sup>***

В посівний апарат об'ємом 0,5 м<sup>3</sup> (що вже містить попередньо простерилізовані 120 л композиції II) в асептичних умовах передають охолоджені до кімнатної температури стерильні розчини: 170,0 л композиції I (від ДР 3.4.1) та 10,0 л композиції III (від ДР 3.4.3). Доводять рівень рН до 7,0 стерильним розчином гідроксиду натрію контролюючи за показами рН-метра.

Засів проводиться перетискуванням стерильним стисненим повітрям посівного матеріалу з інокулятора (від ТП 4.6) через трубу перетискання до посівного апарату. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 50 °С, швидкість перемішування – 150 об/хв, час вирощування – 12 год., витрати повітря – 1 л/л\*хв, корекцію рівня рН впродовж культивування не проводять, під час вирощування у посівному апараті стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа (Кт, Км 4.7).

### ***ТП 5. Виробниче культивування***

#### ***ТП 5.1 Виробниче культивування у ферментері 5 м<sup>3</sup>***

В ферментер об'ємом 5,0 м<sup>3</sup> (що вже містить попередньо простерилізовані 1,2 м<sup>3</sup> композиції II) в асептичних умовах передають охолоджені до кімнатної температури стерильні розчини: 1,7 м<sup>3</sup> композиції I (від ДР 3.5.1) та 0,1 м<sup>3</sup> композиції III (від ДР 3.5.3). Доводять рівень рН до 7,0 стерильним розчином гідроксиду натрію контролюючи за показами рН-метра.

Засів проводиться перетискуванням стерильним стисненим повітрям посівного матеріалу з попереднього посівного апарату (від ТП 4.7) через трубу перетискання до посівного апарату. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 50 °С, швидкість перемішування – 150 об/хв, час вирощування – 24 год., витрати повітря – 1 л/л\*хв, корекцію рівня рН впродовж культивування не проводять, під час вирощування у посівному апараті стерильним стисненим повітрям підтримується надлишковий тиск – 0,02 МПа (Кт, Км 5.1).

## 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 8.1. Карта постадійного контролю виробництва

Відповідно до обґрунтованої технологічної схеми виробництва та враховуючи усі вищепроведені розрахунки, розроблюємо карту постадійного контролю виробництва.

*Таблиця 8.1*

#### Карта постадійного контролю виробництва

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1. Приготування розчину «Бланідас-ОПЦ Термо»	<b>Розчин «Бланідас-ОПЦ Термо»</b> Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 5 %
Кх 1.1.2. Приготування розчину «Бланідас-А Б Супер»	<b>Розчин «Бланідас-А Б Супер»</b> Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 2 %
Кх 1.1.3. Приготування розчину «Kitter Beta»	<b>Розчин «Kitter Beta»</b> Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,3 %

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробила	Ікбал С. Д.				<i>Розділ 8. Контроль виробництва</i>	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірила	Резніченко Ю. М.						59	89
Н. Контр.					<i>Кафедра БТМ</i>			
Затвердив	Стабніков В. П.							

Кх 1.2.1, Кх 1.2.2 Санітарна підготовка виробничих приміщень	<b>Підлога та стіни</b> Чистота поверхні	Візуальний, мікробіологічний	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу, бруду і сторонніх мікроорганізмів
Кт 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання та комунікацій	<b>З'ємні частини обладнання та мийний розчин</b> Температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник.	Під час кожної перевірки	$t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau=15\text{ хв}$
Кт 1.3.2 Перевірка герметичності	<b>Обладнання</b> Герметичність роботи	Візуально	Під час кожної перевірки	Відсутність протікання обладнання
Кт 1.3.3 Стерилізація обладнання та комунікацій	<b>Обладнання</b> Температура стерилізації, час стерилізації, тиск	Термометр технічний, манометр	Температура визначається під час стерилізації	$t = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , $p = 0,2\text{ МПа}$
Кт 2.2 Грубе очищення повітря	<b>Повітря на виході з фільтра грубого очищення</b> Ступінь очищення, перепад тисків	Ступінь очищення згідно специфікації фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 90\text{ }%$
Кт 2.3 Компресування	<b>Стиснене повітря</b> Тиск	Манометр технічний	Після компресування повітря	$p = 0,5\text{ МПа}$
Кт 2.4 Охолодження та видалення вологи	<b>Повітря</b> Температура та вологість	Термометр технічний, психометр	Після охолодження	$t = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $W = 60\text{ }%$

Кт 2.5 Підігрів повітря	<b>Повітря</b> Температура повітря	Термометр технічний	Після підігріву	$t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
Кт 2.6 Тонке очищення	<b>Повітря після фільтру</b> Ступінь чистоти	Ступінь очищення згідно специфікації фільтра	Після проходження повітря через фільтри	$E=99,99\text{ }%$
Кт, Км 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції I	<b>Композиція I</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $P=0,05\text{ МПа}$ $\tau=30\text{ хв}$ Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції II	<b>Композиція II</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=120\text{ }^{\circ}\text{C}$ $P=0,08\text{ МПа}$ $\tau=30\text{ хв}$ Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції III	<b>Композиція III</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=131\text{ }^{\circ}\text{C}$ $P=0,15\text{ МПа}$ $\tau=60\text{ хв}$ Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції I	<b>Композиція I</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $P=0,05\text{ МПа}$ $\tau=30\text{ хв}$ Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції II	<b>Композиція II</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=120\text{ }^{\circ}\text{C}$ $P=0,08\text{ МПа}$ $\tau=30\text{ хв}$ Відсутність мікрофлори

Кт, Км 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції III	<b>Композиція III</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=131 °C P=0,15 МПа τ=60 хв Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції I	<b>Композиція I</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=112 °C P=0,05 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції II	<b>Композиція II</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=120 °C P=0,08 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції III	<b>Композиція III</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=131 °C P=0,15 МПа τ=60 хв Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції I	<b>Композиція I</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=112 °C P=0,05 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції II	<b>Композиція II</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=120 °C P=0,08 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори

Кт, Км 3.4.3 Приготування та стерилізація композиції III	<b>Композиція III</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=131 °C P=0,15 МПа τ=60 хв Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.5.1 Приготування та стерилізація композиції I	<b>Композиція I</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=112 °C P=0,05 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.5.2 Приготування та стерилізація композиції II	<b>Композиція II</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=120 °C P=0,08 МПа τ=30 хв Відсутність мікрофлори
Кт, Км 3.5.3 Приготування та стерилізація композиції III	<b>Композиція III</b> Температура, тиск, час витримки, стерильність	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t=131 °C P=0,15 МПа τ=60 хв Відсутність мікрофлори
Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	<b>Колекційна культура</b> температура збереження, мікробіологічна чистота, тривалість між пересівами	Термометр, мікробіологічний контроль, журнал контролю	Температура контролюється постійно, мікробіологічна чистота при кожному пересіві	t = 50°C τ=3-4 міс. відсутність сторонньої мікрофлори

Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах	<b>Робоча культура</b> тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Годинник термометр, мікробіологічний контроль	Температура контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури	$t = 50^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікрофлори
Кт, Км 4.3 Вирощування посівного матеріалу в пробірках	<b>Посівний матеріал</b> тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Годинник термометр, мікробіологічний контроль	Температура контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури	$t = 50^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікрофлори
Кт, Км 4.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	<b>Посівний матеріал</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник термометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури	$t = 50^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 12$ год, $\omega = 150$ об/хв відсутність сторонньої мікрофлори
Кт, Км 4.5 Вирощування культури у інокуляторі 5л	<b>Поживне середовище рН Посівний матеріал</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надл. тиск, мікробіологічна чистота культури	Датчик рН  Годинник термометр, тахометр, витратомір, манометр мікробіологічний контроль	рН після змішування компонентів середовища, температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури	$\text{pH}=7.0$ $t = 50^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 12$ год, $\omega = 150$ об/хв 1 л*л/хв, $P_{\text{надл.}} = 0,02$ МПа відсутність сторонньої мікрофлори

<p>Кт, Км 4.6 Вирощування культури у інокуляторі 50 л</p>	<p><b>Поживне середовище</b> рН <b>Посівний матеріал</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надл. тиск, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Датчик рН  Годинник термометр, тахометр, витратомір, манометр мікробіологічний контроль</p>	<p>рН після змішування компонентів середовища, температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури</p>	<p>рН=7.0 t = 50°C, τ = 12 год, ω = 150 об/хв 1 л*л/хв, P<sub>надл.</sub> = 0,02 МПа відсутність сторонньої мікрофлори</p>
<p>Кт, Км 4.7 Вирощування культури у посівному апараті 0,5 м<sup>3</sup></p>	<p><b>Поживне середовище</b> рН <b>Посівний матеріал</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Датчик рН  Годинник термометр, тахометр, витратомір, манометр мікробіологічний контроль</p>	<p>рН після змішування компонентів середовища, температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури</p>	<p>рН=7.0 t = 50°C, τ = 12 год, ω = 150 об/хв 1 л*л/хв, P<sub>надл.</sub> = 0,02 МПа відсутність сторонньої мікрофлори</p>

Кт, Км 5.1 Вирощування культури у ферментері 5 м <sup>3</sup>	<b>Поживне середовище</b> рН <b>Посівний матеріал</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, активність амілази	Датчик рН  Годинник термометр, тахометр, витратомір, манометр мікроскоп, ФЕК	рН після змішування компонентів середовища, температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	рН=7,0 t = 50°C, τ = 24 год, ω = 150 об/хв 1 л*л/хв, P <sub>надл.</sub> = 0,02 МПа відсутність сторонньої мікрофлори
------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Відповідно до складеної карти постадійного контролю виробництва проводиться технологічний контроль та мікробіологічний контроль.

Технологічний контроль передбачає контроль таких параметрів, як час, тиск, температура, що здійснюється інструментально у ході процесу; а також контроль концентрації джерел вуглецю та азоту у культуральній рідині упродовж виробничого біосинтезу, що передбачає визначення вмісту конкретних компонентів поживного середовища, що є джерелами вуглецю і азоту.

## 8.2. Визначення концентрацій джерел азоту та карбону

Пробу культуральної рідини 50 мл центрифугують при 3000 об/хв протягом 20 хв. Для подальшого дослідження беруть супернатант.

### *Джерело азоту*

Амінні групи амінокислот вступають в реакцію з формальдегідом із утворенням метиленових сполук (метиленамінокислот). Метиленамінокислоти володіють більш сильними кислотними властивостями та легко

відтитровуються лугом. По кількості розчину лугу, який пішов на титрування, можна розрахувати вміст азоту аміногруп. При цьому приймають що кількість карбоксильних груп, відтитрованих лугом, еквівалентна кількості аміногруп, прореагувавших з формальдегідом.

Для проведення вимірювань в стаканчик чи конічну колбу наливають 20 мл розчину супернатанту. В другу таку ж ємність наливають 20 мл води, яка слугує контролем. В обидві ємності додають по 3 краплі індикатора метиленового червоного і титрують 0,05 н розчином їдкого натру до появи жовтого забарвлення. Після цього в ємності доливають по 10 мл формольної суміші. Після додавання формольної суміші обидві проби ( дослідну і контрольну) титрують 0,2 н розчином їдкого натру до появи інтенсивного червоного забарвлення. При розрахунках вмісту амінного азоту в 20 мл досліджуваного розчину приймають до уваги, що 1 мл 0,2 н розчину NaOH відповідає 2,8 мг азоту.

Отриманий результат потім перераховують на 100 г досліджуваної речовини

#### *Джерело карбону*

Оскільки джерелом карбону є крохмаль, то визначення концентрації проводять попередньо провівши кислотний гідроліз крохмалю до глюкози.

Для цього аліквоту супернатанту переносять у хімічну склянку, додають 50 мл холодної води, що дистилує, і залишають на 1 год при частому помішуванні. Після цього вміст склянки переносять на фільтр і промивають 250 мл холодної води, що дистилує. Прорвавши фільтр скляною паличкою, осад переносять у колбу ємністю 500 мл, ретельно змиваючи дистильованою водою з фільтра і палички.

До осаду в колбі додають 25 мл хлоридної кислоти (відносною щільністю 1,125), до колби приєднують зворотний холодильник і колбу з вмістом нагрівають на киплячій водяній бані протягом 2,5 год. Після цього вміст колби охолоджують до кімнатної температури, нейтралізують 15% розчином NaOH та підкислюють 1-2 краплями соляної кислоти (відносною щільністю 1,125).

Потім вміст колби переносять у мірну колбу ємністю 250 мл, доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують в суху колбу.

У фільтраті визначають інвертований цукор одним із перманганатних методів. Отриману кількість цукру перераховують на крохмаль, помножуючи коефіцієнт 0,9. Вміст крохмалю у досліджуваному продукті виражають у відсотках.

### **8.3. Мікробіологічний контроль**

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопуванням. Попередньо відібрану культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) — для виявлення дріжджів і грибів. Видовий склад мікроорганізмів, які виявляють ріст визначають візуально за культуральними ознаками.

Для мікроскопування використовують метод мікроскопування імерсійною системою. Препарат готують на предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, висушують над полум'ям пальника, фіксують, забарвлюють за Грамом і розглядають з об'єктивом 90х. Мікроорганізми ідентифікують за морфологічними ознаками.

### **8.4. Визначення $\alpha$ -амілазної активності амیلосубтиліну**

Щоб підготувати робочий розчин 3,5-динітросаліцилової кислоти, 10 г поступово розчиняють в умовах нагрівання в 700 мл 0,5 н. розчину NaOH. Потім додають 300 г тартрату натрію калію і дистильовану воду до остаточного утворення об'ємом 1000 мл. Реактив має темно-оранжевий колір і стабільний кілька днів при кімнатній температурі [36].

Стандартні розчини мальтози (0-10 мкмоль/л) готують у пробірках. 1 мл робочого розчин 3,5-динітросаліцилової кислоти додають у кожен пробірочку і суміш перемішують протягом кількох секунд на вихровій мішалці. Зразки

поміщають на водяну баню ( $T=100^{\circ}\text{C}$ ) на 5 хв, а потім залишають охолоджуватися при кімнатній температурі. У кожену пробу додають 5 мл деіонізованої води з наступним перемішуванням. Поглинання ( $A$ ) зразків вимірюють при  $\lambda=540$  нм. Будують стандартну криву залежності поглинання від концентрації. Потім вимірюється абсорбція кожного з невідомих зразків і визначається концентрація цукрів, що перетворюються, на основі стандартної кривої.

З метою визначення  $\alpha$ -амілазної активності, 0,5 мл належним чином розведеного (в буферному розчині оцтової кислоти;  $\text{pH}=4,9$ ) ферменту амілосубтиліну інкубують протягом 15 хвилин при  $T=40^{\circ}\text{C}$  з 0,5 мл розчинного розчину крохмалю 1 % мас./об. Після цього вироблену кількість редуруючих цукрів, що виділяються з крохмалю, визначають, як описано вище. Як одиницю активності (одиниця, U) ферменту  $\alpha$ -амілази довільно приймають кількість ферменту, необхідну для виробництва 1 мкмоль мальтози за 1 хв, коли фермент інкубують разом із субстратом при  $\text{pH}=4,9$  і  $T=40^{\circ}\text{C}$ .

## 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

### 9.1. Актуальність та основні завдання знешкодження відходів на виробництві

Утилізація та знешкодження відходів, що утворюються в результаті біотехнологічного виробництва ферментного препарату амілосубтиліну з використанням бактерій *Bacillus subtilis*, є дуже актуальною з кількох причин. Так, підприємство, на якому запроваджена ефективна схема із утилізації відходів забезпечуватиме захист навколишнього середовища. У процесі виробництва амілази утворюються різні відходи, такі як відпрацьоване культуральне середовище, біомаса та інші побічні продукти. Якщо не поводитися належним чином, ці відходи можуть мати негативний вплив на навколишнє середовище. Методи очищення мають вирішальне значення для запобігання викиду потенційно шкідливих речовин у навколишнє середовище, мінімізації забруднення та екологічної шкоди.

Правильне поводження з відходами має забезпечувати дотримання вимог нормативних актів. В Україні поводження з відходами на підприємствах визначається Законом України «Про відходи» [37], ДСанПіН 2.2.7.029-99 [38], ДСТУ 3911-99 [39] тощо. Тому на підприємстві планується запровадження схеми утилізації відходів, що відповідає законодавству України.

Крім того, переробка відходів дозволяє організувати ресурсозберігаюче підприємство. Відходи біотехнологічних процесів містять цінні компоненти, які можна переробити або використати повторно. Впроваджуючи ефективні методи обробки дозволитимуть відновлювати частину відходів для повторного використання у основних технологічних процесах або допоміжних виробництвах. Це не тільки зменшить обсяг відходів, але й оптимізує використання ресурсів, сприяючи більш екологічному підходу до виробництва.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 9. Охорона довкілля</i>		
<i>Розробила</i>	<i>Ікбал С. Д.</i>						
<i>Перевірила</i>	<i>Резніченко Ю. М.</i>				<i>Літ.</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
						70	89
<i>Н. Контр.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затвердив</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						

До того ж, належне поводження з відходами може допомогти зменшити витрати на їх утилізацію, що призведе до значної економії коштів для підприємства.

Враховуючи вищезазначене, розробка схеми знешкодження відходів на підприємстві є важливою складовою ведення виробничих процесів.

## 9.2. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологічна схема виробництва передбачає проведення допоміжних робіт та основних технологічних операцій. До допоміжних операцій належить підготовка поживного середовища. До основних операцій належать вирощування посівного матеріалу та виробниче культивування та післяферментаційне очищення продукту — ферментного препарату амілосубтиліну. Стадії технологічного процесу та основні групи відходів на них утворюються визначено у таблиці 9.1.

Таблиця 9.1

### Основні групи відходів по стадіям виробництва

Стадія	Відходи	Група відходів	Класи небезпеки
<b>Підготовка поживного середовища</b>			
Підготовка поживного середовища об'ємом 300 мл	Технологічна вода, Розчини композицій з компонентами поживних середовищ	Рідкі	IV малонебезпечні
Підготовка поживного середовища об'ємом 3 л	Технологічна вода, Розчини композицій з компонентами поживних середовищ	Рідкі	IV малонебезпечні
Підготовка поживного середовища об'ємом 30 л	Технологічна вода, Розчини композицій з компонентами поживних середовищ	Рідкі	IV малонебезпечні
Підготовка поживного середовища об'ємом 300 л	Технологічна вода, Розчини композицій з компонентами поживних середовищ	Рідкі	IV малонебезпечні

Підготовка поживного середовища об'ємом 3 м <sup>3</sup>	Технологічна вода, Розчини композицій з компонентами поживних середовищ	Рідкі	IV малонебезпечні
<b>Підготовка посівного матеріалу</b>			
Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Повітря, технологічна вода, культуральна рідина	Газоподібні Рідкі	III помірно небезпечні
Вирощування посівного матеріалу у інокуляторі 5 л	Повітря, технологічна вода, культуральна рідина	Газоподібні Рідкі	III помірно небезпечні
Вирощування посівного матеріалу у інокуляторі 50 л	Повітря, технологічна вода, культуральна рідина	Газоподібні Рідкі	III помірно небезпечні
Вирощування посівного матеріалу у посівному апараті 0,5 м <sup>3</sup>	Повітря, технологічна вода, культуральна рідина	Газоподібні Рідкі	III помірно небезпечні
<b>Виробниче культивування</b>			
Виробниче культивування у ферментері 5 м <sup>3</sup>	Повітря, технологічна вода, культуральна рідина	Газоподібні Рідкі	III помірно небезпечні
<b>Післяферментаційні процеси</b>			
Фільтрування	Культуральна рідина, Біомаса бактерій	Рідкі Тверді	III помірно небезпечні
Осадження препарату	Розчинник, ферментний препарат	Рідкі Тверді	III помірно небезпечні
Центрифугування препарату	Розчинник, ферментний препарат	Рідкі Тверді	III помірно небезпечні
Сушіння препарату	Пари розчинника, ферментний препарат	Газоподібні Тверді	III помірно небезпечні
Пакування і маркування готової продукції	Пакувальні матеріали, бракована продукція	Тверді	IV малонебезпечні

### 9.3. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

#### *Знешкодження газоподібних відходів*

Газоподібні відходи можуть утворюватися на різних стадіях виробництва:

- газові викиди з ферментера, посівних апаратів, інокуляторів;

- вентиляційні викиди;
- газові викиди під час пропарювання й продування обладнання і трубопроводів.

Газові викиди з ферментерів та посівних апаратів містять живу мікрофлору та багато інших біологічно-активних сполук, а отже їх очистка необхідною та важливою. Така очистка ступенево проводиться:

- у циклонах;
- у рукавних фільтрах;
- у пристроях вологої очистки.

Очистка викидів з ферментерів та посівних апаратів здійснюють у пристрої, заснованому на способі обробки відпрацьованих газів шляхом використання фотокаталізу. Даний спосіб включає етапи фізичного видалення пилу, каталітичного окислення за допомогою фотокаталізатора, очищення від мікроорганізмів, і може ефективно усунути загальну кількість зважених твердих частинок в органічних відпрацьованих газах та летких органічних сполук у відпрацьованих газах [40].

Очистка повітря з вентиляційної системи здійснюється на різних фільтрах з волокнистих матеріалів. Очищене таким чином повітря викидається в атмосферу через трубу розсіювання.

#### *Знешкодження рідких відходів*

Рідкі відходи, які виникли на стадіях санітарної підготовки виробництва, та не перевищують значення санітарно-гігієнічних нормативів, зливаються у загальну каналізаційну систему. У разі необхідності відходи цієї категорії підлягають нейтралізації. Їх розводять водою в 3-4 рази та вносять соляну кислоту або гідроксид натрію доти, поки кислотність середовища не стане рівною 7,0. Оброблені таким чином відходи відводять у каналізацію.

Відпрацьована питна вода, яка виступає тепло- і холодоносієм та не контактує з джерелом забруднення (включаючи конденсати) є умовно-чистою і може бути використана у виробничому циклі повторно. Таку воду перевіряють

по показникам згідно ДСанПіП 2.2.4-171-10 [41], а у разі виявлення порушень - відправляють на стадію водопідготовки.

Некондиційний посівний матеріал та культуральна рідина підлягає інактивації. Для цього проводять їх обробку гострою парою під тиском 0,3 МПа за температури 130 °С. Тривалість обробки складає 45 хв, а по її завершенню вміст реактору охолоджується водою питною через сорочку. У середину реактору вносять воду питну та соляну кислоту або гідроксид натрію для досягнення кислотності середовища рівного 7,0. Оброблені таким чином відходи відводять у каналізацію.

Стічні води біотехнологічного підприємства можуть містити мікрофлору. Вже на виході з обладнання для післяферментаційної очистки стічні води стерилізують на нейтралізують. Оброблені таким чином води спрямовуються на очисні споруди.

Проводять механічне очищення — стічні води проціджують крізь сітки, фільтрують, відстоюють, оброблюють в гідроциклонах, застосовують флотацію. Ступінь такої очистки складає 50-70%.

Окрім хімічної обробки води може бути використано фізико-хімічне очищення з використанням адсорбентів (вугілля, попелу тощо). Можливим є застосування ультрафільтрування, зворотного осмосу, дистиляції. Ступінь очищення складає 90-95%.

Для очищення від органічних забруднень застосовують біотехнологічне очищення. Біотехнологічне очищення передбачає кілька методів знезараження стічних вод, що містяться в одній системі, таким чином оптимізуючи знезараження стічних вод. Система очищення стічних вод містить укріплений сталлю пластиковий резервуар, який має першу та другу перегородки, що розділяють резервуар на першу, другу та третю камери. Перша камера містить, щонайменше, один перший стічний фільтр і додатково містить анаеробні бактерії для видалення органічних відходів із отриманих у ній стічних вод. Перша камера налаштована на часткове видалення органічних речовин зі стічної води. Друга камера містить повітряний дифузор і містить аеробні

бактерії для подальшого видалення органічних відходів із стічних вод, надходять у неї. Третя камера включає вузол мулового насоса та один фільтр для стоків. Очищена вода, що утворюється в результаті, виводиться з третьої камери через вихідний отвір [42]. Кінцева очистка проводиться хімічними методами: обробка вапном, хлорування, озонування. Ступінь загальної очистки становить 90-95 %.

#### *Знешкодження твердих відходів*

До твердих відходів можуть входити біомаса після фільтрування, залишки ферментного препарату, браковані пакувальні матеріали та готова продукція.

Біомаса підлягає інактивації. Проводять її обробку гострою парою під тиском 0,3 МПа за температури 130 °С. Тривалість обробки складає 45 хв. Оброблену таким чином біомасу відводять у каналізацію або на полігон відходів.

Бракований пакувальний матеріал збираються в картонні коробки і передаються в загально цеховий збірник-контейнер для браку з наступним направленням відповідні організації для переробки. Відпрацьовані фільтрувальні елементи піддаються нейтралізації або утилізації. Їх очищають від забруднень, використовуючи питну воду, та обробляють дезінфектантами, при необхідності промивають водою очищеною.

Побудова на підприємстві раціональної схеми із поводження з відходами має вирішальне значення для захисту навколишнього середовища, дотримання нормативних вимог, відновлення ресурсів, економічної ефективності виробництва, а також загалом сприятиме більш стійкому та відповідальному виробничому процесу.

## ВИСНОВКИ

Фермент амілосубтилін життєво важливий для гідролізу крохмалю, що має місце у різних галузях промисловості, включаючи харчову, фармацевтичну хімічну тощо. Світовий попит на гідролізований крохмаль і ферментні препарати на основі альфа-амілази зростає. Очікується, що ринок цих продуктів зростатиме, відкриваючи багатообіцяючі можливості для виробництва амілосубтиліну.

Хоча точні дані щодо використання амілолітичних ферментів залишаються недоступними, очікується, що прогнозоване виробництво крохмалю в Європі буде значним і досягне 20 млн т на рік. Розглядаючи очікуване виробництво крохмалю та враховуючи втрати під час післяферментаційних процесів, було визначено необхідну виробничу потужність на рівні 789,6 м<sup>3</sup> за культуральною рідиною.

Щоб задовольнити річну потребу в амілосубтиліні, було визначено кількість необхідних виробничих циклів, що було покладено в основу для розрахунку геометричного об'єму ферментера, необхідного для виробництва. Після цього було оцінено кількість стадій із підготовки посівного матеріалу. Розрахунки показали, що для забезпечення промислового біосинтезу необхідний ферментер об'ємом 5 м<sup>3</sup>, який при коефіцієнті заповнення 0,6 містить 3 м<sup>3</sup> культуральної рідини, а для підготовки посівного матеріалу необхідні п'ять стадій.

Щоб вдосконалити виробництво препарату амілосубтилін та знизити його собівартість було здійснено ряд проектних рішень. Зокрема, у процесі біосинтезу пропонується використовувати штам бактерій *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, який продукує  $\alpha$ -амілазу з надзвичайно високою активністю 1773 Од/мл використовуючи для росту збалансований за компонентами субстрат.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</i>		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<i>Висновки</i>		
Розробила	Ікбал С. Д.						
Перевірила	Резніченко Ю. М.				Літ.	Аркуш	Аркушів
						76	89
Н. Контр.					<i>Кафедра БТМ</i>		
Затвердив	Стабніков В.П.						

Під час виконання кваліфікаційної роботи було обґрунтовано заходи санітарної підготовки виробництва, заходи із підготовки повітря, визначено умови стерилізації, запропоновано схему підготовки поживного середовища та підібрано режими стерилізації. Розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Наведено опис допоміжних та основних стадій технологічного процесу із зазначенням основних параметрів і точок контролю. Складено карту постадійного контролю виробництва.

Запроектована ділянка біосинтезу амліосубтиліну дозволяє отримувати високоякісний ферментний препарат і скоротити витрати на його виробництво.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. de Souza P. M., de Oliveira Magalhães P. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - A review. *Brazilian journal of microbiology*. 2010. Vol. 41, no 4. P. 850–861. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>.
2. Gopinath S. C., Anbu P., Arshad M. K., Lakshmi priya T., Voon C. H., Hashim U., Chinni S. V. *Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production*. *BioMed research international*. 2017. 1272193. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>.
3. Mehta D., Satyanarayana T. Bacterial and Archaeal  $\alpha$ -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. *Frontiers in microbiology*. 2016. Vol. 7. P. 1129. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01129>.
4. Elyasi Far B., Ahmadi Y., Yari Khosroshahi A., Dilmaghani A. Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2020. Vol. 10, no 3. P. 350–358. DOI: <https://doi.org/10.34172/apb.2020.043>.
5. Asgher M., Asad M.J., Rahman S.U., Legge R.L. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J Food Process Eng*. 2007. Vol. 79. P. 950–955. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.053>.
6. Rajagopalan G., Krishnan C. Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource technology*. 2008. Vol. 99, no 8. P. 3044–3050. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.001>.

<b>НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ</b>				
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розробила		Ікбал С. Д.		
Перевірила		Резніченко Ю. М.		
Н. Контр.				
Затвердив		Стабніков В. П.		
<b>Список використаних джерел</b>				
		Літ.	Аркуш	Аркушів
		78	89	
<b>Кафедра БТМ</b>				

7. Bano S., Ul Qader S. A., Aman A., Syed M. N., Azhar, A. Purification and characterization of novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *AAPS PharmSciTech*. 2011. Vol. 12, no 1. P. 255–261. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9586-1>.
8. Elumalai P., Lim J. M., Park Y. J., Cho M., Shea P. J., Oh B. T. Enhanced amylase production by a *Bacillus subtilis* strain under blue light-emitting diodes. *Preparative biochemistry & biotechnology*. Vol. 49, no 2. P, 143–150. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1550656>.
9. Knapp S. *Bacillus subtilis*. *Biology dictionary*: веб-сайт. 2020. <https://biologydictionary.net/bacillus-subtilis/>.
10. Morphological diversity of *Bacillus subtilis* / A. N. Irkitova et al. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8, no 2. P. 365–370.
11. Errington J., Aart L. T. V. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology (Reading, England)*. 2020. Vol. 166, no 5. P. 425–427. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000922>.
12. *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872. *ITIS*: веб-сайт. [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=958555#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=958555#null).
13. *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872. *GBIF*: веб-сайт. URL: <https://www.gbif.org/species/165593656>.
14. Transcriptional and metabolic responses of *Bacillus subtilis* to the availability of organic acids: transcription regulation is important but not sufficient to account for metabolic adaptation / Shilling et al. *Appl Environ Microbiol*. 2007. V. 73(2). P. 499-507.
15. Pathway Maps. *Kegg*: веб-сайт. URL: [https://www.kegg.jp/kegg-bin/search\\_pathway\\_text?map=bsu&keyword=&mode=1&viewImage=true](https://www.kegg.jp/kegg-bin/search_pathway_text?map=bsu&keyword=&mode=1&viewImage=true).
16. Global Industrial Starch Market Trends: Increasing appetite for starch and growing FMCG industry. *Prismane Consulting*. URL:

- <https://prismaneconsulting.com/blog-details/global-industrial-starch-market-trends-increasing-appetite-for-starch-and-growing-fmcg-industry>.
17. Аналіз ринку картопляного крохмалю в Україні 2022 рік. *Pro Consulting*. URL: <https://pro-consulting.ua/ua/issledovanie-rynka/analiz-rynka-kartofelnogo-krahmala-v-ukraine-2022-god>.
  18. Hydrolyzed starches market. *Exactitude consultancy*. URL: <https://exactitudeconsultancy.com/reports/13950/hydrolyzed-starches-market/>.
  19. Industrial starch market size. *Global Market Insights*. URL: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/industrial-starch-market#:~:text=Industrial Starch Market size was,in processed and convenience foods>.
  20. Global Alpha-Amylase Baking Enzyme Market – Industry Trends and Forecast to 2028. *Data Bridge Market Research*. URL: <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-alpha-amylase-baking-enzyme-market>.
  21. Alpha-amylase backing enzyme market outlook (2022–2032). *Future Market Insights*. URL: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/alpha-amylase-baking-enzyme-market>.
  22. Global bacterial amylase market snapshot (2023–2033). *Future Market Insights*. URL: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/bacterial-amylase-market>.
  23. The European starch industry. *Starch Europe*. URL: <https://starch.eu/the-european-starch-industry/>.
  24. Demirkan E., Sevgi T., Başkurt M. Optimization of Physical Factors Affecting the Production of the  $\alpha$ -Amylase from a Newly Isolated Bacillus sp. M10 Strain. *Karaelmas Fen ve Müh. Derg.* 2017. Vol. 7, no 1. P. 23-30.
  25. Mazza L. A., Ertola R. J. Influence of pH and aeration on bacterial formation of amylase. *Applied microbiology*. 1970. Vol. 19, no 3. P. 535. DOI: <https://doi.org/10.1128/am.19.3.535-535.1970>.

26. Solaris S-I Series. *SolarisBiotech*. URL: [https://www.solarisbiotech.com/data/files/original/436/Catalog\\_-\\_S-I\\_SERIES.pdf](https://www.solarisbiotech.com/data/files/original/436/Catalog_-_S-I_SERIES.pdf).
27. Панельні повітряні фільтри для грубого очищення. *AlerAir*. URL: <https://shop.alerair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/>.
28. Бланідас-ОПЦ Термо. *Lysoform*. URL: <https://lysoform.ua/products/blanidas-opcz-termo/>.
29. Бланідас-А Б Супер. *Lysoform*. URL: <https://lysoform.ua/products/blanidas-a-b-super/>.
30. Концентрований засіб для миття підлоги Kiter Beta 5 л. *CersmicPlace*. URL: <https://ceramicplace.com.ua/ru/sredstva-dlya-mytya-polov/274/>.
31. Лізоформін 3000. *Lysoform*. URL: <https://lysoform.ua/products/lizoformin-3000-11/>.
32. Гвинтовий компресор BK15E-8(10/15)-500ДВС. *Kongur*. URL: <https://kongur.com.ua/ua/vintovoy-kompressor-bk15e-8-10-15-500dvs/>.
33. Фреоновий охолоджувач С-ФКО-50-30. *Смарткомплект*. URL: <https://smartvent.com.ua/ua/p1224905768-freonovyj-ohladitel-fko.html>.
34. Ресивер Повітряний Лідер 16 бар 900 к. с. РВ900.818.01 для компресора. *Tusk*. URL: <https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-16-bar-900-lrv90081801-dlya-kompressora/>.
35. Повітрянагрівач ВНП (ПНП) 113-201-01УХЛЗ. URL: <https://kaloriferu.com.ua/ua/p60604508-vozduhonagrevatel-vnppnp-113.html>.
36. Determination of a-amylase activity. URL: <https://www.microbiology.biology.upatras.gr/en/protocols/111-determination-of-a-amylase-activity.html>.
37. Про відходи: Закон України від 05.03.1998. № 187/98-ВР. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/187/98-вр#Text>.
38. ДСанПіН 2.2.7.029-99. Державні санітарні правила та норми. 2. Комунальна гігієна. 2.7. Грунт, очистка населених місць, побутові та промислові

відходи, санітарна охорона ґрунту. "Гігієнічні вимоги щодо поводження з промисловими відходами та визначення їх класу небезпеки для здоров'я населення": від 01.07.1999 № 29. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0029588-99#Text>.

39. ДСТУ 3911-99 (ГОСТ 17.9.0.1-99) Охорона природи. Поводження з відходами. виявлення відходів та подання інформаційних даних про відходи. Загальні вимоги. К.: Держстандарт, 2000.
40. Method and device for treating organic waste gas by combining photocatalysis and microorganisms and application thereof: пат. CN101530732В Китай; заявл. 27.02.2009; опубл. 16.09.2009. 7 с.
41. ДСанПіН 2.2.4-171-10. Державині санітарні норми та правила. «Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною»: від 01.07.2010 за № 452/17747. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0452-10#Text>.
42. Wastewater treatment system and method: пат. US8372274B2; США; заявл. 12.01.2011; опубл. 14.07.2011. 28 с.



## A thermostable $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing

M. Asgher<sup>a,\*</sup>, M. Javaid Asad<sup>a</sup>, S.U. Rahman<sup>b</sup>, R.L. Legge<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Industrial Biotechnology Laboratory Department of Chemistry, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan

<sup>b</sup> Department of Microbiology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan

<sup>c</sup> Department of Chemical Engineering, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1

Received 17 November 2004; received in revised form 27 October 2005; accepted 6 December 2005  
Available online 29 March 2006

### Abstract

A newly isolated *Bacillus subtilis* JS-2004 strain was cultured in liquid media containing waste potato starch to produce  $\alpha$ -amylase. The effect of calcium, yeast extract and glucose supplementation of the production medium on bacterial growth and enzyme production was studied. Maximum enzyme production 72 U/mL was achieved after 48 h cultivation at pH 7.0 and 50 °C. Addition of calcium and yeast extract enhanced microbial growth and enzyme production, where as glucose at 1.0% level showed a strong repression. Studies on crude  $\alpha$ -amylase characterization revealed that optimum activity was at pH 8.0 and 70 °C. The enzyme was quite stable for 1 h at 60 and 70 °C, while at 80 and 90 °C, 12% and 48% of the original activities were lost, respectively. After incubation of crude enzyme solution for 24 h at pH 8.0 at 70 °C, a decrease of about 6% of its original activity was observed. The enzyme was activated by Ca<sup>2+</sup> (relative activity 117%). It was strongly inhibited by Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Hg<sup>2+</sup> but less affected by Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>. The *B. subtilis* JS-2004 strain produced high levels of thermostable  $\alpha$ -amylase with characteristics suitable for application in starch processing and food industries.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Thermostable  $\alpha$ -amylase; *Bacillus subtilis* JS-2004; Media optimization; Characterization; Starch processing

### 1. Introduction

Amylases are enzymes which hydrolyse starch molecules to give diverse products including dextrans and progressively smaller polymers composed of glucose units (Windish & Mhatre, 1965). These enzymes have a great significance with extensive biotechnological applications in bread and baking, food, textile, and paper industries (Pandey et al., 2000). Amylases having approximately 25% of the enzyme market (Burhan et al., 2003; Rao, Tanksale, Gathe, & Deshpande, 1998; Sidhu, Sharma, Chakrabarti, & Gupta, 1997) have almost completely

replaced chemical hydrolysis of starch in starch processing industry (Pandey et al., 2000). Thermostable  $\alpha$ -amylases have had extensive commercial applications in starch processing, brewing and sugar production (Leveque, Janecek, Haye, & Belarbi, 2000), desizing in textile industries (Hendriksen, Pedersen, & Bisgard-Frantzen, 1999) and in detergent manufacturing processes (Hewitt & Solomons, 1996; Lin, Chyau, & Hsu, 1998). Thermostability is a desired characteristic of most of the industrial enzymes. Thermostable  $\alpha$ -amylases are available from the mesophile *Bacillus licheniformis* (Morgan & Priest, 1981), *Bacillus* sp. ANT-6 (Burhan et al., 2003) and *Bacillus* sp. ASMIA-2 (Teodoro & Martin, 2000).

Each application of  $\alpha$ -amylase requires unique properties with respect to specificity, stability, temperature and pH dependence (McTigue, Kelly, Doyle, & Fogarty, 1995). Screening of microorganisms with higher  $\alpha$ -amylase

\* Corresponding author. Tel.: +92 42 9200161x3309; fax: +92 41 9200764.

E-mail address: mabajwapk@yahoo.com (M. Asgher).

НУХТ БТЕК 05.01.09. КР ПЗ

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробила		Ікбал С. Д.			Додатки	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірила		Резніченко Ю. М.					83	89
Н. Контр.					Кафедра БТМ			
Затвердив		Стабніков В. П.						

activities could therefore, facilitate the discovery of novel amylases suitable to new industrial applications (Gupta, Gigras, Mohapatra, Goswami, & Chauhan, 2003; Wanderley, Torres, Moraes, & Ulhoa, 2004). Thermophilic fermentation is also considered quite useful for technical and environmental purposes (Kristjanson, 1989; Sonnleitner & Fiechter, 1983). The advantages are, for instance, a reduction in cooling costs, a better solubility of substrates, a lower viscosity allowing accelerated mixing and pumping, and reduced risk of microbial contamination. However, running  $\alpha$ -amylase production processes at higher temperatures will require new process design and improved knowledge of thermophilic bacteria (Leveque et al., 2000).

In this article the production of thermostable  $\alpha$ -amylase by a moderate thermophilic *Bacillus subtilis* strain JS-2004 isolated in Pakistan is reported.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Selection and isolation of bacterial strain

*B. subtilis* JS-2004, a moderate thermophilic bacterium was isolated in the Department of Microbiology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan. Two samples from positive growth on nutrient agar medium I consisting of 2% peptone, 1% yeast extract, 1% NaCl, and 2% agar at pH 7.0 were selected. Culture suspensions in sterilized water were spread on medium I. The plates were incubated at 50 °C for 48 h. The bacterial colonies appearing on plate I were transferred to medium II containing 1% soluble starch, 0.2% yeast extract, 0.5% peptone, 0.1% MgSO<sub>4</sub>, 0.1% NaCl, 0.02% CaCl<sub>2</sub>, and 2% agar at pH 7.0. These cultures were incubated at 50 °C for 48 h. Typical cultural and morphological characteristics were observed for *Bacillus* species. Amylase producing colonies were selected by flooding the media II plates with iodine solution.

### 2.2. Enzyme production medium

The enzyme production was carried out in the basal medium of the following composition (%): 0.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 NaCl, 0.2 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.005 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.005 CaCl<sub>2</sub>, 0.2 tryptone, and one waste potato starch powder. The initial pH of the medium was adjusted to 7.0 unless otherwise mentioned. The basal medium was sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min. Erlenmeyer flasks (500 ml) containing 100 ml of culture medium were inoculated with 1 ml of an overnight culture and incubated at 40 °C (except temperature optimization experiment) in a rotary shaker at 150 rpm for 144 h. At regular interval (12 h), the triplicate samples were harvested and the cells were separated by centrifugation (10,000 × g 20 min) at 4 °C in a refrigerated centrifuge (EYLA-2001 Japan). The supernatant was used for enzyme assay and characterization studies.

### 2.3. Optimization of medium and culture conditions

Initially, the organism was grown in the liquid medium for 24–96 h at pH 7.0 and 40 °C and then, supplemented with calcium (10 mM), yeast extract (0.5%), and glucose (0.5%) to study the effect of these nutrients on growth and enzyme production by *B. subtilis* JS-2004. The effect of varying pH values (5–10) and temperatures (30–70 °C) on  $\alpha$ -amylase production by the bacterium was also investigated.

### 2.4. $\alpha$ -Amylase assay

The activity of  $\alpha$ -amylase was assayed by incubating 0.5 ml enzyme with 0.5 ml soluble starch (1%, w/v) prepared in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0). After incubation at 37 °C for 60 min the reaction was stopped by the addition of 2 ml of 3-5-dinitrosalicylic acid reagent (Bernfeld, 1955) and absorbance was measured in a UV/Vis spectrophotometer (Hitachi). One unit (U) is defined as the amount of enzyme which releases 1  $\mu$ mol of reducing end groups per minute in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) with 0.5% (w/v) soluble starch as substrate at 37 °C.

### 2.5. Effect of pH on enzyme activity and stability

The pH optimum of the enzyme was determined by varying the pH of the assay reaction mixture using the following buffers (0.1 M): sodium acetate (pH 5.0–5.5), sodium phosphate (pH 6.0–7.0), Tris–HCl (pH 7.5–8) and glycine–NaOH buffer (pH 9–10). To determine the stability of  $\alpha$ -amylase, the enzyme was pre-incubated in different buffers (pH 5–10) for 60 min. The residual enzyme activity was determined as described earlier.

### 2.6. Effect of temperature on enzyme activity and stability

The temperature optimum of the enzyme was evaluated by measuring the  $\alpha$ -amylase activity at different temperatures (40–100 °C) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0). The effect of temperature on amylase stability was determined by measuring the residual activity after 1 and 24 h of pre-incubation in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0), at temperatures ranging from 40 to 100 °C.

### 2.7. Effect of metal ions on enzyme activity

For determining the effect of metal ions on amylase activity, enzyme assay was performed after pre-incubation, at 60 °C (optimum) for 60 min, of the enzyme with various metal ions each at a concentration of 2 mM. The enzyme assay was carried out in the presence of CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, HgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, and CuSO<sub>4</sub>.

## $\alpha$ -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate

Gobinath Rajagopalan, Chandraraj Krishnan \*

Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Madras, Chennai 600 036, India

Received 6 March 2007; received in revised form 1 June 2007; accepted 1 June 2007

Available online 17 July 2007

### Abstract

A catabolite derepressed *Bacillus subtilis* strain KCC103 was used to produce  $\alpha$ -amylase in medium containing sugarcane bagasse hydrolysate (SBH). Addition of SBH (1% reducing sugar (w/v)) to the nutrient medium supported maximum  $\alpha$ -amylase production of  $67.4 \text{ U ml}^{-1}$ . HPLC analysis of SBH showed the presence of glucose, xylose and arabinose in the ratio of 0.9:1.0:0.16 (w/w/w). In SBH-medium glucose and xylose were consumed completely while arabinose remained unutilized. Uptake rate of glucose was 2-folds higher than xylose but rate of  $\alpha$ -amylase production with xylose was 1.5-folds higher than glucose. Arabinose had no effect on growth and  $\alpha$ -amylase synthesis. Further,  $\alpha$ -amylase production in SBH-medium was enhanced to  $144.5 \text{ U ml}^{-1}$  (2.2-fold) by response surface methodology where the levels of SBH, and other media components were varied. The modified medium consisted of (in  $\text{g l}^{-1}$ ) SBH: 24; peptone: 17.43; yeast extract: 1.32 and beef extract: 1.82. High level of SBH showed no significant inhibition of  $\alpha$ -amylase synthesis. The derepressed strain KCC103 is useful to produce  $\alpha$ -amylase economically in short time (30–36 h).

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:**  $\alpha$ -Amylase; *Bacillus subtilis*; Sugarcane bagasse hydrolysate; Catabolite repression; Response surface methodology

### 1. Introduction

$\alpha$ -Amylases (EC 3.2.1.1, 1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolyase) hydrolyse starch to a range of products such as glucose and maltose or specific malto-oligosaccharide or mixed malto-oligosaccharides (Hashim et al., 2005; Messaoud et al., 2004; Takasaki, 1983; Dey et al., 2002). They are employed in industries for different purposes; glucose and maltose-forming  $\alpha$ -amylases in alcohol fermentation and sugar syrup formulation, and malto-oligosaccharide-forming  $\alpha$ -amylases in food processing (Kirk et al., 2002; Palacios et al., 2004). Amylases also play a significant role in starch, detergent, beverage and textile industries and its commercial production from microorganisms represent 25–33% of the world enzyme market (Nguyen et al., 2002). Industrial production of enzymes can be made eco-

nomical by utilizing low cost substrates such as agricultural byproducts in the production medium. In recent years, there has been an increasing effort on efficient utilization of sugarcane bagasse which is one of the largest cellulosic agro-industrial byproducts (Pandey et al., 2000). Sugarcane bagasse can be used as a raw fiber in solid state fermentation or acid hydrolysed simple sugars in submerged fermentation (Correa and Tengerdy, 1998; Dhillon et al., 2000; Pandey et al., 2000; Pessoa et al., 1997). The hydrolysate of sugarcane bagasse has been employed as a carbon source for enzyme production and fermentation processes such as ethanol production (Pandey et al., 2000; Roberto et al., 1991). There are several reports on the production of lignocellulose degrading enzymes such as cellulase, xylanase and laccase from microorganisms utilising sugarcane bagasse (Aiello et al., 1996; Adsul et al., 2004; Arora and Gill, 2001).

*Bacillus* sp. is well known to produce  $\alpha$ -amylases in starch medium. A few reports describe the production of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. in media consisting of agro-byproducts

\* Corresponding author. Tel.: +91 44 22574111; fax: +91 44 22570509.  
E-mail address: [kcr@iitm.ac.in](mailto:kcr@iitm.ac.in) (C. Krishnan).

such as wheat bran, cheese whey and rice husk in SSF (Babu and Satyanarayana, 1995; Baysal et al., 2003; Sodhi et al., 2005). So far there is no report on the utilization of sugarcane bagasse hydrolysate for the production of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. in submerged or solid state fermentation. This is due to the sensitivity of the strains to catabolite repression of  $\alpha$ -amylase synthesis by the presence of glucose and readily metabolizable monosaccharides in the production medium. These sugars inhibit  $\alpha$ -amylase synthesis at transcription level (Dahl, 2002). Recently we have reported a *Bacillus subtilis* strain KCC103 that is not subject to catabolite repression by glucose during  $\alpha$ -amylase synthesis and this enzyme is capable of forming malto-oligosaccharides (Dillirani et al., 2006). Here, the production of  $\alpha$ -amylase from *B. subtilis* strain KCC103 in culture medium containing SBH is described, which is the first report of this kind on  $\alpha$ -amylase production. Since *B. subtilis* is not pathogenic and generally regarded as safe in industrial processes this study would be helpful for economical production of  $\alpha$ -amylase in large scale by utilizing low cost lignocellulosic biomass as carbon source.

## 2. Methods

### 2.1. Microorganism and $\alpha$ -amylase production

*B. subtilis* KCC103 earlier isolated in our laboratory was used for production of  $\alpha$ -amylase (Dillirani et al., 2006). The seed culture was prepared by transferring a loop-full of cells from single colony grown on nutrient agar plate into 5 ml of nutrient medium (pH 6.5) containing (in g l<sup>-1</sup>): peptone (3.0), beef extract (1.5), yeast extract (1.5) and NaCl (2.5) and incubated at 37 °C with agitation (200 rpm) for 18 h. A 0.5 ml of the seed culture was transferred into 50 ml nutrient medium supplemented with appropriate sugars and incubated under similar conditions (37 °C and 200 rpm). Cells were removed by centrifugation (4 °C, 10,000 rpm and 10 min) and the  $\alpha$ -amylase activity in the supernatant was measured.

### 2.2. Enzyme assay

The reaction mixture consisting of 0.5 ml of soluble starch (1% (w/v)) solution made in 50 mM phosphate buffer (pH 6) and 50  $\mu$ l of appropriately diluted cell-free culture-supernatant was incubated at 50 °C for 10 min. The reducing sugar formed in the reaction was measured by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method using glucose as the standard (Miller, 1959). One unit of  $\alpha$ -amylase is defined as the amount of enzyme required to produce 1  $\mu$ mol of reducing equivalents per minute from soluble starch under the assay conditions.

### 2.3. Sugarcane bagasse hydrolysate preparation

A 20 g of sugarcane bagasse was washed with distilled water, oven dried at 60 °C, crushed to small particles in a

ball mill and suspended in 200 ml of dilute sulfuric acid (conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluted to 400-fold) and the mixture was autoclaved for 30 min (Roberto et al., 1991). The solid particles were removed by filtration using Whatman No. 1 filter paper and the pH of the filtrate was adjusted to 7.0 with 1 N NaOH.

### 2.4. High performance liquid chromatography (HPLC)

Sugars present in the hydrolysate were identified by HPLC with aminex HPX-87H ion exclusion column (300 mm  $\times$  7.8 mm; Agilent, USA) at 65 °C using 5 mM sulfuric acid as mobile phase at a flow rate of 0.6 ml min<sup>-1</sup> and the products were detected using refractive index detector maintained at 50 °C. Authentic chromatographic grade glucose, xylose and arabinose (Sigma) were used as standards for identification and quantification of the sugars in the hydrolysate.

### 2.5. Response surface methodology (RSM)

The experimental design was a 2<sup>4</sup> full factorial central composite rotatable experimental plan with four medium constituents, i.e. SBH, peptone, yeast extract and beef extract. The experimental plan consisted of 30 trials including six centre points, and the value of the dependent response was the mean of three independent experiments. The response variable obtained using RSM was fitted to the second order polynomial equation

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

where  $Y_i$  is the predicted response,  $x_i, x_j$  are input variables which influence the response variable  $Y$ ;  $\beta_0$  is the offset term;  $\beta_i$  is the  $i$ th linear coefficient;  $\beta_{ii}$  is the  $i$ th quadratic coefficient and  $\beta_{ij}$  is the  $ij$ th interaction coefficient.

The second order polynomial coefficients were calculated and analyzed using the 'Design Expert' (Version 6.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) statistical software package. Statistical analysis of the model was performed by the analysis of variance (ANOVA).

## 3. Results

### 3.1. $\alpha$ -Amylase synthesis in SBH medium

When the strain was cultured in SBH (1% reducing sugar (w/v)) medium the maximum growth was at 12 h. Production of  $\alpha$ -amylase was parallel with growth and maximum level of 68.8 U ml<sup>-1</sup> was obtained at 30 h (Table 1). Total reducing sugars were consumed gradually and at 48 h of growth 7% of reducing sugar was left unutilized. When the growth time was extended to 72 h there was no complete consumption of sugars. Separation of sugars present in the SBH by HPLC showed glucose, xylose and arabinose in the ratio of 0.9:1:0.2 (w/w/w), respectively. Kinetics of decrease in the amount of each of these sugars during growth showed

## Research Article

# Purification and Characterization of Novel $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS

Saeeda Bano,<sup>1</sup> Shah Ali Ul Qader,<sup>2,3</sup> Afsheen Aman,<sup>2</sup> Muhammad Noman Syed,<sup>1</sup> and Abid Azhar<sup>2</sup>

Received 29 June 2010; accepted 29 December 2010; published online 14 January 2011

**Abstract.** Purification of extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS was carried out by ultrafiltration, ammonium sulfate precipitation and gel filtration chromatography. The enzyme was purified to homogeneity with 96.3-fold purification with specific activity of 13011 U/mg. The molecular weight of purified  $\alpha$ -amylase was found to be 56,000 Da by SDS-PAGE. Characteristics of extracellular  $\alpha$ -amylase showed that the enzyme had a Km and  $V_{max}$  value of 2.68 mg/ml and 1773 U/ml, respectively. The optimum activity was observed at pH 7.5 in 0.1 M phosphate buffer at 50°C. The amino acid composition of the enzyme showed that the enzyme is rich in neutral/non polar amino acids and less in acidic/polar and basic amino acids. The N-terminal protein sequence of 10 residues was found to be as Ser-Ser-Asn-Lys-Leu-Thr-Thr-Ser-Trp-Gly (S-S-N-K-L-T-T-S-W-G). Furthermore, the protein was not N-terminally blocked. The sequence of  $\alpha$ -amylase from *B. subtilis* KIBGE HAS was a novel sequence and showed no homology to other reported  $\alpha$ -amylases from *Bacillus* strain.

**KEY WORDS:** amino acids;  $\alpha$ -amylase; *Bacillus subtilis*; purification; sequencing.

## INTRODUCTION

Alpha amylases (endo-1, 4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolase EC 3.2.1.1) are extracellular endoenzymes that randomly cleave  $\alpha$ -1,4 linkages between adjacent glucose units in the linear amylose chain and ultimately generate glucose, maltose, and maltotriose units. This class of industrial enzymes constitutes approximately 25% of the enzyme market. Conversion of starch into sugar syrups (glucose, maltose, maltotriose, dextrins sugar, or fructose syrups, etc.) are the major part of the starch processing industry. In addition,  $\alpha$ -amylase have many applications in textile, paper, brewing, baking, distilling industries, preparation of digestive aids, production of cakes, and pharmaceuticals (1–3). Alpha amylases have been isolated from different sources. However, enzymes from fungal and bacterial sources have dominated applications in industrial sectors, due to advantages such as cost effectiveness, less time and space requirement and ease of process modification and optimization (4,5).

Previously,  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS been partially purified and effects of temperature, metal ions and surfactant on  $\alpha$ -amylase activity has been investigated and enzyme showed high stability with various

surfactants and detergents (6). The enzyme also showed relatively high thermostability and retained 62% of its activity when kept at 70°C for 15 min. Alpha amylase is highly stable at -18°C in 124 days of storage stability study (6).

In the present study, a novel  $\alpha$ -amylase was purified from *B. subtilis* KIBGE HAS and its catalytic and molecular properties were characterized.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganism and Culture Conditions

*B. subtilis* KIBGE HAS been grown in liquid medium containing (g l<sup>-1</sup>): starch, 20.0; bacto-peptone, 10.0; yeast extract, 4.0; NaCl, 0.5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2. The pH of the medium was adjusted to 7.0 before autoclaving. The 100.0 ml of inoculum was transferred into 900.0 ml of sterile starch broth medium and incubated for 35°C for 24 h. After 24 h incubation, culture broth was centrifuged (35,000×g for 10 min) at 0°C to remove the cell and supernatant was stored at -20°C, which used for further studies.

### Enzyme Assay and Total Protein Determination

The activity of  $\alpha$ -amylase was assayed by incubating 0.1 ml enzyme with 1.0 ml soluble starch (1.0 w/v) prepared in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5. After incubation at 50°C for 5 min, the reaction was stopped and the reducing sugars released were determined by the

<sup>1</sup> Pharmaceutical Research Center, PCSIR Laboratories Complex, Karachi, Pakistan.

<sup>2</sup> The Karachi Institute of Biotechnology and Genetic Engineering (KIBGE), University of Karachi, Karachi, 75270, Pakistan.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. (e-mail: madar\_chem@yahoo.com)



## Enhanced amylase production by a *Bacillus subtilis* strain under blue light-emitting diodes

Punniyakotti Elumalai<sup>a</sup>, Jeong-Muk Lim<sup>a</sup>, Yool-Jin Park<sup>b</sup>, Min Cho<sup>a</sup>, Patrick J. Shea<sup>c</sup>, and Byung-Taek Oh<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Division of Biotechnology, Advanced Institute of Environment and Bioscience, College of Environmental and Bioresource Sciences, Chonbuk National University, Iksan, South Korea; <sup>b</sup>Department of Ecology Landscape Architecture-Design, College of Environmental and Bioresource Sciences, Chonbuk National University, Iksan, South Korea; <sup>c</sup>School of Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska, USA

### ABSTRACT

A chemotrophic, aerobic bacterial strain, *Bacillus subtilis* B2, was used to produce amylase by submerged fermentation under different light sources. SDS-PAGE indicated that the 55 kDa enzyme belonged to the  $\alpha$ -amylase group. B2 was incubated in basal media with 1% soluble starch (pH 7.0) under blue, green, red, and white light-emitting diodes (LEDs), and white fluorescent light. Fermentation under blue LEDs maximized amylase production ( $180.59 \pm 1.6$  U/mL at 24 h). Production at 48 h increased to  $310.56 \pm 1.6$  U/mL with 5% glucose as a simple carbon source and to  $300.51 \pm 1.7$  U/mL with 5% groundnut oil cake as an agricultural waste substrate. Activity and stability of the amylase were greatest at pH 7.0 and 45–55 °C.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $\text{K}^+$  increased activity, while  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  inhibited activity. EDTA, PMSF and DTNB reduced activity by 50% or more, while tetrafluoroethylene and 1,10-phenanthroline reduced activity by 30%. The amylase was highly tolerant of the surfactants, compatible with organic solvents, oxidizing agents and the reducing agents reduced activity. These properties suggest utility of amylase produced by *B. subtilis* B2 under blue LED-mediated fermentation for industrial applications.

### KEYWORDS

Amylase; blue LEDs; *B. subtilis*; metal ions; photoreceptor; surfactant



### Introduction

Amylase hydrolyzes  $\alpha$ -1,4-glycosidic bonds of starch, glycogen and numerous related polysaccharides to form a simple sugar (glucose and maltose) in an  $\alpha$ -anomeric form.<sup>[1–3]</sup> Amylase is one of the most important industrial enzymes and accounts for about 30% of world enzyme production.<sup>[1,3]</sup> Amylase has a wide variety of applications, such as dairy, soft drinks, chocolates, pharmaceuticals, food processing, leather, textile, paper, and wine production.<sup>[4]</sup> Amylase produced by *Bacillus* bacteria play a vital role in industrial applications.<sup>[5]</sup> Among the numerous species of *Bacillus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, and *B. subtilis* are used most frequently in the production of amylase.<sup>[6–8]</sup> Culture and fermentation conditions are critical for maximum production, as enzyme production is affected by physicochemical factors such as substrate, pH, carbon and nitrogen sources, agitation rate, incubation time, and temperature.<sup>[5,9]</sup> Submerged fermentation gives higher yields of proteases and amylases.<sup>[10]</sup> Advantages of microbial amylases are their high yield, stability, specificity, and cost-effectiveness.<sup>[11]</sup> Amylase-dependent reactions can be carried out under extreme environments such as low or


high pH and temperature and in the presence of solvents and oxidizing agents.<sup>[12]</sup>

Light is important for maximum enzyme production; it governs propagation and growth of bacteria, metabolic activity and metabolite production, and functions through photoreceptors.<sup>[13,14]</sup> Classes of photoreceptors include cryptochrome, blue light sensing using flavin adenine dinucleotide (BLUF), light oxygen voltage (LOV), photoactive yellow protein (PYP), rhodopsin, and phytochrome. The non-phototrophic bacteria *Bacillus subtilis*, *Deinococcus radiodurans*, and *Pseudomonas aeruginosa* can sense light by the LOV photoreceptor and the BLUF blue-light sensing photoreceptor has been reported and characterized in *B. subtilis*.<sup>[15,16]</sup> BLUF and LOV are involved in the electron transfer mechanism.<sup>[17]</sup> BLUF is a positive regulator and stress transcription factor.<sup>[16]</sup> In sensing blue light, BLUF regulates and enhances pigment production, fruiting body formation, and encodes proteins with numerous conserved LOV domains.<sup>[13]</sup>

Numerous forms of light have been investigated in biological studies, including sunlight, white fluorescent light, darkness, ultraviolet light (UV), and light-emitting diodes (LEDs) of distinct colors (different wavelengths). LEDs are

CONTACT Byung-Taek Oh  btoh@jbnu.ac.kr;  Soil Environmental Remediation Lab, Division of Biotechnology, College of Environmental and Bioresource Sciences, Chonbuk National University Iksan, Jeonbuk, 570-752, South Korea.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at [www.tandfonline.com/lpbb](http://www.tandfonline.com/lpbb)

 Supplemental data for this article can be accessed online at <http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2018.1550656>.

© 2019 Taylor & Francis

an ultra-bright light source, with nominal heat release and low energy consumption compared to other light sources.<sup>[18]</sup> LEDs can be constructed to emit very high light fluxes, high light intensities, and have a long lifetime.<sup>[19,20]</sup> The color of light emitted by LEDs depends on the properties of semiconductor material.<sup>[20]</sup> Oh et al.<sup>[21]</sup> found that LEDs increased total phenol, flavonoid and reducing sugar production during fermentation with *Lactobacillus brevis* and *Bacillus amyloliquefaciens*.

This study investigates amylase production by a *B. subtilis* strain (B2) in submerged fermentation under blue, green, red, and white LED lights (blue, green, red, and white), white fluorescent light and darkness under different pH and temperature, and in the presence of metal ions, inhibitors, reducing agents, oxidizing agents, and surfactants. The amylase was partially purified, characterized by SDS-PAGE, and activity, substrate specificity, and stability were determined.

## Materials and methods

### Bacteria and reagents

A *Bacillus subtilis* strain (B2; Accession number: MH027419) was previously isolated from freshwater shrimp seafood. It is gram positive, motile, facultative, and can be grown using different carbon sources.<sup>[22]</sup> The bacterium was screened for amylase production using rice starch agar plates and the zone of clearance indicated amylase activity. The bacterial culture was maintained at 4 °C for use in subsequent experiments.

Luria-Bertani (LB) medium was purchased from Difco Laboratories (Becton, Dickinson and Co., USA) and 3,5-dinitrosalicylic acid from Sigma-Aldrich Co. (USA). Soluble starch, other chemicals and solvents were purchased from Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd (Korea). LEDs were purchased from HM Trade Co. (Korea).

### Enzyme production and fermentation conditions

For amylase enzyme production, the media of Paul et al.<sup>[23]</sup> was used (g/l): 5 g soluble starch, 5 g yeast extract, 0.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>, and 5 g peptone in a 500 mL Erlenmeyer flask. After adjusting pH to 7.0 with HCl or NaOH, the media was autoclaved at 121 °C for 30 min and inoculated with the *B. subtilis* B2 strain (0.5% v/v). Flasks were incubated overnight in a box on a rotatory shaker at 37 °C and 150 rpm under different light conditions (150 μmol/m<sup>2</sup>/s): white fluorescent light (400 nm); darkness (360 nm); blue LEDs (460–490 nm); red LEDs (620–645 nm); green LEDs (520–550 nm); and white LEDs (380–780 nm). The box contained LED chambers and a temperature controller with a 12 V power supply. Amylase activity was measured at 4, 8, 12, 16, 20, and 24 h. The best light system (blue LEDs) was used to further enhance amylase production by varying the simple carbon source (5.0 g sucrose, maltose, glucose, and soluble starch/L) and agricultural waste substrate (5.0 g wheat bran, ground oil cake and coconut oil cake/L) during incubation at 37 °C and 150 rpm. A pH of 7

was maintained during fermentation. Amylase activity was measured at 24, 48, 72, and 96 h.

### Extraction and partial purification of amylase

The crude enzyme was extracted from the fermentation medium by centrifuging at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C and precipitated with ammonium sulfate (80% saturation). The precipitate was dissolved in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) and dialyzed overnight against 1 L of the same buffer at 4 °C using a dialysis membrane with a 10-kDa cutoff.<sup>[23]</sup>

### SDS-PAGE analysis

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to identify the partially purified enzyme by molecular weight. This included 10% running gel buffered at pH 8.8 with 1.5 M Tris-HCl, stacking gel buffered at pH 6.8 with 0.5 M Tris-HCl, and staining with Coomassie Brilliant Blue.<sup>[23]</sup> The protein bands of the enzyme produced by *B. subtilis* B2 were visualized and molecular weight (kDa) determined by comparison with standard commercial *B. subtilis* α-amylase obtained from Sigma Aldrich (Product code 102017642).

### Amylase assay

Amylase was assayed using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method through the release of reducing sugar. Partially purified amylase (0.2 mL) was mixed with 1 mL of 1% soluble starch, incubated for 30 min at 37 °C, and 1 mL of DNS was added. The reaction mixture was placed in a 100 °C water bath for 10 min; the solution turned brown when the reaction was completed. Absorbance was measured at 540 nm with maltose as the standard. One unit (U) of amylase is defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 μmol substrate/min, measured as liberated reducing sugar (maltose).<sup>[23]</sup>

### Effect of pH and temperature on amylase activity and stability

The effect of pH on the activity of amylase produced by *B. subtilis* B2 was determined by incubating the partially purified enzyme with 1% soluble starch at pH 2.0–10.0 and 37 °C using 0.1 M buffer at the desired pH (glycine-HCl pH 2.0–3.0, sodium acetate pH 3.5–5.5, sodium phosphate pH 6.0–7.5, Tris-HCl pH 8.0–9.5, and glycine-NaOH pH 10.0). The effect of temperature on activity was similarly evaluated by incubating the enzyme with 1% soluble starch for 1 h at 25, 35, 45, 55, and 85 °C at pH 7.0.<sup>[12]</sup> Stability to pH was determined by incubating the enzyme with each pH buffer in the absence of substrate for 1 h at 37 °C, then assaying for activity in a standard reaction with 1% soluble starch. Stability to temperature was similarly determined by incubation at different temperatures in the absence of substrate for 1 h at pH 7.0, then assaying for activity in a standard reaction with 1% soluble starch. Stability was based on relative