

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

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

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

«__» _____ червня _____ 2025 р.

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

«__» _____ червня _____ 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова,
харчова, природоохоронна»
на тему: Одержання β -амілази культивуванням *Bacillus polymyxa* BWB 01

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

МОСКАЛЕНКО Руслана Олександрівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ БУЦЕНКО Людмила Миколаївна _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Олена ГУДЗЕНКО _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“01” березня 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МОСКАЛЕНКО Руслані Олександрівні

1. Тема роботи Одержання β -амілази культивуванням *Vacillus polymyxa* BWB 01
керівник роботи БУЦЕНКО Л.М. д.б.н. доц.,

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-к

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи Продукт: β -амілаза. Продуцент: *Vacillus polymyxa* BWB 01. Ферментер об'ємом 1м³. Аеробне культивування

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика β -амілази. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. Техніко-економічне обґрунтування. Біосинтез β -амілази. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Специфікація обладнання. Опис технологічної схеми біосинтезу β -амілази. Контроль виробництва β -амілази.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема - 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика β -амілази	01.03.2024 – 09.03.2024	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	09.03.2024 – 15.03.2024	
3	Техніко-економічне обґрунтування	16.03.2024 – 22.03.2024	
4	Біосинтез β -амілази <i>Bacillus polymyxa</i> BWB 01	23.03.2024 – 29.03.2024	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.04.2024 – 13.04.2024	
6	Специфікація обладнання	14.04.2024 – 19.04.2024	
7	Опис технологічної схеми біосинтезу β -амілази	20.04.2024 – 28.04.2024	
8	Основні етапи виділення та очищення β -амілази	29.04.2024 – 12.05.2024	
9	Контроль виробництва β -амілази	13.04.2024 – 17.05.2024	
10	Графічна частина	18.05.24 – 24.05.2024	
11	Оформлення роботи	25.05.2024 – 28.05.2024	

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Руслана МОСКАЛЕНКО

(ім'я та прізвище)

Людмила БУЦЕНКО

(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the study of the peculiarities of β -amylase enzyme biosynthesis using the productive strain of *Bacillus polymyxa* BWB-01. Given the growing demand for enzyme preparations for the food and pharmaceutical industries, special attention is paid to the development of an effective technology for cultivating the producer microorganism and the justification of the choice of culture medium.

As part of the work, the technological and hardware schemes of the fermentation process were designed, which includes the sequential cultivation of the inoculum, the main cultivation in a 1 m³ fermenter, and the stages of auxiliary operations such as air preparation, sterilisation of nutrient components, and control of medium parameters. To avoid excessive foaming, a mechanical defoamer was used in the fermenter to maintain stable aerobic cultivation conditions.

The work presents material calculations of production, taking into account the annual demand for culture liquid and the consumption of auxiliary products.

The qualification work contains an introduction, a theoretical part, sections on technological design, economic feasibility, selection of disinfectants and detergents, and microbiological control, among other things. The graphic part includes technological and hardware diagrams. The total volume of the work is 98 pages, including 14 tables, 8 figures and a list of references from 89 sources.

Key words: *Bacillus polymyxa* BWB-01, β -amylase, biosynthesis, culture liquid, aerobic cultivation, enzyme activity.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена вивченню особливостей біосинтезу ферменту β -амілази з використанням продуктивного штаму *Bacillus polymyxa* BWB-01. Враховуючи зростаючу потребу у ферментних препаратах для харчової та фармацевтичної промисловості, особливу увагу приділено розробці ефективної технології культивування мікроорганізму-продуцента та обґрунтуванню вибору поживного середовища.

У межах роботи спроектовано технологічну й апаратурну схеми ферментаційного процесу, який включає послідовне вирощування інокуляту, основне культивування у ферментері об'ємом 1 м³ та стадії допоміжних операцій- підготовку повітря, стерилізацію живильних компонентів, контроль параметрів середовища. Для уникнення надмірного піноутворення у ферментері застосовано механічний піногасник, що дозволяє підтримувати стабільні аеробні умови культивування.

У роботі представлено матеріальні розрахунки виробництва, з урахуванням річної потреби в культуральній рідині та витрат допоміжних засобів.

Кваліфікаційна робота містить вступ, теоретичну частину, розділи з технологічного проектування, економічного обґрунтування, вибору дезінфікуючих та мийних засобів, мікробіологічного контролю зокрема. Графічна частина включає технологічну й апаратурну схеми. Загальний обсяг роботи- 98 сторінок, включає 14 таблиць, 8 рисунків та список літератури з 89 джерел.

Ключові слова: *Bacillus polymyxa* BWB-01, β -амілаза, біосинтез, культуральна рідина, аеробне культивування, ферментна активність.

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. Характеристика β -амілази	10
1.1. Органолептичні показники	10
1.2. Фізико-хімічні властивості	10
1.3. Механізм дії β -амілази.....	11
1.4. Синтез β -амілази	11
1.5. Сфери застосування	12
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	18
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	19
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	21
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	22
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	22
3.2. Розрахунок потужності виробництва	24
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	27
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	28
РОЗДІЛ 4. Біосинтез β -амілази <i>Bacillus polymyxa</i> BWB 01	32
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	32
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	34
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	38
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	38

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	39
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	41
5.4. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів	54
5.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	62
5.5.1. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці	62
5.5.2. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	64
5.5.3. Підготовка і стерилізація поживного середовища для виробничого культивування у ферментері на 1 м ³	65
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	67
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми біосинтезу β-амілази	71
РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення β-амілази	78
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва β-амілази	82
9.1. Мікробіологічний контроль	82
9.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища	82
9.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури	83
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	84
9.2.1. Концентрація біомаси.....	84
9.2.2. Активність цільового продукту	84
9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	85
ЛІТЕРАТУРА	88

ВСТУП

β -амілаза- це важливий фермент, який гідролізує крохмаль, в результаті чого утворюється 54- 58% мальтози і 42- 46% насиченого декстрину, тобто нерозщеплених фрагментів амілопектину. Саме тому вона використовується в багатьох галузях промисловості: харчова, текстильна, паперова, сільськогосподарська, фармацевтична, беручи участь у виготовленні таких продуктів, як хліб, мальтозний сироп, пиво, соки, папір тощо. Найбільше β -амілаза використовується у хлібопекарстві для покращення консистенції тіста [3, 12].

Актуальність

На сьогоднішній день актуальним є пошук нових високопродуктивних продуцентів β -амілази, здатних забезпечувати високі рівні активності ферменту за мінімальних витрат на живильне середовище. Це обумовлено підвищенням вимог до ефективності ферментних препаратів у різних галузях промисловості. Одним із перспективних продуцентів є штам *Bacillus polymyxa* BWB-01, який продукує β -амілазу з високою активністю (75,88 од/мл) при порівняно низькій вартості середовища культивування. [26]

В Україні потреба у β -амілазі частково забезпечується власним виробництвом, зокрема на ТОВ «Ензим» (м. Ладизин), де щорічно виробляють близько 20–30 тонн ферменту. [34] Проте існуючі обсяги не завжди повністю задовольняють внутрішній попит, особливо у контексті розвитку малих крафтових пекарень.

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		<i>Москаленко Р.О.</i>			Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		<i>Буценко Л.М.</i>					8	98
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						
						Кафедра БТМ		

Так, для виробництва хлібобулочних виробів потреба ферменту лише для обслуговування малої крафтової пекарні становить близько 2,34 кг β -амілази на рік, що відповідає обсягу виробництва хлібу близько 1500 кг на рік. З огляду на це, зростає актуальність збільшення обсягів виробництва β -амілази для забезпечення потреб крафтової пекарні.

За даними Державної служби статистики України, обсяги виробництва хлібу та хлібобулочних виробів у країні з 2016 по 2020 рік скоротилися на 66,7%, з 1,2 млн тонн у 2016 році до 0,8 млн тонн у 2020 році. Оскільки хлібопекарська промисловість залишається стратегічною для харчової галузі, підвищення якості хлібу за допомогою застосування β -амілази є одним із шляхів підтримки її розвитку. [28]

Застосування β -амілази дозволяє суттєво покращити якість хлібу: збільшити об'єм виробів, покращити структуру м'якушки та подовжити термін зберігання. [3, 29] З огляду на спад виробництва хлібобулочних виробів, актуальними є дослідження, присвячені удосконаленню технологій виробництва ферменту β -амілази.

Новизна курсового проєкту полягає у використанні високопродуктивного штаму *Bacillus polymyxa* BWB-01 для біосинтезу β -амілази з високою активністю, а також у розробці вдосконалених технологічної та апаратурної схем для ефективного виробництва ферментного препарату.

РОЗДІЛ 1. Характеристика β -амілази

β -амілаза є ферментом, що широко використовується у промисловості для гідролізу крохмалю до мальтози. У технологічному процесі як кінцевий продукт розглядається ферментний препарат β -амілази, який може бути випущений у вигляді рідкої або порошкоподібної форми.

1.1. Органолептичні показники

Ферментний препарат β -амілази є водорозчинною речовиною. У промисловості випускається у вигляді:

- 1) рідкої форми- прозорої або злегка мутнуватої рідини, без характерного запаху;
- 2) порошкоподібної форми- білого або світло-бежевого кольору, без запаху. [2]

1.2. Фізико-хімічні властивості

Формула β -амілази- $C_6H_{15}C_1N_4O_2$.

Бета-амілаза (1,4- α -D-глюканмальтогідролаза; ЕС 3.2.1.2) каталізує гідроліз α -1,4-глікозидних зв'язків крохмалю з утворенням мальтози як основного продукту. [5]

Для β -амілази характерні такі фізико-хімічні властивості:

- молекулярна маса: варіюється залежно від походження і становить приблизно 55–65 кДа;
- оптимум рН дії: 5,4–6,0, у деяких випадках активність зберігається до рН 8,0;
- оптимальна температура дії: 50–60 °С.

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Москаленко Р.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.				10	98
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Активність препарату: залежить від виробника і штаму-продуцента; наприклад, для ферменту з *Bacillus polymyxa* активність може досягати 75,88 од/мл. [26]

β -амілаза може бути виділена з таких продуцентів: *Bacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*. [26, 30-33] Перелік шляхів отримання даного ферменту: з рослинної сировини чи біотехнологічним шляхом (найдешевший та найкращий варіант).

1.3. Механізм дії β -амілази

β -амілаза здійснює гідроліз α -1,4-глікозидних зв'язків у молекулах амілози, амілопектину та амілодекстринів, послідовно відщеплюючи молекули мальтози з нередукуючого кінця ланцюга, пропускаючи кожен другий зв'язок. Фермент не здатен розщеплювати α -1,6-зв'язки, тому його дія припиняється поблизу точок галуження — зазвичай за 2–3 залишки глюкози до них. Унаслідок цього амілоза піддається повному гідролізу до мальтози, тоді як при розщепленні амілопектину, окрім мальтози, залишаються β -насичені декстрини (так звані "кінцеві декстрини"). За типового перебігу реакції гідролізу крохмалю під дією β -амілази утворюється близько 54–58% мальтози та 42–46% нерозщепленого амілопектину. [1, 34]

1.4. Синтез β -амілази

β -амілазу отримують з рослинної сировини шляхом осадження, хроматографії; біотехнологічними методами шляхом мікробіосинтезу, екстракції. Одержання з рослинної сировини даного ферменту є неефективним, дорогим та трудомістким процесом. Тому є тенденція на використання продуктів, отриманих біотехнологічним шляхом. Синтез β -амілази біотехнологічним шляхом можливий за допомогою об'ємного глибинного методу ферментації [11].

1.5. Сфери застосування

β -амілаза використовується в таких галузях промисловості як харчова, текстильна, паперова, сільськогосподарська.

У випіканні хліба разом із α -амілазою використовується для збільшення об'єму хліба, підрум'янення скоринки та посилення приємного смаку [3, 29].

Бере участь разом із глюкоамілазою у процесі виробництва мальтозного сиропу [5].

У пивоварінні даний фермент використовується для розщеплення крохмалю в солоді, що призводить до утворення цукрів, які потім зброджуються дріжджами для отримання пива.

У виробництві соків, солодких газованих напоїв використовується як підсолоджувач [1,10].

У текстилі використовується для видалення апрапету (крохмалю) з тканин перед обробкою та фарбуванням.

У виробництві паперу фермент використовується для деградації крохмалю в целюлозі, що покращує якість паперу, роблячи його більш міцним та непрозорим [11].

Амілази представляють одну з трьох найбільших груп промислових ферментів за продажами у всьому світі, так як вони мають велике значення в біотехнологічному застосуванні- харчові продукти, бродіння, а також текстильно-паперова промисловість тощо [6].

Завдяки своїм органолептичним, фізико-хімічним властивостям і широкому спектру застосування β -амілаза має значний попит на ринку і є перспективним об'єктом для подальшого вдосконалення технологічних процесів виробництва. У промисловості амілази посідають одне з провідних місць серед ферментних препаратів за обсягами світового продажу. [12]

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

α - і β -амілази особливо важливі для харчової промисловості. Так при пивоварінні під час бродіння дріжджі поглинають цукор і виділяють етанол. У пиві та деяких алкогольних напоях цукор, присутній на початку бродіння, утворюється шляхом «перетирання» зерна або інших джерел крохмалю (таких як картопля). У традиційному пивоварінні ячмінний солод змішують із гарячою водою, щоб створити «сусло», яке витримують при певній температурі, щоб дозволити амілазам у солодовому зерні перетворити ячмінний крохмаль на цукор. Різні температури оптимізують активність α - і β -амілази, в результаті чого утворюються різні суміші ферментованих і неферментованих цукрів. Вибираючи температуру затору та співвідношення зерно/вода, пивовар може змінити вміст алкоголю, смакові відчуття, аромат і смак готового пива. Такі ж властивості (смак, скоринка, м'якість) амілази дають і при випіканні хліба, що є досить гарним показником якості хліба та його смакових властивостей [36].

Тому для культивування мікроорганізмів потрібно визначити максимально комфортні умови для отримання найбільшої кількості цільового продукту- у нашому випадку β -амілази, яка є вторинним метаболітом [37].

Як видно на Таблиці 2.1 є порівняння умов культивування різних штамів мікроорганізмів що синтезують фермент β -амілазу.

Отримавши інформацію про продуцентів β -амілази, я підрахувала умовну вартість поживного середовища кожного агента (Табл. 2.2), узагальнивши інформацію про середовище вирощування мікроорганізмів.

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Москаленко Р.О.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					13	98
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Після отримання даних про культивування можна порівняти доцільність культивування продуцентів β -амілази. Як бачимо у Таблиці 2.3 було порівняно *Bacillus polymyxa* BWB-01, *Bacillus megaterium* B-32 та *Bacillus polymyxa* №72.

Зробивши розрахунок, можна зробити висновок, що культивування β -амілази, який має продуцента *Bacillus polymyxa* BWB-01, є більш економічно вигіднішим через його високу активність та низьку вартість.

Порівняльна характеристика продуцентів ферменту β -амілази

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Активність Од/мл	Умови культивування	Література
<i>Bacillus polymyxa</i> BWB-01	крохмаль розчинний – 5 г/л; солодовий екстракт- 5 г/л; NaCl- 3 г/л.	75,88	pH= 6,0, t= 40°C T= 48 годин	M. Olajuyigbe, F., & M. Adeniyi, F. (2015). Production, Purification and Partial characterization of moderately thermostable β -amylase from <i>Bacillus polymyxa</i> BWB-01. <i>Current Biotechnology</i> , 4(2), 187-196.
<i>Bacillus megaterium</i> B-32	розчинний крохмаль- 100 г/л; молочний казеїн- 50 г/л; кукурудзяний розчин – 20 г/л.	25,5	pH= 7,0, t= 30°C, T= 48 годин	Okada, S., & Higashibara, M. (1974). U.S. Patent No. 3,804,718. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
<i>Bacillus polymyxa</i> №72	розчинний крохмаль – 40 г/л; м'ясний екстракт – 10 г/л; пептон– 10 г/л; NaCl – 3 г/л.	45	t= 30°C, pH= 7,0 T= 100 години	Murao, S., Ohyama, K., & Arai, M. (1979). β -Amylases from <i>Bacillus polymyxa</i> No. 72. <i>Agricultural and Biological Chemistry</i> , 43(4), 719–726.

Умовна вартість поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus polymyxa</i> BWB-01	крохмаль розчинний	5	39	0,2	[38]
	солодовий екстракт	5	7,3	0,04	[39]
	NaCl	3	20	0,06	[40]
	Вартість 1 л середовища – 0,3 грн				
<i>Bacillus megaterium</i> B-32	крохмаль розчинний	100	39	3,9	[38]
	молочний казеїн	50	450	22,5	[39]
	кукурудзяний розчин	20	100	2	[41]
	Вартість 1 л середовища – 28,4 грн				
<i>Bacillus polymyxa</i> №72	крохмаль розчинний	40	39	1,56	[38]
	м'ясний екстракт	10	31 694,1	316,9	[42]
	пептон	10	145	1,45	[43]
	NaCl	3	20	0,06	[40]
	Вартість 1 л середовища – 320 грн				

Розрахункова вартість 1 г β -амілази

Біологічний агент	Концентрація ферменту г/л	Активність Од/мл	Тривалість культивування, год	Кількість утворених Од/год	стандартної активності має 1 грам ферменту	Вартість 1 л поживного середовища	Умовна вартість компонента (грн) на 1 л середовища
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Bacillus polymyxa</i> BWB-01	2	75,88	48	1,58	0.086	0,3	0,004
<i>Bacillus megaterium</i> B-32	2	25,5	48	0,53	0.086	28,4	1,114
<i>Bacillus polymyxa</i> №72	2	45	100	0,45	0.086	320	7,1

*автори статей не зазначають концентрацію ферменту, тому умовно можна прийняти стандартну концентрацію ферментів- 2 г/л

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Тривалість культивування- 48 год, концентрація β -амілази у культуральній рідині становить 2 г/л, концентрація біомаси не вказана.

У поживному середовищі *Bacillus poytuxa* BWB-01 міститься таке джерело карбону як крохмаль. Оскільки, вміст карбону в β -амілазі складає 50%, то розрахуємо скільки його міститься у 2 г ферменту: $2 * 0,5 = 1$ г.

Тепер розраховуємо у скількох грамах крохмалю міститься 1 г карбону. Молекулярна маса крохмалю становить 162. У 162 г крохмалю міститься 72 г карбону. Отже, 1 г карбону міститься у такій кількості крохмалю:

$$X = 1 * 162 / 72 = 2,25 \text{ г крохмалю}$$

При вирощуванні мікроорганізму на вуглеводах, в даному випадку крохмалі, близько 40% субстрату окиснюється для отримання енергії до CO_2 , тому вміст крохмалю у середовищі становить: $(2,25 * 0,4) + 2,25 = 3,2$ г/л

Розрахунок кількості Карбону для синтезу біомаси

Як відомо, у біомасі міститься 50% карбону. У зв'язку з тим, що у мене немає даних конкретно по моєму штаму про кількість біомаси, то можна порахувати приблизну концентрацію. Так як у поживному середовищі крохмалю 5 л, а для синтезу β -амілази необхідно 3,2 г/л, то кількість крохмалю для синтезу біомаси буде складати $5 - 3,2 = 1,8$ г/л. Отже, кількість карбону в даній концентрації крохмалю становить:

$$162 \text{ г крохмалю} - 72 \text{ г карбону}$$

$$1,8 \text{ г крохмалю} - X \text{ г карбону}$$

$$162X = 72 * 1,8$$

$$X = (72 * 1,8) / 162 = 0,8 \text{ г карбону}$$

На холосте окислення йде 40% субстрату, тому для отримання необхідної біомаси потрібно стільки крохмалю: $(0,8 * 0,4) + 0,8 = 1,12$ г/л

Загальний необхідний вміст крохмалю: $1,12 + 3,2 = 4,22$ г/л.

Вміст концентрації крохмалю в поживному середовищі становить 5 г/л, тому цього вистачить.

Як вже було зазначено, біомаса становить 50% карбону у своєму складі, тому можна припустити, що концентрація біомаси *Bacillus polymyxa* BWB-01 становить: $4,22 \times 2 = 8,44$ г/л.

Розрахунок кількості Нітрогену для синтезу біомаси

Клітина *Bacillus polymyxa* складається на 10% з Нітрогену, отже для її синтезу потрібно:

$$8,44 \text{ г} * 10\%/100\% = 0,844 \text{ грам Нітрогену}$$

У середовищі джерелом органічного азоту є солодовий екстракт у концентрації 5 г/л, тому в ньому міститься:

$$5 \text{ г} * 10\%/100\% = 0,5 \text{ грам Нітрогену}$$

Поживне середовище містить 0,5 грам Нітрогену, в той час як за розрахунками була визначена наявність 0,844 грам Нітрогену, що свідчить про наявність дефіциту вмісту Нітрогену. Проте за даними статті, яку покладено в основу роботи, саме на такому середовищі відбувався максимальний синтез β -амілази, тому склад середовища вирішено не змінювати.

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

Бактерії *Bacillus polymyxa* (також відомі як *Paenibacillus polymyxa*) - відносяться до грампозитивних мікроорганізмів. Рухливі за допомогою перитрихових джгутиків. Спори еліпсоїдні, центральні, субтермінальні або термінальні; спорангії набухають. Спори мають сильно ребристу поверхню. S-шар (позаклітинний полісахарид) присутній. Розмір клітин становить 2,0-5,0 x 0,6-0,8 мкм. Колонії на живильному агарі тонкі, часто з амебоїдним розростанням. На глюкозному агарі зазвичай скупчені, мукоїдні, з матовою поверхнею. Прилипають до агарового середовища. На агаризованих поживних середовищах формують безбарвні, плоскі або опуклі, гладенькі та слизові колонії з пилчастим краєм [48].

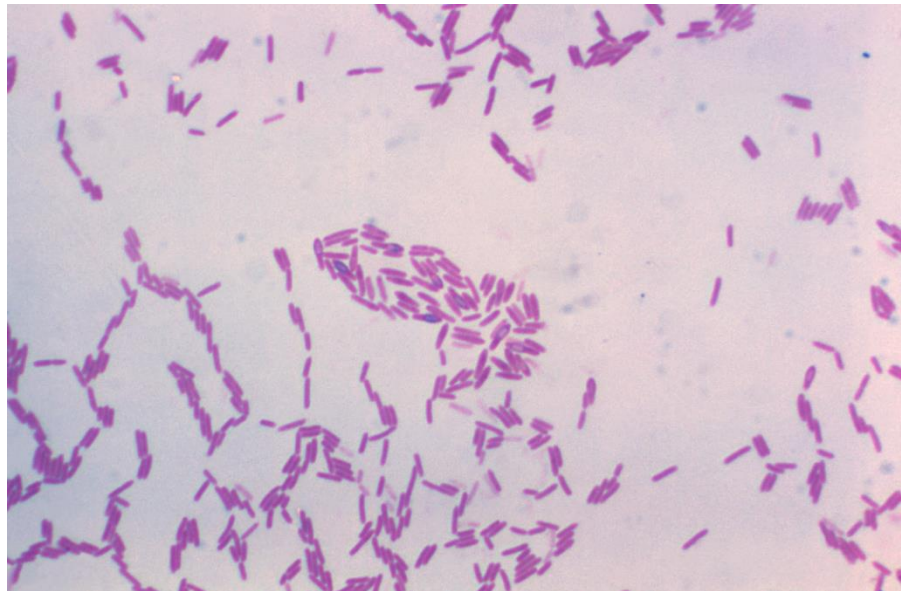


Рис. 2.1. Мікроскопічне зображення *B. Polymyxa*, забарвленого за Грамом [48]

Bacillus polymyxa є факультативно анаеробним хемоорганогетеротрофом, здатним до дихання як в аеробних, так і в анаеробних умовах (через механізм нітратредукції). Оптимальна температура росту бактерії становить близько 30 °С, хоча зростання можливе в межах 5–10 °С до 35–45 °С. Оптимум рН для культивування — 5,7. Цей мікроорганізм не вибагливий до живильних середовищ, добре росте на простих середовищах з агаром, легко піддається культивуванню та генетичній модифікації. Повна геномна послідовність *B. polymyxa* вже розшифрована. Бактерія не росте при концентрації NaCl 5% і 7%; ріст у 2% розчині NaCl є нестабільним. Продукує каталазу, а також гідролізує крохмаль, казеїн і желатин. Демонструє позитивний результат у тесті Фогеса-Проскауера. Утилізує з утворенням газу й кислот L-арабінозу, D-глюкозу, D-манітол і D-ксилозу. Негативними залишаються реакції на утворення індолу, асиміляцію цитрату, дезамінування фенілаланіну, розщеплення тирозину та гідроліз сечовини. Окремі штами можуть гідролізувати целюлозу та фіксувати атмосферний азот. [48]

B. polymyxa має ендofітний спосіб життя (живе в ризосфері та всередині рослин, рідко в морських відкладеннях або ферментованих продуктах

харчування). Завдяки своїй здатності виживати в екстремальних умовах, включаючи високу температуру, біоциди, тиск і ультрафіолетове опромінення, ендоспори можуть переносити пастеризацію та зберігатися в промисловому обладнанні. *P. polymyxa* виробляє різноманітні антимікробні сполуки (тобто вторинні метаболіти), включаючи ліпопептидний поліміксин, фузарицидини, паеніліпогептин, паенілан і тридекаптин, які потенційно можуть бути корисними для лікування інфекцій, стійких до множинних лікарських засобів, та інших мікробних патогенів рослин і людини. Патогенність не визначена [49].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Філогенетичну класифікацію для *B. polymyxa* наведено відповідно до другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [50, 51]:

Домен	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Bacilli</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>
Родина	<i>Paenibacillaceae</i>
Рід	<i>Paenibacillus</i>
Вид	<i>Paenibacillus polymyxa</i>

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

β -амілаза належить до ферментів класу глікозидаз, природними джерелами яких є рослини. Найбільш типовими сировинними джерелами вважаються зерна пшениці, ячмінний і пшеничний солод, соєві боби та картопля. Основна функція β -амілази полягає у поступовому відщепленні залишків мальтози від нередукуючого кінця полісахаридного ланцюга. У порівнянні з α -амілазою, цей фермент менш стійкий до температур, проте краще зберігає активність у кислому середовищі — навіть при pH 3,3 [53].

У технології приготування хлібобулочних виробів ключову роль відіграють амілолітичні та протеолітичні ферменти, адже саме вони забезпечують ферментативне розщеплення вуглеводів і білків у тісті. Це впливає на формування реологічних властивостей тіста та накопичення цукрів, необхідних для нормального перебігу бродіння. Гідроліз може здійснюватися як за рахунок природних ферментів, присутніх у борошні, так і шляхом додавання ферментних препаратів. Доцільність використання ферментних препаратів залежить від якості борошна.

Ферменти також широко застосовуються для оцукрення заварок у процесі приготування активованих дріжджів, рідких дріжджів або у виробництві заварних сортів хліба. Серед поширених ферментних препаратів: солод, амилоризин П10х та амилосубтілін Г10х. Вони поєднують амілолітичну активність з протеолітичною.

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Москаленко Р.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.				22	98
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Наприклад, амілоризин має амілолітичну активність (АА) не нижче 2000 од./г, а протеолітична активність (ПА) не перевищує 70 од./г. Протосубтілін демонструє ПА не нижче 70 од./г та АА не менше 150 од./г. Амїлосубтілін відзначається вищою амілолітичною активністю (АА не менше 3000 од./г), а ПА – не більше 2 од./г. Водночас, останній препарат має високу термостабільність α -амілази, проте може бути контамінований спорами *Bacillus subtilis* та *B. mesentericus*, що несе ризик розвитку картопляної хвороби хліба [54].

Застосування ферментів стало звичайною практикою в хлібопекарській промисловості зважаючи на їх природне походження. Мікробні ферменти використовуються в хлібопекарській промисловості для покращення характеристик тіста [55].

Додавання амїлаз в тісто призводить до: подовженню збереження свіжості продукції; збільшення кількості цукрів бродіння, здатних утворювати гази протягом усього періоду виробничого процесу всередині ланцюгів амїлопектину; отримання кінцевих продуктів з більш вираженим кольором скоринки, шляхом збільшення кількості цукру; збільшення кількості вуглекислого газу.

Амілаза сприяє утворенню декстрину та мальтози, які в нормальних кількостях сприятливо впливають на тісто, збільшуючи здатність утримувати воду та покращуючи зовнішній вигляд середньої частини виробів, забезпечуючи їх м'яку та пухнасту структуру. Зрідження консистенції тіста за рахунок додавання амїлаз призводить до підвищення екстенсивного характеру та зниження стійкості тіста. Це пов'язано з тим, що мальтоза, отримана шляхом гідролізу крохмалю, здійснює дегідратуючу дію на глютен. Кількість вільної води в тісті збільшується, зріджуючи консистенцію.

Ферментна добавка до борошна є перевагою постійної якості борошна, яка не змінює технологічний процес, не впливає на здоров'я споживачів.

Ферменти використовуються в невеликих кількостях і не впливають значною мірою на вартість хліба і хлібобулочних виробів [55, 56].

Отже, бета-амілаза є важливим ферментом для хлібопекарської промисловості, оскільки проявляє вкрай сприятливу активність щодо покращення якості хліба та хлібобулочних виробів.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

У зв'язку зі зниженням чисельності населення в Україні відбулося й зменшення обсягів внутрішнього споживання пшениці — з 8 млн тонн до дещо понад 6 млн тонн. Як повідомив виконувач обов'язків Міністра аграрної політики та продовольства, у 2024 році в Україні прогнозується урожай зерна на рівні 21 млн тонн, з яких понад 6 млн тонн становитиме внутрішнє споживання, а приблизно 15 млн тонн — експорт [57].

Окрім демографічного чинника, спостерігається і трансформація харчових звичок: українці все частіше зменшують кількість хліба та хлібобулочних виробів у щоденному раціоні [57].

Середньодобове споживання хліба в Україні сьогодні станом на 2024 рік складає 100-200 г білого хлібу на людину. Беремо до уваги саме такий вид хлібу, адже в ньому використовується наш фермент [58].

Середньорічна чисельність населення України за 2021 рік становила 41377845 осіб [59].

Споживання хліба скорочується у раціоні українців з кожним роком. Тому для забезпечення оберемо кількість людей, яку може забезпечити мала приватна крафтова пекарня, яка використовує β -амілазу для виробництва білого хлібу. Візьмемо до уваги, що одна біла хлібина важить близько 300 г. Тоді нехай мала приватна пекарня може покрити потребу 20 людей в день при тому, що кожна людина на день купує одну білу хлібину вагою 300 г. Ми беремо таку кількість людей, адже дослідження продуктового ринку підтверджують, що асортимент хлібобулочної продукції дуже різниться та

представлений широким асортиментом виробів, тому інші люди купуватимуть інші види хлібу та різновиди випічки. При тому також враховуємо, що споживання хлібу українцями зменшилось за останні роки, як було вказано раніше. Тоді добовий продаж білого хлібу пекарні на день становитиме:

$$0,3 \text{ кг} \times 20 = 6 \text{ кг}$$

Приймемо споживання хліба, який виготовлено із використанням β -амілази, протягом 250 днів на рік. Як вже зазначалось, вживання хлібу людьми має тенденцію до зниження, також не всі люди вживають кожного дня білий хліб, оскільки наразі дуже широкий асортимент хлібобулочної продукції. Термін придатності хліба з β -амілазою становитиме близько 5 днів у запакованому стані. Тоді за рік дана група людей споживає хліба:

$$6 \times 250 = 1\,500 \text{ кг}$$

У літературі представлено дослідження впливу додавання амілаз в концентраціях 0,25-1% на фізичні, в'язкопружні (еластичність структури) і текстурні властивості хліба. Показано, що додавання ферменту у кількості 0,25-0,3% забезпечує покращення структури - як властивостей м'якушки, так і скоринки отриманих виробів, подовжуючи свіжість хліба протягом періоду зберігання [60].

Також варто врахувати, що при занадто низькій активності ферменту, хліб може вийти занадто сухим та менш об'ємним. А якщо активність зависока, то може виникнути липкий м'якуш. Ці характеристики хліба визначають число падіння. Чим вища активність ферменту, тим нижче значення числа падіння [56]. Тобто дані перелічені характеристика спеченого хліба залежать напряду від активності та частки доданої β -амілази в тісто. Препарат β -амілази, що використовують для виготовлення хліба, має активність 10000 Од/г [61].

Прийmemo для розрахунків потреби у ферменті для однієї крафтової пекарні частку введення β -амілази 0,25% від маси борошна. Візьmemo до уваги, що вихід хліба (готового виробу) становить у середньому 160% від маси борошна за рахунок додавання води та інших інгредієнтів [62].

Тоді обрахуємо масу борошна для виготовлення 1500 кг хліба:

$$\frac{1\,500}{1,6} = 937,5 \text{ кг}$$

Розрахуємо необхідну кількість β -амілази для даної маси борошна:

$$\frac{937,5 \cdot 0,25}{100} = 2,34 \text{ кг}$$

Отже, річна потреба в β -амілазі для забезпечення покупців білим хлібом в малій приватній крафтовій пекарні становить 2,34 кг β -амілази. Тобто нам необхідно 2,34 кг препарату β -амілази з активністю 10 000 Од/г [61].

Тепер порахуємо скільки одиниць активності ферменту необхідно:

$$2340 \text{ г} \cdot 10^5 \text{ Од}$$

Отже, розраховано, що одна крафтова пекарня потребує на рік 2,34 кг або $2,34 \cdot 10^8$ Од β -амілази.

Для отримання β -амілази пропонуємо використовувати штам *Bacillus poytuxa* BWB-01 з продуктивністю 75,88 Од/мл.

Розрахуємо скільки літрів культуральної рідини необхідно для виробництва такої кількості ферменту:

$$2340 \cdot 10^5 \text{ Од} / 75,88 \cdot 10^3 \text{ Од/л} = 3\,084 \text{ л}$$

Враховуючи 20 % втрат ензиму при виділенні та очищенні, необхідний об'єм культуральної рідини складе:

$$V_{\text{кр}} = 3\,084 \cdot 1,2 = 3\,701 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для покриття річної потреби у β -амілазі, з урахуванням технологічних втрат на етапах виділення та очищення, необхідно отримати 3701 літр культуральної рідини.

Щоб визначити обсяг культуральної рідини, який має вироблятися за один ферментаційний цикл, далі розраховується кількість стадій підготовки посівного матеріалу. При цьому враховується орієнтовна кількість робочих днів — 30 на рік, що включає також час на технічне обслуговування, огляд або заміну обладнання [63]. За таку кількість днів виробництво покриє річну потребу в β -амілазі однієї крафтової пекарні. У майбутньому таке виробництво може бути масштабоване для забезпечення потреб більшої кількості пекарень. Паралельно підприємство буде працювати над біосинтезом інших ферментів для харчової промисловості.

Тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 3\,701 \text{ л} / 30 \text{ днів} = 123,4 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \times V_d \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,5 \times 123,4 \times 54) / 24 = 416,5 \text{ л} \approx 0,42 \text{ м}^3 / \text{цикл},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (6 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год.

Кількість виробничих циклів за рік:

$$N_{\text{цк}} = 24 \times 1,1 \times T_{\text{рд}} / T_{\text{цк}} = 24 \cdot 1,1 \cdot 30 / 48 = 16,5 \text{ циклів},$$

де $T_{рд}$ - кількість робочих днів на рік, $T_{цк}$ - час виробничого циклу.

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

$$V_{г} = V_{крц}/K_{зап} = 0,42/0,5 = 0,84 \text{ м}^3,$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 0,42/0,84 = 0,5 - \text{не перевищує заданого значення [63].}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримують $0,42 \text{ м}^3$ культуральної рідини (див. п.3.3). При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), які становлять від 10 - 15%.

З урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{роб.1} = V_{кр} \times (1 + E_{ф}) = 0,42 \times 1,1 = 0,46 \text{ м}^3,$$

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

Отже, робочий об'єм ферментера ($V_{пс} + V_{пм}$) дорівнює $0,5 \text{ м}^3$. За вибраного коефіцієнта заповнення $0,5$ геометричний об'єм ферментера становить: $V_{ф} = 0,46/0,5 = 0,92 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст1} = 1 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{31} = 0,5/1 = 0,5$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65), отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Для засіву $V_{роб.1} = 0,46 \text{ м}^3$ середовища необхідно приготувати

$$V_{пм1} = V_{роб.1} \times X_{ф} = 0,46 \times 0,1 = 0,046 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу,}$$

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

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм1}} = 0,46 - 0,046 = 0,41 \text{ м}^3,$$

Врахуємо, що при одержанні $0,05 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті 10% культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} \times (1 + E_{\text{ф}}) = 0,046 \times 1,1 = 0,05 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту $0,05 \text{ м}^3$ за коефіцієнта заповнення $0,5$ можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па2}} = 0,05/0,5 = 0,1 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{\text{ст2}} = 100 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,2} = 50/100 = 0,5$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів ($0,55-0,65$), отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву $V_{\text{роб.2}} = 0,05 \text{ м}^3$ необхідно приготувати

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} \times X_{\text{ф}} = 0,05 \times 0,1 = 0,005 \text{ м}^3 = 5 \text{ л посівного матеріалу}$$

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

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм2}} = 50 - 5 = 45 \text{ л}$$

Врахуємо, що під час одержання 5 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Тоді об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} \times (1 + E_{\text{ф}}) = 5 \times 1,1 = 5,5 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 5,5 л за коефіцієнта заповнення $0,5$ можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па3}} = 5,5/0,5 = 11 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний апарат $V_{\text{ст3}} = 10 \text{ л}$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{3,3} = 5,5/10 = 0,55$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом 5,5 л необхідно:

$$V_{\text{пмз}} = V_{\text{роб.з}} \times X_{\text{ф}} = 5,5 \times 0,1 = 0,55 \text{ л посівного матеріалу}$$

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

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{псз}} = V_{\text{роб.з}} - V_{\text{пмз}} = 5,5 - 0,55 = 4,95 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу $V_{\text{пмз}} = 0,55$ л (550 мл) для засіву інокулятора можна здійснити вирощуванням *B. polytuxa* BWB-01 у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмз}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}) = 550 / (750 * 0,2) = 4 \text{ колби}$$

Підсумовуючи розрахунки, для отримання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування ферменту β -амілази потрібно встановити ферментер об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5, посівні апарати об'ємами 100 л, 10 л, а також підготувати 4 качалочні колби для вирощування інокуляту.

Таблиця 3.1

Узагальнені розрахунки щодо підготовки інокуляту та виробничого культивування продуцента β -амілази

№ стадії	Тип апарата	Геометричний об'єм апарата $V_{\text{г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{з}}$, частка	Робочий об'єм апарата $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л
1	2	3	4	5	6	7
1.	Колби, шт	4,0 шт	0,2	550 (мл)	495 (мл)	55 (мл)
2.	Інокулятор 2	10	0,55	5,5	4,95	0,55
3.	Інокулятор 1	100	0,5	50	45	5
4.	Ферментер	1 000	0,5	460	410	46

У межах мого кваліфікаційного проєкту було обрано проектування нішевого виробництва β -амілази з використанням невеликого ферментера об'ємом 1 м³, що повністю узгоджується з потребами крафтової пекарні. Це рішення ґрунтується на низці техніко-економічних міркувань.

По-перше, β -амілаза не використовується в масовому виробництві хліба соціальних сортів. Її додають для покращення смакових властивостей і структури саме білого хліба преміального сегмента. Тому цільовий ринок для такого ферменту- невеликі приватні пекарні, які виготовляють хліб із підвищеною доданою вартістю. Прикладом є крафтова пекарня з виробничою потужністю до 20 хлібин на день- цього цілком достатньо, щоб задовольнити попит у невеликому районі або громаді.

По-друге, я не проєктую повноцінне біотехнологічне виробництво з нуля. Замість цього, рішенням проєкту є використання вже існуючих виробничих потужностей, наприклад, на підприємствах ТОВ "Ензим", де встановлені ферментери об'ємом 1 м³, які активно використовуються для виготовлення інших ферментних препаратів. За моїми розрахунками, на базі таких підприємств можливо виготовляти партії β -амілази в обмеженій кількості без потреби у додатковому обладнанні чи значних капіталовкладеннях, просто розширивши лінійку продукції.

Крім того, виробництво ферменту запускається обмежену кількість разів на рік, що не створює навантаження на обладнання і дозволяє оптимально вписати процес у вже існуючий графік виробництва ферментів. Таким чином, рішення є не лише технічно реалістичним, а й економічно доцільним.

Також не варто забувати, що локальне виробництво ферменту виключає додаткові витрати на логістику, які б виникли при закупівлі його з-за кордону. Це особливо важливо для невеликої пекарні, яка прагне мінімізувати собівартість продукції без втрати якості. У майбутньому ця модель може бути масштабована для задоволення потреб кількох пекарень або невеликих мереж, що працюють у крафтовому сегменті, з можливістю централізованого виготовлення ферменту під замовлення.

РОЗДІЛ 4. Біосинтез β -амілази *Bacillus polymyxa* BWB 01

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Raenibacillus polymyxa E681 як джерело вуглецю використовує крохмаль. Схему метаболізму крохмалю у *B. polymyxa* E681 наведено згідно даних KEGG [52]. Ми використовуємо саме такий штам, оскільки нашого штаму немає у KEGG, проте метаболізм проходить однаково, адже рід однаковий:

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Біосинтез β -амілази <i>Bacillus polymyxa</i> BWB 01					
Розроб.		Москаленко Р.О.						Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.							32	98
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

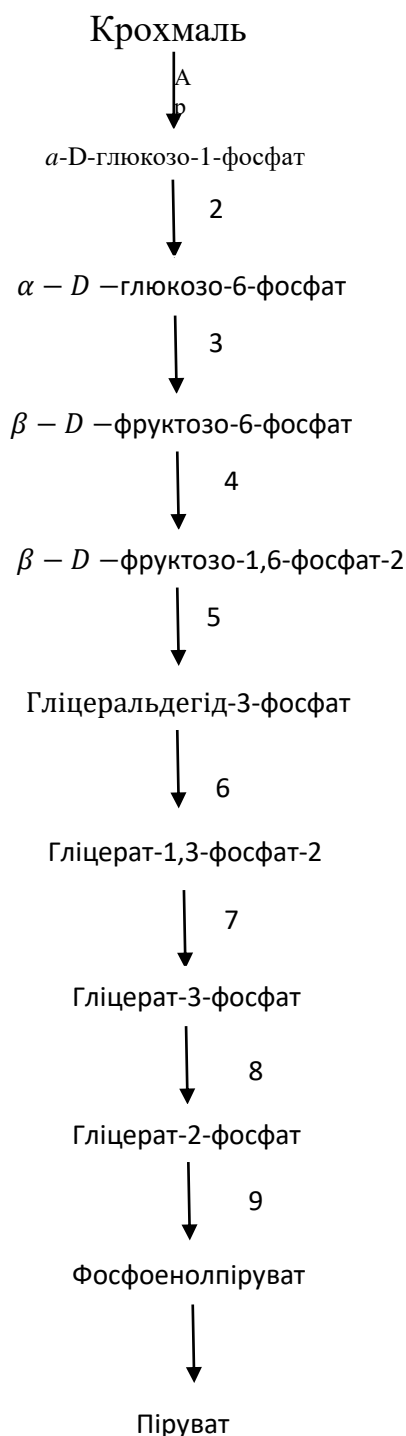


Рис.4.1 Шлях катаболізму крохмалю у *B. subtilis* E681. Ферменти: 1- глікогенфосфорилаза (ЕС: 2.4.1.1); 2- фосфоглюкомутаза (КФ. 5.4.2.2); 3- глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ. 5.3.1.9); 4- 6-фосфотруктокіназа (КФ. 2.7.1.11); 5- фруктозо-бісфосфатальдолаза (КФ. 4.1.2.13); 6- гліцераальдегід 3-фосфатдегідрогеназа (фосфорилуюча) (КФ. 1.2.1.12); 7- фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 8- 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ. 5.4.2.11); 9- енолаза (КФ. 4.2.1.11); 10- піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Так як фруктоза і глюкоза взаємоперевторювані сполуки, то вони мають однаковий гліколітичний шлях.

За наведених умов метаболізму, при використанні 1 моля глюкози утворюється така кількість відновлювальних еквівалентів – НАДН та НАДФН (відповідно до *Рис. 4.1 і 4.2*):

- 1) у процесі гліколізу, в результаті перетворення глюкози в піруват, формується 2 моля НАДН;
- 2) під час окисного декарбоксілювання пірувату утворюються ще 2 моля НАДН;
- 3) у циклі трикарбонових кислот: при окисненні ізоцитрату генерується 2 моля НАДФН, 2-оксоглутарату — 2 моля НАДН, та при перетворенні малату — ще 2 моля НАДН.

Загалом, у циклі Кребса синтезується 6 моль (НАДН+НАДФН). Крім того, при окисненні сукцинату до фумарату (у ЦТК) утворюється 2 моль ФАДН.

Отже, загальна кількість відновлювальних еквівалентів, яка утворюється у процесі окиснення глюкози за гліколітичним шляхом і у ЦТК, дорівнює: $2 + 2 + 6 = 10$ моль (НАДН+НАДФН) і 2 моль ФАДН.

При Р/О, що дорівнює 2, із 1 моль НАДН утворюється 2 моль АТФ, а з 1 моль ФАДН – 1 моль АТФ.

Отже, кількість АТФ, яка утворюється при катаболізмі глюкози становить: $10 \cdot 2 + 2 \cdot 1 = 22$ моль АТФ.

Якщо до цієї кількості додати 2 моля АТФ, що синтезується при катаболізмі глюкози за гліколітичним шляхом, та 2 моль АТФ, що утворюються при перетворенні сукциніл-КоА на сукцинат у циклі трикарбонових кислот, одержимо $22 + 4 = 26$ моль АТФ.

Отже, при окисненні глюкози за гліколітичним шляхом та за умови, що $P/O = 2$, кількість синтезованої АТФ дорівнює 26 моль.

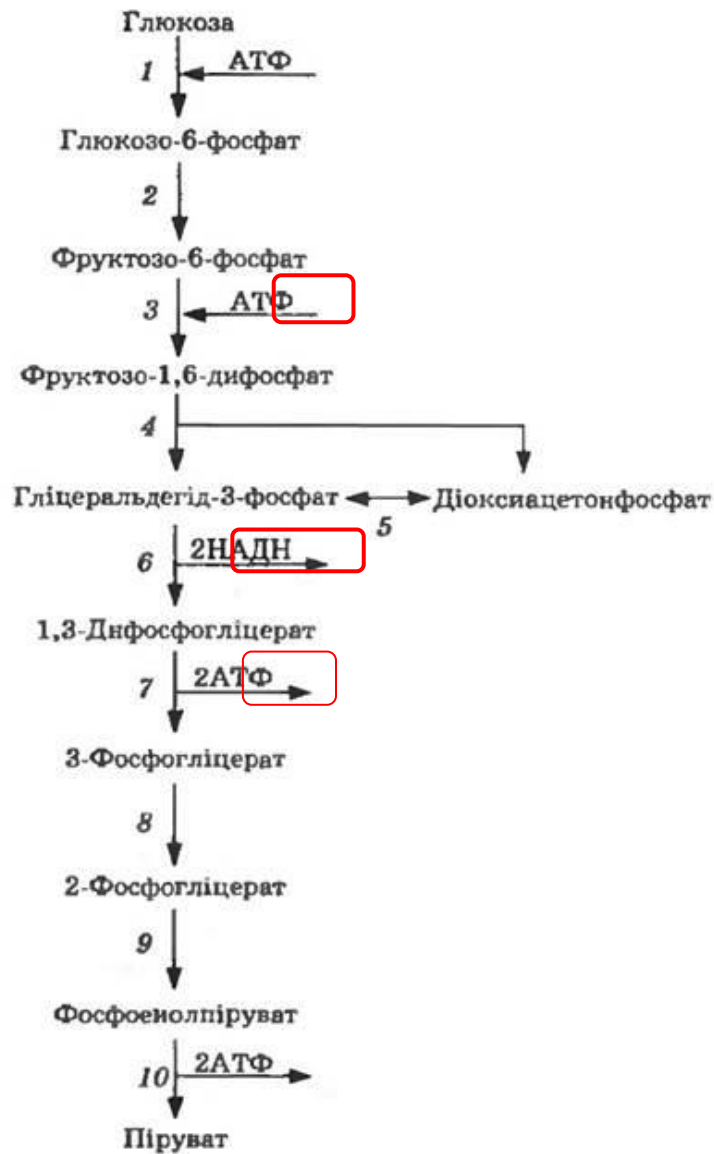


Рис. 4.2 Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена- Мейєргофа- Парнаса:
 ферменти: 1- гексокіназа; 2- глюкозофосфатізомераза; 3- фосфофруктокіназа;
 4- фруктозодифосфатальдолаза; 5- триозофосфатізомераза; 6-
 гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа; 7- фосфогліцераткіназа; 8-
 гліцератфосфомутаза та фосфогліцератфосфомутаза; 9-енолаза; 10-
 піруваткіназа

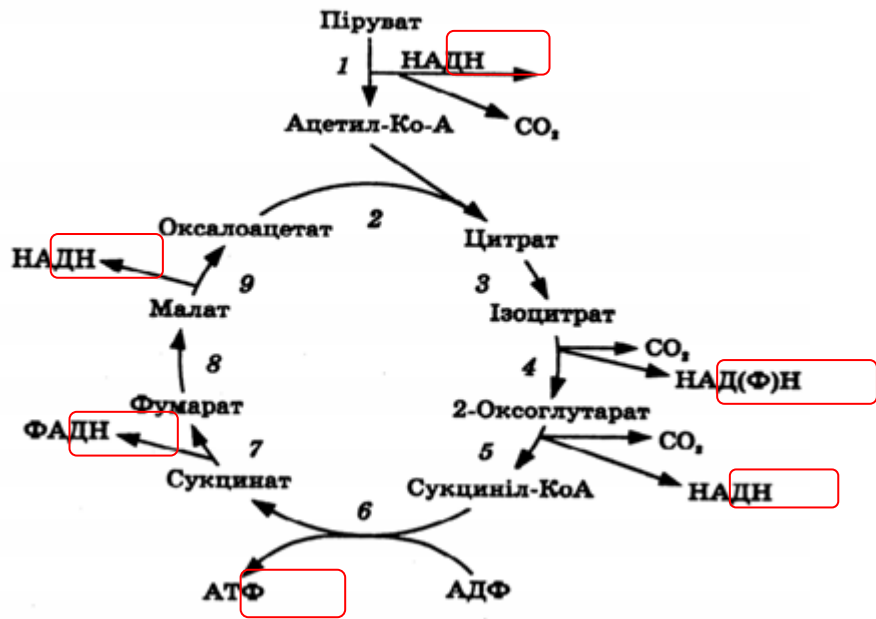


Рис. 4.3 Цикл трикарбонних кислот:

ферменти: 1- піруватдегідрогеназа; 2- цитратсинтаза; 3- аконітаза; 4- ізоцитратдегідрогеназа; 5- 2-оксоглутаратдегідрогеназа; 6- сукцинаттіюкіназа; 7- сукцинатдегідрогеназа; 8- фумараза; 9- малатдегідрогеназа

Основний амінокислотний склад β-амілази: аспарагін, глутамін, лізин, аргінін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота (Рис. 4.4).

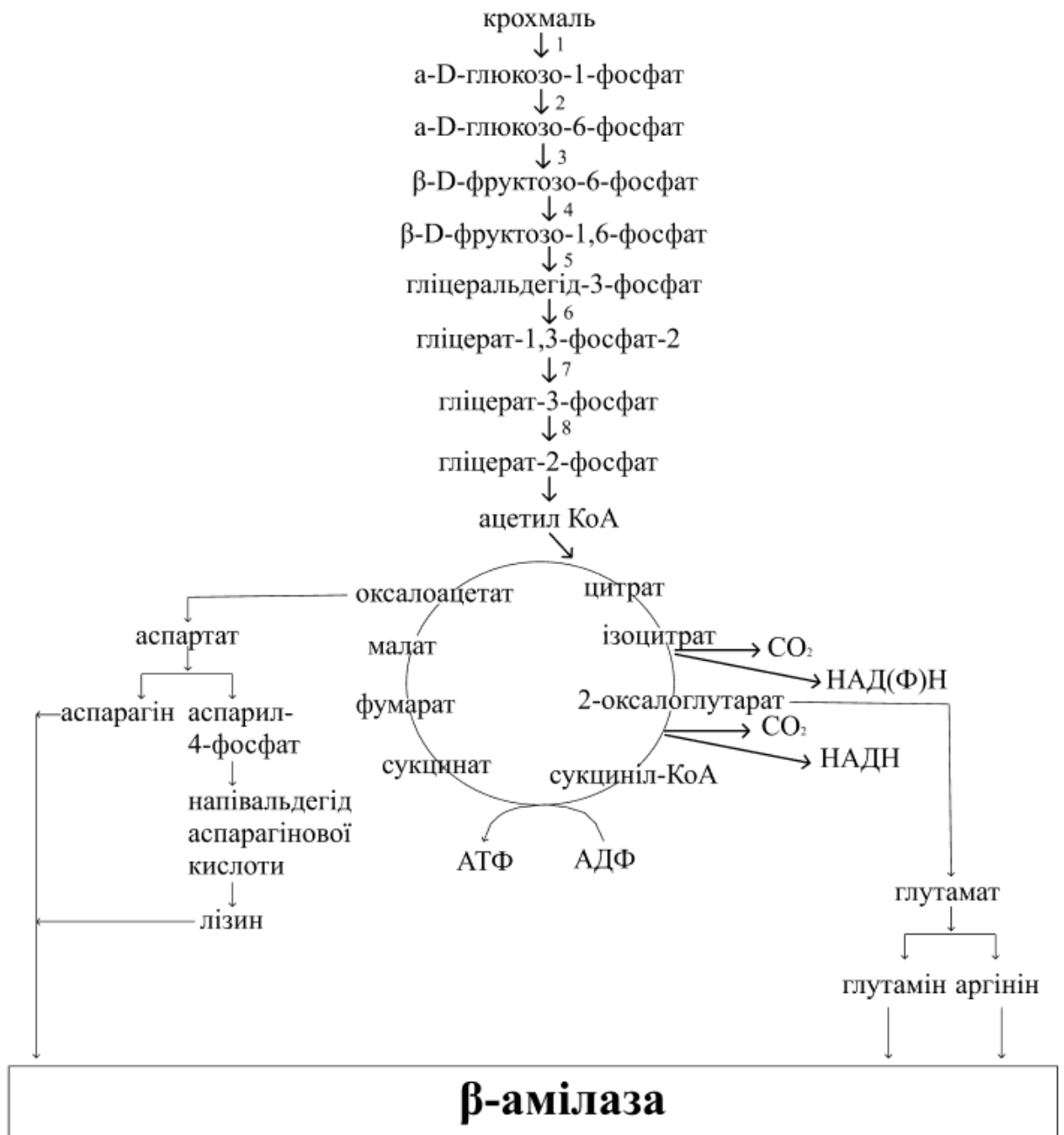


Рис. 4.4 Біосинтез цільового продукту- β-амілази

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Штам *Bacillus polymyxa*, відповідно до температурного оптимуму росту (30 °С), класифікується як мезофільний мікроорганізм. Його розвиток відбувається в нейтральному або слаболужному середовищі (рН 6,9–7,1), що створює підвищені вимоги до стерильності процесу через можливу контамінацію. Такі умови унеможливають використання поверхневого культивування, оскільки воно не забезпечує належного рівня асептики.

Для отримання ферменту обрано глибинне культивування, яке проводиться у рідкому середовищі, де мікроорганізми ростуть рівномірно в об'ємі. У такому середовищі необхідно підтримувати високий рівень насичення розчиненим киснем, що досягається завдяки активній аерації — продуванню стерильного повітря через культуральну рідину, а також механічному перемішуванню. Це забезпечує ефективне масо- та теплообмінне середовище, оптимальне для розвитку аеробних мікроорганізмів.

Глибинний метод широко використовується у мікробіологічному виробництві для отримання як біомаси, так і цільових метаболітів (органічних кислот, ферментів, антибіотиків тощо). Його перевагами є компактність обладнання, можливість масштабування за рахунок збільшення висоти апарата, автоматизація процесу та зручність у вилученні продукту з культуральної рідини.

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Москаленко Р.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.				38	98
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

З урахуванням аеробної природи *V. polytuxa* та особливостей морфології (бактерія не формує міцелію), обґрунтовано вибір ферментера з лопатевою мішалкою, яка забезпечує рівномірне перемішування середовища при оптимальній швидкості 180–200 об/хв. Для уникнення утворення воронки та покращення турбулентності в апараті передбачено встановлення відбивних перегородок.

Одним з технологічних викликів у процесі культивування є піноутворення, пов'язане з подачею повітря. Надлишкова піна знижує ефективність масообміну й може призвести до втрати біомаси або порушення стерильності. У зв'язку з цим доцільним є використання механічного піногасника, розміщеного над поверхнею середовища. Такий підхід виключає потребу у хімічних піногасниках, що є перевагою у харчовому виробництві, оскільки спрощує подальше очищення ферменту.

Таким чином, оптимальною є конструкція ферментера, що поєднує барботер для аерації, лопатеву мішалку, механічний піногасник і систему відбивних перегородок, забезпечуючи стабільне й ефективне культивування продуцента з мінімальними втратами та максимальним рівнем контролю технологічного процесу.

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Штам *Bacillus polytuxa* BWB-01 вирощують глибинним методом з подачею аераційного повітря у товщу поживного середовища.

Оскільки мікроорганізми засвоюють тільки розчинений у воді кисень, а його розчинність у воді лімітована, для забезпечення аеробного росту необхідне постійне додавання кисню. Процес подачі кисню у товщу рідкого середовища називається аерацією і досягається шляхом вдування стерильного повітря в культуральне середовище. У ферментерах аерація поєднується із перемішуванням середовища рухомим перемішуючим пристроєм, що обертається зі швидкістю від десятків до тисяч обертів за хвилину [64].

Вибір і розрахунок системи очищення повітря проводять за найбільшою забрудненістю обраної місцевості з урахуванням того, що розміри часток у повітрі, на яких прикріплюються мікроорганізми, становлять від 0,5-2,0 мкм по ширині до 2-15 мкм по довжині. До виробничих приміщень й обладнання повітря подають потужними компресорами на висоті 1-2 м від найвищої точки будівлі, при проходженні через які повітря набуває механічних включень від тертьових деталей, також до повітря потрапляють краплі мастил у разі використання поршневих компресорів. При фільтрації повітря здійснюється також його очищення від згаданих механічних включень [65]. Врахувавши розміри виробництва, буде використовуватись двоповерхова будівля (висота поверху- 6 м), тому атмосферне повітря відбирається на висоті 14 м через спеціальну шахту.

Апаратурне оформлення етапу підготовки та очищення повітря залежить від методу культивування біологічного агента.

Потужність компресора обирається таким чином, щоб забезпечити стабільну подачу повітря через усю систему фільтрації до ферментаційного обладнання з підтриманням необхідного надлишкового тиску в межах 0,01–0,03 МПа. Повітря, що подається від компресора до ферментерів, проходить через декілька зон опору: трубопровідну мережу (~0,03 МПа), фільтрувальний шар (~0,02 МПа), стовп культуральної рідини у ферментері (~0,04–0,06 МПа), а також зону розширення у барботері (~0,01–0,02 МПа).

У процесі стиснення температура повітря суттєво зростає, тому обов'язковим є його охолодження до температури нижче точки роси для конденсації надлишкової вологи. Перед подачею на фільтрацію повітря накопичується у ресиверах або буферних ємностях, що вирівнюють тиск і забезпечують рівномірну подачу до системи фільтрів.

Фільтраційна система включає три послідовні етапи очищення: попереднє, грубе та тонке (стерильне). Такий підхід дозволяє досягти високої чистоти повітря, необхідної для забезпечення асептичних умов культивування. [65]

Попереднє очищення — це первинне знепилювання, в ході якого з потоку повітря видаляються частки розміром 5–10 мкм. Застосовуються багатошарові металеві сітки, стружкові набивки з полімерів або металів, а також грубі волокнисті матеріали (мінеральні або синтетичні).

Грубе очищення реалізується у головних фільтрах і дозволяє затримувати частки діаметром 1–1,5 мкм, зокрема мікроорганізми. Ефективність цього етапу досягає 98%.

Тонке (стерильне) очищення здійснюється в індивідуальних фільтрах, розміщених безпосередньо перед ферментерами. Вони забезпечують затримку часток діаметром 0,3 мкм із ефективністю 99,999%. Найчастіше застосовуються мікрволокнисті матеріали (скловата, базальтові волокна, синтетичні полімери), іноді з латексним просоченням для підвищення стійкості до парів або з антибактеріальними добавками (наприклад, гексахлорфеном).

Відпрацьоване після аерації повітря проходить повторну фільтрацію перед викидом в атмосферу, що відповідає санітарно-гігієнічним вимогам біотехнологічного виробництва.

Отже, оскільки продуцент є аеробом і потребує кисень, то ферментер повинен мати встановлене обладнання для барботування та перемішування, що дозволить оптимізувати масообмінні процеси [65].

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

На підприємствах біотехнологічної, хіміко-фармацевтичної та харчової промисловості дозволено використовувати лише зареєстровані в Україні мийні, дезінфікуючі та антисептичні засоби, що відповідають вимогам

чинних нормативно-правових актів, зокрема Санітарних правил і норм № 5179-90, Державних санітарних норм і правил (ДСанПіН) та правил належної виробничої практики (GMP). Вказані засоби використовують для санітарної обробки приміщень, обладнання (в т.ч. інокулятори, реактори, ферментер), дезінфекції рук персоналу на всіх стадіях виробничого процесу. [9, 35, 27]

Для запобігання адаптації мікроорганізмів до дезінфікуючих засобів рекомендовано змінювати використовувані засоби кожні 1–3 місяці.

Згідно з практичними даними з експлуатації біотехнологічних підприємств, процес очищення виробничого обладнання малих об'ємів здійснюється ручним миттям (необхідно використовувати розчин у кількості 50% від загального об'єму ємностей), а для обладнання більших об'ємів- СІР-мийкою (використовується менша витрата розчину, ніж при ручному митті- близько 30% від загального об'єму ємностей). Миючі та дезінфікуючі засоби повинні зберігатися у сухих, вентильованих приміщеннях згідно з вимогами інструкцій виробника та санітарних норм МОЗ України. [9]

Застосування сучасних методів санітарної обробки сприяє підвищенню високого рівня мікробіологічної чистоти та забезпечує відповідність продукції вимогам належної виробничої практики (GMP).

Наразі існує безліч дезінфікуючих засобів, проте, незважаючи на це, їхній склад має обмежену кількість діючих речовин. Тож основними діючими речовинами у даних засобах зазвичай є: перекиси, галогени, альдегіди, спирти, кислоти тощо. Окрім того, дезінфікуючі засоби мають підлягати таким критеріям, як відсутність вибухонебезпечності, нешкідливість для здоров'я працівників, ефективність результату, простота у приготуванні, застосуванні, а згодом у змитті розчинів працівниками із обладнання чи поверхонь, переважно корозостійкість, економічність та мінімальна токсичність. [13]

Ключовими етапами у санітарній підготовці виробництва є:

- підготовка дезінфікуючих та мийних засобів (приготування розчинів, перевірка терміну придатності);
- підготовка устаткування та обладнання (при підготовці устаткування та обладнання відбуваються такі операції: миття, ополіскування, дезінфекція та технічний огляд обладнання, а також проводиться мікробіологічний контроль. Устаткування розташоване таким чином, що до нього забезпечений вільний доступ для прибирання окремих ділянок як джерел можливого скупчення бруду та огляду);
- підготовка приміщень (щоденне та генеральне прибирання).

У наш час існує безліч різних дезінфікуючих засобів як із максимально схожими складами (які, в свою чергу, можуть замінювати один одного за необхідності), так і з зовсім різними складами та призначенням. На біотехнологічних виробництвах, зокрема, комбіновані мийно-дезінфікуючих засоби необхідні для обробки приміщень, миття обладнання, дезінфекції рук персоналу тощо. Комбіновані засоби забезпечують більшу швидкість обробки апаратів та менші витрати. Також при виборі відповідних засобів варто враховувати забезпечення ними бактерицидної, протівірусної та фунгіцидної дії. Оскільки виробничі підприємства працюють щодня, то потрібне обов'язкове чергування засобів для уникнення резистентності мікроорганізмів до даних засобів та унеможливлення контамінації. Чергування мийно-дезінфікуючих засобів потрібно здійснювати кожні 1-3 місяці, щоб запобігти розвитку стійких штамів мікроорганізмів. Обов'язково проводиться щоденне прибирання декілька разів на день та генеральне- не рідше одного разу на тиждень [13].

Як мийно-дезінфікуючі засоби для обробки приміщень можуть використовуватись наступні перелічені засоби.

Хлорамін Б дозволений для використання на біотехнологічних підприємствах. За складом є натрієвою сіллю хлораміду бензолсульфо кислоти. Хлорамін Б також використовується для дезінфекції рук працівників. Засіб проявляє бактерицидні, фунгіцидні та вірулоцидні властивості. [16]

Сульфанол дозволений для використання на біотехнологічних підприємствах. У складі містить суміш ізомерів натрієвих солей алкілбензолсульфо кислот. Засіб не викликає корозію. [17]

Септофан дозволений для використання на біотехнологічних та фармацевтичних підприємствах. За складом належить до спиртовмісних дезінфікуючих засобів на основі пропанолу та четвертинних амонієвих сполук. Септофан застосовується для обробки поверхонь, обладнання, а також може використовуватись для гігієнічної дезінфекції рук персоналу. Засіб проявляє виражені бактерицидні, фунгіцидні та віруліцидні властивості. [18, 24]

Як мийно-дезінфікуючі засоби для обробки обладнання можуть використовуватись наступні перелічені засоби.

Фамідез Ендо- безальдегідний концентрат, містить бігуанідин. Склад: дідецилметилполі(оксиетил)амонію пропіонату та кокоспропілендіамінгуанідину ацетату. Засіб не викликає корозію. Засіб проявляє бактерицидні, фунгіцидні, вірулоцидні та туберкулоцидні властивості. [19]

Стериокс дозволений для використання на харчових, біотехнологічних підприємствах, зокрема. У складі містить надоцтову кислоту. Відноситься до малонебезпечних речовин. Засіб проявляє бактерицидні, фунгіцидні, вірулоцидні та туберкулоцидні властивості. [20]

Divosan HS 35 дозволений для використання на харчових підприємствах. За складом є висококонцентрованим розчином перекису

водню (35%), стабілізованим спеціальними інгібіторами. Засіб застосовується для дезінфекції обладнання, пакувальних матеріалів та поверхонь, що контактують з харчовою сировиною. Divosan HS 35 проявляє бактерицидні, фунгіцидні, віруліцидні та спороцидні властивості. [15,25]

Каустична сода має обмежену антимікробну дію, яка реалізується лише за умов високої концентрації та тривалого контакту. У харчовій промисловості її застосовують лише для миття, а дезінфекцію проводять окремими засобами з підтвердженою біоцидною активністю. [21-22]

Лужний мийний засіб *Supra Prima* дозволений для використання на харчових підприємствах. У складі містить воду демінералізовану, гідроксид натрію, 10-15% неіоногенні ПАВ, барвник. Засіб використовується для очищення обладнання від забруднень. [14]

Наведені мийно-дезінфікуючі засоби є далеко не великим списком засобів, які використовують для обробки приміщень та обладнання, а отже потрібно обрати засоби з найоптимальнішими критеріями для використання. У таблиці (Таблиця 5.1) наведено узагальнену характеристику перелічених вище мийно-дезінфікувальних засобів.

Узагальнююча таблиця характеристики мийно-дезінфікувальних засобів

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
Засоби для обробки обладнання								
Фамідез Ендо (виробник ДезоМарк)	дидецилметил полі(оксиетил)амонію пропіонат 5.63%, алкілпропілен діамін 1.5%, бігуанідину ацетат 3.75%, неіоногенні ПАР<10%, органічний розчинник<10%, запашка.	Бактерії, віруси, гриби, спори	Високоєфективний безальдегідний концентрат на основі спеціальної ЧАС та бігуанідину. Розчиняє біологічні речовини, не фіксує білків. Безпечний для користувачів за рахунок використання низької концентрації робочих розчинів. Розчин має зелений колір. Має високу розчинність.	Інгібітор корозії. Обробка термолабільних інструментів та виробів із пластмас та колоїдів.	Робочі розчини мають концентрацію 0,5-1%	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року. Дата внесення: 01.04.2020 року. Термін дії до: 01.04.2025 року.	1л коштує 818 грн	[19]

<p><i>Diversey</i> <i>Divosan</i> <i>HS 35</i> (виробник Diversey)</p>	<p>перекис водню (H₂O₂)-35%, стабілізатори</p>	<p>Бактерії, віруси, гриби, спори</p>	<p>Високоєфективний дезінфікуючий засіб на основі 35% перекису водню. Не містить хлору та альдегідів. Має високу окислювальну активність, не залишає токсичних залишків.</p>	<p>Безпечний для більшості типів обладнання. Сумісний з нержавіючою сталлю, склом, керамікою, стійкими харчовими пластиками. Не викликає корозії при дотриманні рекомендованих концентрацій.</p>	<p>Робочі розчини мають концентрацію 0,1-1%</p>	<p>Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року. Дата внесення: 05.05.2020 року. Термін дії до: 05.05.2025 року.</p>	<p>1 л коштує 260 грн</p>	<p>[15, 25]</p>
--	--	---------------------------------------	--	--	---	---	---------------------------	-----------------

<p>Каустична сода (виробник ТОВ «Авт Трейд»)</p>	<p>гідроксид натрію</p>	<p>Бактерії, гриби</p>	<p>Завдяки високій розчинності у воді та сильним лужним властивостям, каустична сода швидко розкладає органічні речовини, жири та білкові сполуки. Невелика кількість засобу забезпечує потужну дію.</p>	<p>Розчини не пошкоджують нержавіючу сталь, скло, кераміку, емаль, пластик</p>	<p>Робочі розчини мають концентрацію 0,5-2%</p>	<p>Миючий засіб</p>	<p>1л коштує 44 грн</p>	<p>[21-22]</p>
--	-------------------------	------------------------	--	--	---	---------------------	-------------------------	----------------

«Стериокс» (виробник Baltiachem i)	надоцтова кислота 12,0-15,0%, пероксид водню 20,0-25,0%, оцтова кислота- 18,0-30,0%, стабілізуючі добавки, вода- до 100,0%.	Бактерії, віруси, гриби, спори	Концентрована прозора рідина від безбарвного до світло жовтого кольору. Добре змішується з водою у будь-якому співвідношенні. Має помірний запах оцтової кислоти. Видаляє механічні, білкові, жирові забруднення. Не фіксує органічні забруднення.	Розчини не чинять шкідливої дії на об'єкти, виготовлені з нержавіючої сталі, лудженого заліза, алюмінію, скла, гуми, кислотостійких пластмас, фторопласту, деревини, кераміки, фарфору, фаянсу та поверхні з лакофарбовим, гальванічним, полімерним покриттям, з епоксидної смоли, емалі, гуми.	Робочі розчини мають концентрацію 0,005-0,01%. Способи обробки: ручний, механізований	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №230. Дата внесення: 17.04.2020 року. Термін дії до: 17.04.2025 року.	1л коштує 156 грн	[20, 23]
---------------------------------------	---	--------------------------------	--	---	--	---	-------------------	----------

<p><i>Supra Prima</i> (виробник Primaterra)</p>	<p>Вода демінералізована, гідроксид натрію, 10-15% неіоногенні ПАВ, барвник</p>	<p>Лужний миючий засіб</p>	<p>Висококонцентрований лужний високопінний миючий засіб, що представляє собою оптимізовану суміш ПАВ і комплексуючих речовин, водорозчинних, біорозкладні. Засіб в хімічному відношенні стабільно в воді і на повітрі, не розкладається з виділенням шкідливих речовин</p>	<p>Підходить для нержавіючої сталі, натурального каменю, пластику, емальованих поверхонь, виробів із чавуну</p>	<p>Робочі розчини мають концентрацію 0,5-2%</p>	<p>Миючий засіб</p>	<p>1л коштує 183 грн</p>	<p>[14]</p>
---	---	----------------------------	---	---	---	---------------------	--------------------------	-------------

<i>Засоби для обробки приміщення</i>								
<i>Хлорамін Б (виробник Хімлаборр еактив)</i>	натрієва сіль хлораміду монобензол сульфокислоти.	Бактерії, віруси, гриби, спори	Дрібний білий або жовтий порошок, розчинний у воді або спирті. Має незначний запах хлору. Видаляє неприємний запах. Вибухобезпечна речовина.	Обробка різних типів поверхонь, металу, скла, пластику, каучуку, низьковуглецевої сталі.	Робочі розчини мають концентрацію 0,1-5%.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів.	1л коштує 750 грн	[16]
<i>Сульфанол (виробник Enaspol)</i>	алкілбензол сульфонат натрію	Бактерії	Аніонна поверхнево-активна речовина. Добре розчиняється у воді. Добре піниться у воді. Сипучий гранульований порошок від жовтого до світло-коричневого кольору. Не має запаху. Видаляє жирні забруднення. Миючий засіб.	Сповільнює корозію. Застосовується при обробці волокон, тканин, скла, дерева, обладнання, лабораторного посуду та інших різних типів поверхонь.	Робочі розчини мають концентрацію 0,2-0,5%.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів.	1л коштує 156 грн	[17]

Септофан (ТОВ "Українські Хімічні Технології ЛТД")	алкілдиметилбензиламоній хлорид (ЧАС) – 10,0 %, дидецилдиметиламоній хлорид (ЧАС) – 7,5%, діоктилдиметиламоній хлорид – 7,5%, полігексаметиленгуанідин гідрохлорид	Бактерії, віруси, гриби, спори	Прозора або опалесцентна рідина, іноді з легким жовтуватим відтінком або забарвленням, зумовленим наявністю барвника. Може мати слабкий запах активних компонентів або ароматизатора. Допустиме утворення осаду, який не знижує ефективності дезінфекції. Засіб легко змішується з водою у будь-яких пропорціях. Робочі розчини мають не лише дезінфікуючі, а й миючі властивості, забезпечуючи ефективне видалення механічних забруднень та	сумісний із більшістю твердих непористих поверхонь, зокрема з нержавіючою сталлю, склом, керамікою, харчовими пластиками. Не рекомендується застосування на полімерних поверхнях, чутливих до спиртів, а також на лакованих чи дерев'яних елементах без попереднього тестування.	Робочі розчини мають концентрацію 0,1-5%.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року. Дата внесення: 28.04.2020 року. Термін дії до: 28.04.2025 року.	1 л коштує 270 грн	[18, 24]
--	--	--------------------------------	--	--	---	--	--------------------	----------

	(ПГМГ ГХ) - 0,25%, 2-пропанол - 5%, вода демінералізована - до 100%.		жирових, залишки крові, лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення.					
--	--	--	--	--	--	--	--	--

5.4. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів

Для виробництва β -амілази *Bacillus polymyxa* BWB-01 необхідно підготувати таке обладнання: реактор об'ємом 10 л, інокулятор об'ємом 10 л, реактор об'ємом 100 л, інокулятор об'ємом 100 л, ферментер об'ємом 1 м³, качалка для колб та лабораторне устаткування. Виробництво даного ферменту відбувається протягом 30 днів і для цього необхідні наступні приміщення: цех для виробничого біосинтезу, приміщення з качалками для колб та мікробіологічна лабораторія (з наявністю термостатів, боксів, обладнанням для проведення контролю та іншими необхідними апаратами).

Приблизне планування виробничого приміщення для виробництва нашого ферменту виробництва β -амілази зображено на ескізі (Рис.5.1). На даному ескізі намальовано та прописано діаметри вище вказаного необхідного обладнання та відповідну відстань між ним. Візьмемо до уваги, що ферментер має розмір 1 м³, а також ми маємо ще розмістити у приміщенні, зокрема, реактори та інокулятори, то, базуючись на будівельних нормах, для виробничого цеху ми обираємо наступні розміри: довжина- 6 м, ширина-18 м.

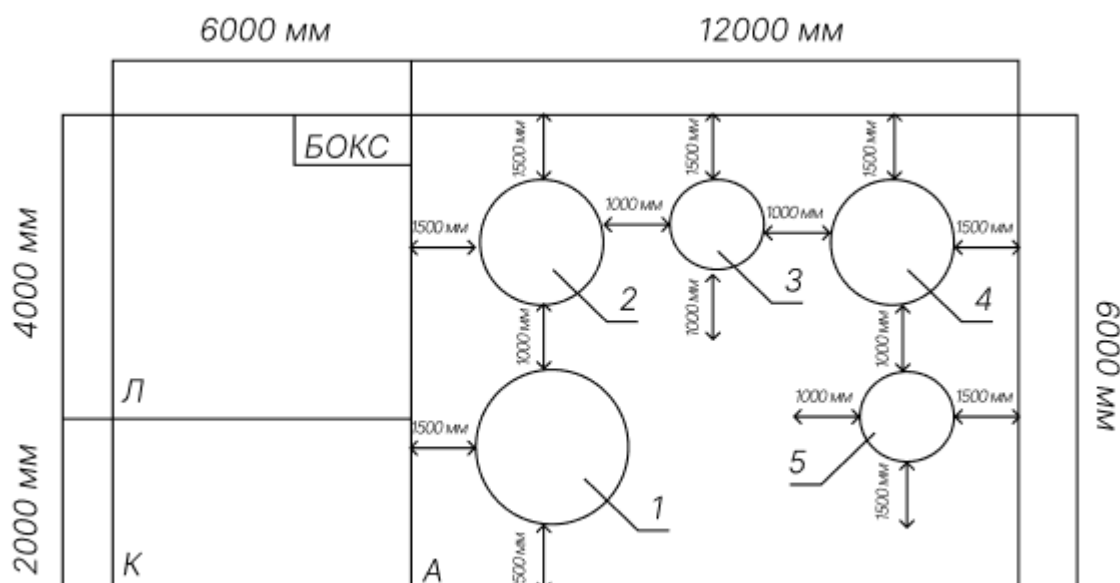


Рис. 5.1 Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва β -амілази *Bacillus polymyxa* BWB-01. А – цех виробничого біосинтезу та

вирощування інокуляту (1 – ферментер об’ємом 1000 л, 2 – інокулятор (І-17) об’ємом 100 л, 3 – реактор-змішувач (Р-22) для приготування композиції А об’ємом 100 л, 4 - інокулятор (І-12) об’ємом 10 л, 5 - реактор-змішувач (Р-15) для приготування композиції А об’ємом 10 л, Л – мікробіологічна лабораторія, К – приміщення з качалками)

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва β-амілази *Bacillus polytuxa* BWB-01 наведено у таблиці (Таблиця 5.2).

Таблиця 5.2

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва β-амілази *Bacillus polytuxa* BWB-01

Обладнання	Геометричний об’єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер 1м ³	1000	1,4	2,3
Реактор-змішувач (Р-9) для приготування композиції А об’ємом 10 л	10	0,42	0,5
Інокулятор (ІН-10) об’ємом 10 л	10	0,42	0,5
Реактор-змішувач (Р-12) для приготування композиції А об’ємом 100 л	100	0,86	1,6
Інокулятор (ІН-14) об’ємом 100 л	100	1,9	1,6
Всього	1220		

Отже, обрахувавши загальний геометричний об’єм апаратів, поданих у таблиці (Таблиця 5.2), визначили, що він становить 1,220 м³.

Для забезпечення та підтримання чистоти даних виробничих приміщень, має бути забезпечене щоденне миття підлоги (тобто 30 разів), а

також генеральне прибирання- один раз на місяць (під час генерального прибирання триває миття та обробка приміщення: стін, вікон, підлоги, дверей тощо). Для того, аби розуміти необхідну площу для використання мийно-дезінфікувальних засобів для забезпечення щоденного та генерального миття, потрібно її розрахувати, враховуючи площу стін на висоту та підлоги.

У нашій технології виробництва фермента використовуються самоплини, які знаходяться вище ферментера. У розробленій технологічній схемі два реактори розміщені на висоті 2,7 м від ферментера.

1) Розрахуємо площу підлоги у виробничому цеху:

Довжина= 6 м

Ширина= 12 м

Отже, $6 \times 12 = 72 \text{ м}^2$

Розрахуємо площу стін у виробничому цеху:

$[(12 \times 2,5) + (6 \times 2,5)] \times 2 = 90 \text{ м}^2$

Розрахуємо загальну площу:

$72 + 90 = 162 \text{ м}^2$

2) Розрахуємо площу підлоги у мікробіологічній лабораторії:

Довжина= 4 м

Ширина= 6 м

Отже, $6 \times 4 = 24 \text{ м}^2$

Розрахуємо площу стін у мікробіологічній лабораторії:

$[(2,5 \times 4) + (2,5 \times 6)] \times 2 = 50 \text{ м}^2$

Розрахуємо загальну площу:

$24 + 50 = 74 \text{ м}^2$

3) Розрахуємо площу підлоги у приміщенні з качалками:

Довжина= 6 м

Ширина= 2 м

Отже, $6 \times 2 = 12 \text{ м}^2$

Розрахуємо площу стін у виробничому цеху:

$[(2,5 \times 2) + (2,5 \times 6)] \times 2 = 40 \text{ м}^2$

Розрахуємо загальну площу:

$$12+40= 52 \text{ м}^2$$

Загальна площа поверхонь для використання мийно-дезінфікувальних засобів вказана у таблиці (Таблиця. 5.3).

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м²	Площа стін, м²	Загальна площа, м²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	72	90	162
Мікробіологічна лабораторія	24	50	74
Приміщення з качалками	12	40	52
Загальна площа	108	180	288

Кількість виробничих циклів для одержання β -амілази становить 16,5 (приймаємо як 17). Миття обладнання відбувається перед, протягом та після завершення виробництва, то за весь час виробництва миття буде відбуватись 19 разів. Тоді загальний об'єм миття обладнання становитиме:

$$1,220 \times 19 = 23,18 \text{ м}^3$$

Аналогічним чином рахуємо кількість разів миття підлоги та стін, дверей, вікон. Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в таблиці (Таблиця 5.4).

Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за весь цикл виробництва *β*-амілази *Bacillus polymyxa* BWB-01

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	1,220	19	23,18
Підлога	108	30	3240
Стіни, двері, вікна	288	1	288

Процес очищення виробничого обладнання більших об'ємів здійснюється СІР-мийкою (використовується менша витрата розчину, ніж при ручному митті- близько 30% від загального об'єму ємностей). Прийmemo, що витрата складає 25% від загального об'єму ємностей. Тому для миття та дезінфекції 23,18 м³ обладнання необхідна така кількість засобу:

$$23,18 \times 0,25 = 5,795 \text{ м}^3 \text{ засобу/рік}$$

Аналогічним чином розраховуємо кількість засобу для миття та дезінфекції приміщення. Для зручності результати наших обрахунків та додаткову інформацію про дезінфікуючі засоби зобразимо в таблиці (Таблиця 2.5). Оскільки при виборі необхідних мийних та дезінфікуючих засобів необхідно звертати увагу на такі характеристики як ефективність та ціну, а також кількість засобу для необхідної площі чи об'єму апаратів/приміщень, то варто обирати найоптимальніші варіанти засобів.

Також візьмемо до уваги, що зазвичай для обробки 1 м² поверхні витрачається 100 мл розчинів мийно-дезінфікуючого засобів.

Таблиця 5.5

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва β -амілази

Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Фамідез Ендо (ЧАС, дідецилметилполі (оксиетил) амонію пропіонату, кокоспропілендіамінгуа нідину ацетату)	Дезінфекція обладнання	0,5	23180	5795	818	4,09	23 702
Стериокс (надоцтова кислота)	Дезінфекція обладнання	0,07	23180	5795	156	0,109	632
Diversey Divosan HS 35 (на основі перекису водню)	Дезінфекція обладнання	0,1	23180	5795	260	0,26	1507

Закінчення Таблиці 5.5

Supra Prima (вода демінералізована, гідроксид натрію, 10- 15% неіоногенні ПАВ, барвник)	Миття обладнання	1	23180	5795	183	1,83	10 605
Каустична сода (натрій гідроксид)	Миття обладнання	1,5	23180	5795	44	0,66	3825
Хлорамін Б (натрієва сіль хлораміду бензолсульфо кислоти)	Поверхні обладнання, приміщень	0,5	3708	2265	750	3,75	8494
Сульфанол (алкілбензолсульфонат натрію)	Поверхні обладнання, приміщень	0,5	3708	2265	156	0,78	1767
Септофан	Поверхні обладнання, приміщень	0,1	3708	2265	270	0,27	612

Проаналізувавши узагальнену характеристику витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва β -амілази (Таблиця 5.5) стосовно необхідної кількості та відповідної ціни наведених мийно-дезінфікуючих засобів для обробки приміщень, було обрано найоптимальніші та ефективні дезінфікувальні засоби- Сульфанол та Септофан, які мають порівняно низьку вартість для використання для всього періоду виробництва. За такими ж критеріями було обрано дезінфікувальні засоби для обробки обладнання- Стериокс та Diversey Divosan HS 35. Як було зазначено, засоби будуть чергуватись між собою кожні 3 місяці для уникнення появи стійких штамів мікроорганізмів. Як мийний засіб було обрано каустичну соду.

5.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу β -амілази *Bacillus polymyxa* BWB-01 використовується середовище такого складу (г/л) [66]:

- ✓ Крохмаль- 5 г/л;
- ✓ Солодовий екстракт- 5 г/л;
- ✓ NaCl - 3 г/л.

Для приготування потрібно розділити на наступні композиції (ті, що взаємопов'язані із режимом стерилізації і ті, що мають взаємний вплив деяких компонентів).

Для підготовки розчинного крохмалю необхідно крохмаль залити холодною водою і дочекатися його набухання. Далі нагріти воду до кипіння (80°C) повільно, внести набухлий крохмальний розчин при постійному перемішуванні.

Підготовка розчину крохмалю здійснюється на всіх етапах приготування посівного матеріалу та на етапі виробничого культивування аналогічним чином.

5.5.1. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці

Після аналізу складу поживного середовища встановлено, що для вирощування *Bacillus polymyxa* BWB-01 не потрібен поділ на композиції, адже взаємодії між NaCl та крохмалем чи солодовим екстрактом не буде. Тому буде лише одна композиція А.

Композиція А: крохмаль, солодовий екстракт, NaCl (режим стерилізації: 112°C, 30 хв, 0,05 МПа).

Таблиця 5.6

Підготовка поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компоненту в 495 мл поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Крохмаль	5	2,48	А	495
Солодовий екстракт	5	2,48		
NaCl	3	1,49		
Вода		495 мл		
			РАЗОМ:	495

Для приготування та стерилізації композиції А наважку крохмалю зважують на технічних терезах. Наважку помішають у термостійку колбу об'ємом 1 л та наливають 295 мл холодної води. Суміш ретельно перемішують, після чого витримують час для набухання крохмалю та ставлять колбу на водяну баню. Температура заварювання має становити 80°C, а тривалість процесу близько 30 хв. Далі розчин крохмалю наливають в колбу об'ємом 1 л, додаємо наважку солодового екстракту та NaCl. Загальний об'єм композиції доводять до 495 мл. Підготовка розчину

крохмалю аналогічно здійснюється на всіх етапах приготування посівного матеріалу та на етапі виробничого культивування.

5.5.2. Підготовка і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Для підготовки поживного середовища для посівних апаратів не потрібен поділ на композиції, адже взаємодії між NaCl та крохмалем чи солодовим екстрактом не буде. Тому буде лише одна композиція А.

Композиція А: крохмаль, солодовий екстракт, NaCl (режим стерилізації: 112°C, 30 хв, 0,05 МПа).

Таблиця 5.7

Розрахунок поживного середовища для стадії підготовки інокуляту в інокуляторі на 10 л

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компонента в 4,95 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	5	24,8	А	4,95
Солодовий екстракт	5	24,8		
NaCl	3	14,9		
Вода		4,5 л		
Конденсат		0,45 л		
			РАЗОМ:	4,95

Для приготування та стерилізації композиції А слід передбачити наявність інокулятора 10 л. Кількість поданої води контролюють шляхом лічильника. На цьому етапі компоненти відважують на технічних вагах.

Підготовку розчину крохмалю здійснюють за вищеописаним принципом (див. підрозділ 5.5.1).

Таблиця 5.8

Розрахунок поживного середовища для стадії підготовки інокуляту в інокуляторі на 100 л

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компонента в 45 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	5	225	А	45
Солодовий екстракт	5	225		
NaCl	3	135		
Вода		40,9 л		
Конденсат		4,1 л		
			РАЗОМ:	45

Для приготування та стерилізації композиції А слід передбачити наявність інокулятора 100 л. Кількість поданої води контролюють шляхом лічильника. На цьому етапі компоненти відважують на технічних вагах.

Підготовку розчину крохмалю здійснюють за вищеописаним принципом (див. підрозділ 5.5.1).

5.5.3. Підготовка і стерилізація поживного середовища для виробничого культивування у ферментері на 1 м³

Поживне середовище для виробничого ферментера буде проходити стерилізацію в самому ферментері.

Підготовку розчину крохмалю здійснюють за вищеописаним принципом (див. підрозділ 2.2.1).

Композиція А: крохмаль, солодовий екстракт, NaCl (режим стерилізації: температура 130°C, тривалість 7 хв, тиск 0,15 МПа).

Таблиця 5.9

Розрахунок поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері на 1 м³

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компоненту в 410 л поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	5	2,05	А	410
Солодовий екстракт	5	2,05		
NaCl	3	1,23		
Вода		372,7 л		
Конденсат		37,3 л		
			РАЗОМ:	410

Для зважування компонентів використовують ваговий дозатор. Для даної стадії передбачають стерилізацію у ферментері. Режим стерилізації - температура 130°C, тривалість 7 хв, тиск 0,15 МПа.

Отже, виробничий біосинтез ферменту буде проходити із забезпеченням таких допоміжних стадій:

- Підготовка та стерилізація компонентів поживного середовища для колб та інокуляторів, ферментера.

Забезпечують підготовку відповідного допоміжного обладнання:

- Для підготовки та стерилізації композиції А – інокулятор 10 л, 100 л.

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки біосинтезу β -амілази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	<p>Повітряний компресор з повітряним охолодженням SA 2100. Швидкість потоку - від 1200 м³/год. Двигун 150 – 260 кВт. Тиск на виході 3,5 - 11,4 бар. Компанія: «Hanwha Power Systems» (Корея) [67]</p>
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	<p>Фільтр грубого очищення моделі 50-200/G4-6P. Продуктивність 1200 м³/год. Початковий перепад тиску 6 Па. Клас фільтра: G4 / ISO Coarse 60%. Термостійкість: макс. 80 °C Фільтруючий матеріал: міцні синтетичні волокна. Рекомендований кінцевий перепад тиску: 200 Па. Каркас: пластик або оцинкована листовая сталь. Компанія: «SF-Filter AG» (Швейцарія) [68]</p>

НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Аркушів
		Москаленко Р.О.						
		Буценко Л.М.					67	98
						Кафедра БТМ		
		Стабніков В.П.						

Продовження таблиці 6.1

К-3	Компресор	1	Безмасляний гвинтовий повітряний компресор з фіксованою швидкістю з водяним змащенням DMW-22G. Робочий тиск 7~10 бар. Продуктивність 3,7 м ³ /хв. Виготовлений з нержавіючої сталі 304. Компанія: «Dream (Shanghai) Compressor Co., Ltd.» (Китай) [69]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник повітряного компресора. Тип - Ф16/Ф9.52/Ф12.7 мідна трубка з алюмінієвим ребром. Робочий теплоносій – холодна або гаряча вода. Робочий тиск ≤1,6 МПа. Компанія: «Shanghai Venttech Refrigeration Equipment Co.,Ltd» (Китай) [70]
Р-5	Ресивер	1	Повітряний ресивер із вуглецевої сталі об'ємом 15 000 л. Тиск 10 бар. Установка: вертикальна. Компанія: «Qingdao» (Китай) [71]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник повітряного компресора. Тип - Ф16/Ф9.52/Ф12.7 мідна трубка з алюмінієвим ребром. Робочий теплоносій – холодна або гаряча вода. Робочий тиск ≤1,6 МПа. Компанія: «Shanghai Venttech Refrigeration Equipment Co.,Ltd» (Китай) [70]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Високоєфективний фільтр головного очищення повітря серії YFB з активованим вугіллям. Видаляє частки розміром більше 1 мкм, залишковий вміст масляних парів не перевищує 0,6 мг/м ³ . Фільтруючий елемент може використовуватися протягом 6000 ~ 8000 годин у робочому середовищі при температурі 1,5 ~ 80 °С, тиску нижче 1,6 МПа. Продуктивність 19 м ³ /хв (близько 1200 м ³ /год). Компанія: «VATA AIR COMPRESSOR» (Таїланд) [72]

Ф-11 Ф-15 Ф-18	Індивідуальний фільтр	3	Фільтр стисненого повітря з високою ефективністю фільтрації. Продуктивність 15 м ³ /хв (діапазон від 1,2 до 25 м ³ /хв). Робочий тиск 16 бар. Ефективність очищення 99,9%. Матеріал – нержавіюча сталь та синтетичний наповнювач, стійкий до високих температур (120°C). Компанія: «Shanghai Sunwin Industry Co., Ltd.» (Китай) [73]
Д-8 Д-13	Ваги технічні	2	Ваги лабораторні ТВЕ у нержавіючому корпусі з внутрішнім градуванням, модель ТВЕ-6-0,1-N-a-2. Мінімальна межа 0,5 г, максимальна межа зважування – 6000 г (6 кг). Матеріал платформи нержавіюча сталь. Компанія: «Техноваги» (Україна) [74]
Р-9	Реактор 10 л	1	Реактор 10 л TFS-10L. Рамка виготовлена із нержавіючої сталі, реактор- зі стійкого борсилікатного скла. Частота обертання мішалки 0-600 об/хв. Потужність: 220 Вт. Компанія: «Tefic» (Китай) [75]
Н-16 Н-19	Насос	2	Мембранний насос-дозатор LEWA esoflow. Діафрагма виготовлена з PTFE. Можливість роботи діафрагми в діапазоні тиску до 800 бар. Тип M800. Швидкість потоку до 1,1 м ³ /год. Температура - -10/+60 °C. Компанія: «LEWA GmbH» (Німеччина) [76]
ІН-10	Інокулятор 10 л	1	Інокулятор BLBIO 10SJ об'ємом 10 л. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L. Потужність: 220Вт. Обладнаний сорочкою, датчиками температури, кислотності, кисню, мішалкою до 200 об/хв. Розміри: 890x660x1600 мм [77]
Р-12	Реактор 100 л	1	Реактор об'ємом 100 л. Має мішалку та сорочку. Виготовлений з нержавіючої сталі марки 304. Швидкість роботи перемішуючого пристрою 0-600 об/хв. Компанія: «Ukrchemgroup» (Україна)[78]

Закінчення таблиці 6.1

ІН-14	Інокулятор 100 л	1	Інокулятор BLBIO 100SC об'ємом 100 л. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L. Потужність: 380Вт. Обладнаний сорочкою, датчиками температури, кислотності, кисню, мішалкою до 200 об/хв. Розміри: 1400x820x2200 мм [79]
Д-20	Дозатор ваговий	1	Ваги бункерні Норма-ТН. Продуктивність ваг - до 70 м ³ /год. Похибка зважування 0,1 %. Вага однієї порції – до 80 кг. Робочий об'єм вагового бункера – 80 л. Витрата стисненого повітря при тиску 4 атм не більше 8,0 м ³ /годину. Компанія: «ПРОМ-СПС» (Україна) [80]
ФР-17	Ферментер 1 м ³	1	Циліндро-конічний ферментер ССТ-1000N. Розміри 1372 x 1372 x 2311 мм. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 304. Встановлена система СІР, мембранний манометр. Компанія: «Czech brewery system s.r.o.» (Чехія) [81]

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми біосинтезу β -амілази

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря проводять за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1), над верхнім краєм даху будівлі близько 2 м - на висоті 14 м.

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

Попереднє очищення повітря проводять через фільтр грубого очищення моделі 50-200/G4-6P з міцних синтетичних волокон (Ф-2). Ступінь очищення від грубих домішок становить $E = 60\%$.

ДР 1.3. Компресіювання повітря

Далі з метою забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини у ферментаційному обладнанні, інших опорів, а також для інших виробничих потреб, проводять стиснення повітря у компресорі (К-3), відбувається нагрівання до 120-200 °С, значення тиску становить 0,35 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря з компресора К-3 надходить на охолодження в теплообміннику (Т-4) до температури 25-30 °С для видалення надлишкової вологи, яку видаляють у ресивері (Р-5). Також в Р-5 проходить усунення пульсацій руху повітря, що можуть несприятливо впливати на роботу наступних фільтрів очищення повітря. Вологість повітря складає 60-70%.

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Москаленко Р.О.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми біосинтезу β -амілази	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					71	98
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Через утворення конденсаційної пари на наступних етапах очищення повітря, його слід піддати нагріванню. Тому повітря направляють до теплообмінника-нагрівача Т-6. На виході температура повітря становить 33-35°C. Під час надходження повітря на наступну стадію відбуваються втрати тепла, тому кінцева температура повітря буде дещо нижчою.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Підігріте повітря направляють до головного фільтру Ф-7 серії YFB з активованим вугіллям. Фільтр видаляє частки розміром більше 1 мкм – ступінь очистки близько $E = 96 \%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

На цій стадії повітря поступає до фільтрів стисненого повітря Ф-14, Ф-22, Ф-30. Матеріал виконання – нержавіюча сталь та синтетичний наповнювач. Дані фільтри встановлюють безпосередньо перед інокуляторами та ферментером. Ефективність видалення частинок 99,9%.

ДР 2. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1. Приготування розчинного крохмалю

На технічних терезах зважують крохмаль (концентрація 40 г/л) необхідного об'єму. Наважку поміщають у термостійку колбу чи реактор певного об'єму і наливають необхідну кількість холодної водопровідної води з допомогою лічильника. Витримують час набухання крохмалю. Далі до крохмального розчину додають нагріту воду до 80°C певного об'єму, постійно перемішуючи. Якщо це заварювання розчинного крохмалю для колб, то колбу ставляють на водяну баню. Якщо це заварювання розчинного крохмалю для реактора, то до реактора подають глуху пару та певний об'єм води для підтримки t процесу. Температура заварювання має становити 80°C і тривалість загального процесу близько 30 хв.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для колб

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

Для приготування та стерилізації композиції А наважку крохмалю 2,48 г зважують на технічних терезах і в мірному стакані заливають 295 мл холодної води, перемішують, витримують до набухання та ставлять колбу на водяну баню. Температура заварювання має становити 80°C, а тривалість процесу близько 30 хв. Далі розчин крохмалю наливають в колбу об'ємом 1 л. Зважують на технічних терезах наважку солодового екстракту 2,48 г та 1,49 г NaCl і додають до крохмалю. Загальний об'єм композиції доводять до 495 мл і перемішують. Закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві 30 хв при 112 °С, 0,05 МПа.

ДР 2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 10 л

ДР 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через технічні терези (Д-8) подають 24,8 г крохмалю та 1 л холодної питної води в реактор-змішувач (Р-9) об'ємом 10 л. Витримують час набухання крохмалю. Далі до крохмального розчину додають нагріту воду до 80°C об'ємом 1 л, постійно перемішуючи. Далі сюди ж через технічні терези (Д-8) подають 24,8 г солодового екстракту і 14,9 г NaCl та 1,95 л питної води та перемішують. Отриману суспензію стерилізують гострою парою за температури 112 °С, 0,05 МПа (30 хв). Проводиться мікробіологічний контроль.

ДР 2.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 100 л

ДР 2.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через технічні терези (Д-13) подають 225 г крохмалю та 10 л холодної питної води в реактор-змішувач (Р-12) об'ємом 100 л. Витримують час

набухання крохмалю. Далі до крохмального розчину додають нагріту воду до 80°C об'ємом 10 л, постійно перемішуючи. Далі сюди ж через технічні терези (Д-13) подають 225 г солодового екстракту і 135 г NaCl та 10 л питної води та перемішують. Отриману суспензію стерилізують гострою парою за температури 112 °С, 0,05 МПа (30 хв). Проводиться мікробіологічний контроль.

ДР 2.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 1 м³

ДР 2.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через ваговий дозатор (Д-20) подають 2,05 кг крохмалю та 150 л холодної питної води до ферментера (ФР-17) об'ємом 1 м³. Витримують час набухання крохмалю. Далі до крохмального розчину додають нагріту воду до 80°C об'ємом 150 л, постійно перемішуючи. Далі сюди ж через ваговий дозатор (Д-20) подають 2,05 кг солодового екстракту, 1,23 кг NaCl та 300 л питної води та перемішують. Отриману суспензію стерилізують у ферментері за температури 130°C, 0,15 МПа (7 хв). Проводиться мікробіологічний контроль.

ТП 3. Підготовка поживного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bacillus polymyxa* BWB-01 зберігають та підтримують на поживному середовищі – м'ясо-пептонний агар (МПА). Для цього його розливають в пробірки та чекають поки агар застигне під кутом 45°. Пересіви здійснюємо кожні 3 місяці. Всі роботи за колекційною культурою проходять строго в стерильних умовах. Проводиться мікробіологічний контроль.

ТП 3.2. Одержання робочої культури з колекційної

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках на середовищі м'ясо-пептонного агару, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 30°C упродовж 48 год. Проводиться мікробіологічний контроль.

ТП 3.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані з ізольованих колоній (від ТП 3.2) пересівають петлею в пробірки зі м'ясо-пептонним агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування 48 год, температура 30 °С. Проводиться мікробіологічний контроль.

ТП 3.4. Вирощування культури в колбах

Готове поживне середовище із колби 1 л (від ДР 2.1.1) розливають по 137 мл в 4 стерильні колби об'ємом 750 мл. У пробірку з робочою культурою *Bacillus polymyxa* BWB-01, вирощеною на МПА агаризованому середовищі, вносять 5 мл стерильної питної води, за допомогою петлі суспендують клітини і піпеткою в асептичних умовах відбирають одержану суспензію та вносять у колби з розлитим поживним середовищем.

Для засіву однієї колби використовують біомасу, одержану з однієї пробірки. Після вирощування у колбах на качалці 220 - 250 об/хв впродовж 56 год при 40 °С проводять мікробіологічний контроль (беруть з кожної колби), а потім культуральну рідину в асептичних умовах з колб переносять в засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 3.5. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті 10 л

Простерилізовану композицію А (від ДР 2.2.1) з допомогою самоплину перекачують до інокулятора (ІН-10) об'ємом 10 л. В асептичних

умовах до інокулятора ІН-10 із засівної колби 1 л подають посівний матеріал (від *ТП 3.4*).

Вмикають перемішуючий пристрій до швидкості обертів 180-200 об/хв. Рівень аерації повинен бути близько 1,5 л/л/хв, повітря подають барботером через індивідуальний фільтр Ф-11. Значення температури контролюють на рівні 40°C, рН – на рівні 6,0. Тривалість процесу вирощування 24 години.

Кожні 5-6 годин відбирають проби для мікробіологічного аналізу та аналізу процесу ферментації (відсутність сторонньої мікробіоти, концентрації біомаси, кількість вуглецю і азоту) у культуральній рідині.

ТП 3.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті 100 л

Простерилізовану композицію А (від *ДР 2.3.1*) з допомогою самоплину перекачують до інокулятора (ІН-14) об'ємом 100 л. Через трубу перетискування до інокулятора ІН-14 подають посівний матеріал з інокулятора ІН-10 (від *ТП 3.5*).

Вмикають перемішуючий пристрій до швидкості обертів 180-200 об/хв. Рівень аерації повинен бути близько 1,5 л/л/хв, повітря подають барботером через індивідуальний фільтр Ф-15. Значення температури контролюють на рівні 40°C, рН – на рівні 6,0. Тривалість процесу вирощування 24 години.

Кожні 5-6 годин відбирають проби для мікробіологічного аналізу та аналізу процесу ферментації (відсутність сторонньої мікробіоти, концентрації біомаси, кількість вуглецю і азоту) у культуральній рідині.

ТП 4. Виробничий біосинтез

ТП 4.1. Виробниче культивування у ферментері 1 м³

У ферментері ФР-17 об'ємом 1 м³ відбувається стерилізація поживного середовища від ДР 2.4.1. Через насос (Н-16) до ферментера ФР-17 подають посівний матеріал з інокулятора ІН-14 (від ТП 3.6).

Упродовж процесу біосинтезу відбувається перемішування зі швидкістю 180-200 об/хв, чим забезпечується масообмін. Перемішування має бути постійним для забезпечення постійної розчинності повітря. Рівень аерації повинен бути близько 1,5 л/л/хв, повітря подають барботером через індивідуальний фільтр Ф-18. Значення температури контролюють на рівні 40°C, рН – на рівні 6,0. Тривалість процесу біосинтезу 48 години.

Кожні 5-6 годин відбирають проби для мікробіологічного аналізу та аналізу процесу ферментації (відсутність сторонньої мікробіоти, концентрації біомаси, кількість вуглецю і азоту) у культуральній рідині.

РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення β -амілази

Необхідним і важливим етапом у отриманні готового ферментного препарату є виділення та очищення цільового ферменту. Цей процес дозволяє ізолювати β -амілазу з комплексної біологічної суміші, видалити небажані домішки, зберігши при цьому її ферментативну активність. Згідно зі статтею [26], процедура очищення включала три основні стадії: кислотну обробку, осадження сульфатом амонію та гель-фільтрацію.

Кислотна обробка

На початковому етапі попереднього очищення екстракту здійснювали контрольоване підкислення. Для цього вихідний розчин ферменту обробляли 1N хлоридною кислотою до досягнення рН 3,6 і витримували протягом 10 хвилин. Така обробка забезпечує селективну денатурацію α -амілази, яка присутня поряд із β -амілазою в культуральному фільтраті, однак є більш чутливою до зниження рН. За даних умов α -амілаза втрачає активність і осаджується, тоді як β -амілаза зберігається у розчиненій формі. Після цього розчин регулювали до рН 4,8, додаючи 3% розчин гідроксиду амонію (NH_4OH), з метою стабілізації β -амілази перед етапом солевого осадження [26].

Осадження сульфатом амонію

У частині виділення та очищення ферменту я орієнтувалась на ключову наукову публікацію щодо біосинтезу β -амілази, де вказано лабораторний метод гель-фільтрації. Проте з огляду на те, що виробництво реалізується на вже діючому біотехнологічному підприємстві, у проекті передбачено заміну цього етапу на двоступеневе осадження сульфатом амонію, яке є прийнятним і ефективним методом очищення для ферментів, що застосовуються в харчовій промисловості.

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Москаленко Р.О.			РОЗДІЛ 8. Основні етапи виділення та очищення β -амілази	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					78	98
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
					Кафедра БТМ			

Тож на цьому етапі проводили сольове осадження білків- метод, що базується на зміні розчинності білків у присутності нейтральних солей.

Перший ступінь осадження: до культурального фільтрату додають сульфат амонію до концентрації 45% насичення. За цих умов осаджуються високомолекулярні забруднюючі білки, які мають нижчу розчинність. Після перемішування при температурі 4 °С та центрифугування, утворений осад видалається.

Другий ступінь осадження: до надосадової рідини, що містить цільову β -амілазу, додають сульфат амонію до 70% насичення. За цих умов цільовий фермент випадає в осад. Після перемішування і повторного центрифугування осад збирають, розчиняють у буфері (наприклад, 25 мМ трис-НСІ, рН 8.0) або у питній воді. У лабораторних умовах використовуються магнітні мішалки об'ємом до 2–5 літрів. У промислових масштабах осадження зазвичай здійснюється у реакторах із механічними мішалками або за допомогою дозованого введення розчину солі. [88, 89]

Осаджений білок розчиняли в 25 мМ трис-НСІ буфері рН 8,0. Далі розчин піддавали діалізу проти того ж буфера при 4 °С для видалення залишків солі. Діаліз тричі оновлювали (по 12 год кожного разу), використовуючи мембрану Spectra/Por з молекулярною масою відсічення (MWCO) 3,500 Да.

Після завершення діалізу зразки центрифугували при 10 000 об/хв протягом 20 хвилин при 4 °С для видалення нерозчинного осаду. Отриманий супернатант, що містив β -амілазу, концентрували шляхом додавання 4 М сахарози- це дозволяло зменшити об'єм зразка без втрати активності ферменту.

Отже, можна виділити такі основні етапи виділення та очищення β -амілази:

- 1. Неочищений розчин ферменту (зберігання культуральної рідини при 4 °С, не більше 24 год)**

2. **Відділення біомаси** (центрифугування при 10 000 об/хв протягом 15 хв при температурі 4 °С)
3. **Попереднє очищення розчину**
 - 3.1 Підкислення 1N розчином хлоридної кислоти (HCl) до рН 3,6 для селективної денатурації α -амілази
 - 3.2 Регулювання 3% розчину амонію гідроксиду (NH₄OH) рН до 4,8 для стабілізації β -амілази
4. **Двоступеневе фракційне осадження білків сульфатом амонію**
 - 4.1. Перше осадження: додавання (NH₄)₂SO₄ до 45% насичення- осад відкидається.
 - 4.2. Друге осадження: доведення до 70% насичення- відбір β -амілази.
 - 4.3 Перемішування на магнітній мішалці при температурі 4 °С для випадання білка (осад відділяють центрифугуванням при 10 000 об/хв протягом 20 хв при температурі 4 °С).
 - 4.4 Розчинення осаду у 25 мМ трис-НСl буфері рН 8,0/питній воді.
5. **Діаліз осаду**
 - 5.1 Проведення діалізу з трикратною зміною буфера 25 мМ трис-НСl з рН 8,0
 - 5.2 Центрифугування для видалення нерозчинних частинок (центрифугування при 10 000 об/хв протягом 20 хвилин при температурі 4 °С).
 - 5.3 Концентрування діалізату 4 М сахарозою.
6. **Аналіз та зберігання очищеної β -амілази.**
 - 6.1 Визначення активності ферменту.
 - 6.2 Зберігання препарату при відповідних умовах (наприклад, заморожування або ліофілізація); очищену β -амілазу зберігають при -20 °С у буферному розчині або шляхом ліофілізації для довготривалого зберігання).

Додатково основні етапи виділення та очищення ферменту зображені на схемі післяферментаційних етапів одержання β -амілази, синтезованої завдяки *Bacillus polymyxa* BWB-01 (Рис.8.1).

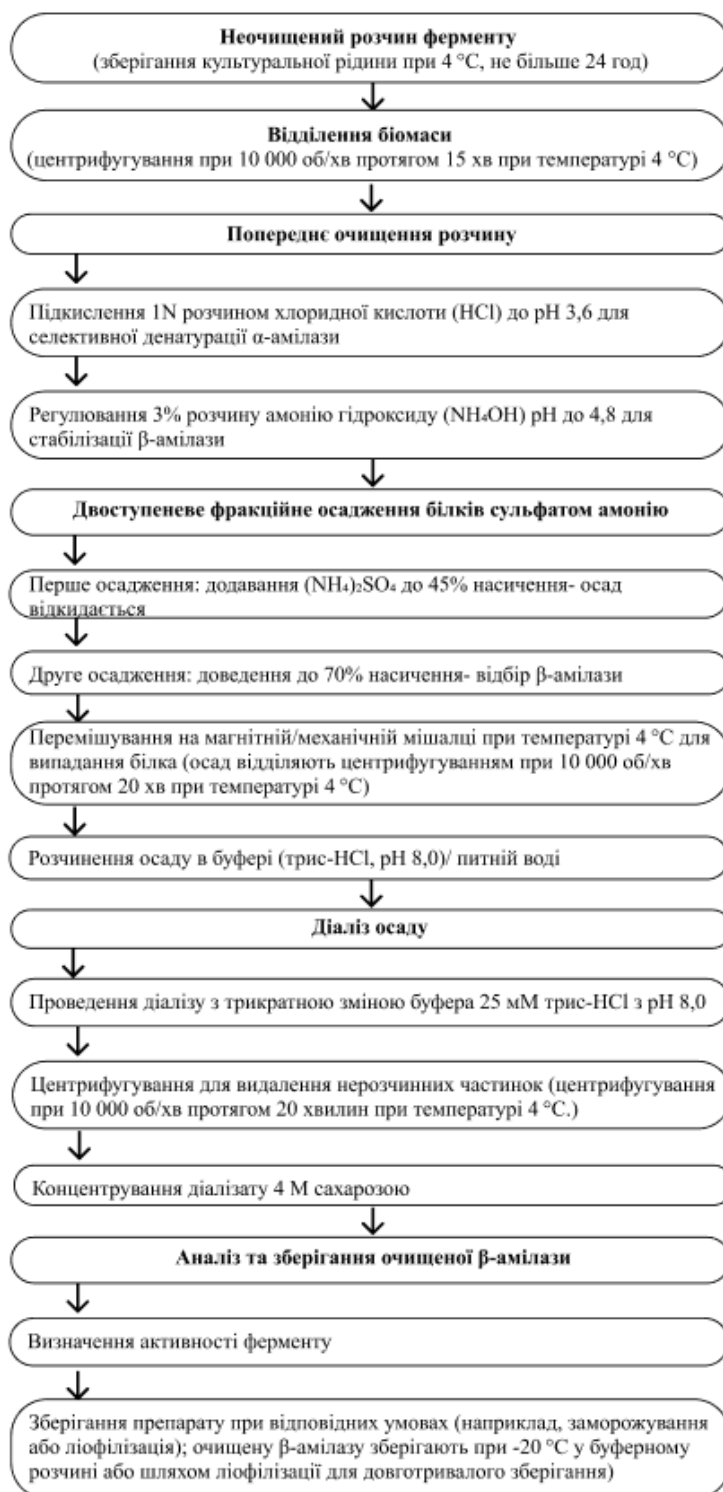


Рис.8.1 Схема післяферментаційних етапів одержання β -амілази, синтезованої завдяки *Bacillus polymyxa* BWB-01

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва β -амілази

9.1. Мікробіологічний контроль

9.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища проводять методом посіву стерильного поживного середовища на щільне поживне середовище- чашки Петрі з відповідним агаризованим середовищем, а також методом мікроскопіювання.

Для проведення посіву стерильного поживного середовища на МПА необхідні такі матеріали та обладнання: проба простерилізованого поживного середовища для культивування *Bacillus polymyxa*; пробірки із МПА, які використовуються саме для виявлення бактерій, та сусло-агаром, що використовуються для виявлення грибів та дріжджів; бактеріологічна петля; штативи для пробірок; термостат.

Принцип методу:

Необхідно відібрати пробу стерильною бактеріальною петлею з проби стерильного поживного середовища і в стерильних умовах (над пальником) нанести її на МПА (посів "штрихом"). Таким самим чином зробити посів і на середовище сусло-агару. Далі штатив із МПА необхідно помістити у термостат з температурою 30°C на 12-24 години, а штатив з засіяним сусло-агаром- у термостат з температурою 25°C на 72 години.

					НУХТ БТЕК 04.02.14 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Москаленко Р.О.			РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва β -амілази	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					82	98
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

Метод мікроскопіювання включає в себе такі етапи: збір зразка, його підготовка та розміщення на предметному склі. Зразок готують методом «роздавленої краплі», далі його розподіляють по предметному скельцю за допомогою бактеріальної петлі, висушують до випаровування всієї вологи. Далі здійснюють мікроскопіювання, яке дозволяє побачити клітини, бактерії або інші мікроорганізми [82].

9.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Даний мікробіологічний контроль дійснюється двома методами: прямий посів на агаризовані поживні середовища та мікроскопіювання.

Прямий висів виконується посівом культуральної рідини на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром для визначення наявності бактерій, а також висів на сусло-агар- для визначення наявності дріжджів чи грибів. Але цей метод є довготривалим по часу, тому не є актуальним для використання. Зазвичай використовують метод мікроскопіювання.

Мікроскопіювання проводять таким самим чином, як вказано у мікробіологічному контролі стерильного поживного середовища методом мікроскопіювання: необхідний світловий мікроскоп з імерсійною системою. В асептичних умовах нанести краплю КР за допомогою простерилізованої бактеріальної петлі на знежирене предметне скельце, діаметр цього мазка має бути близько 1 см. Далі його висушують до повного випаровування вологи, після чого на висушений мазок наносять 1-2 краплі імерсійного масла. За відсутності сторонньої мікробіоти під мікроскопом можна побачити видимі клітини *Bacillus polytuxa* (на *Рис.9.1*) зображені клітини *Bacillus polytuxa* під мікроскопом при збільшенні в 100 раз, які пофарбовані за грамом. Фарбування за грамом виконується таким чином: препарат фарбують генціанфіолетом, далі його змивають дистильованою водою та обережно висушують у полі пальника. При фарбуванні за грамом мікроскопіювання проводять з імерсією, використовуючи при цьому гліцерин) [83].

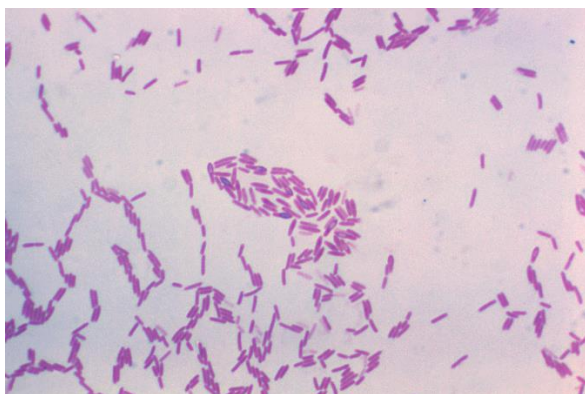


Рис.9.1 Клітини *Bacillus polymyxa* під мікроскопом при збільшенні в 100 раз, пофарбовані за грамом [48]

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

9.2.1. Концентрація біомаси

Визначення концентрації біомаси *Bacillus polymyxa* проводиться методом постійної ваги. Він дозволяє оцінити масу абсолютно сухої біомаси в зразку, шляхом зважування після висихання до постійної ваги.

Визначення: відбирається певний об'єм культуральної рідини, пробу центрифугують при 3000-5000 об/хв для відокремлення біомаси. Далі осаджену біомасу обережно промивають дистильованою водою (щоб видалити залишки середовища) і переносять на попередньо зважене блюдо чи іншу ємність. Біомасу з контейнером зважують для визначення початкової маси перед висушуванням. Зразок біомаси з контейнером розміщують у термостаті при t 105 °С. Висушування триває протягом 20-60 хв. Через певні інтервали часу зразок дістають з термостату, дають йому охолонути в ексикаторі (щоб уникнути поглинання вологи з повітря) і зважують знову. Висушування повторюють, поки маса зразка не залишиться стабільною (різниця між двома наступними зважуваннями не перевищує 0,001 г).

Концентрацію абсолютно сухої біомаси обчислюють шляхом віднімання ваги контейнера від загальної ваги зразка після висушування [84].

9.2.2. Активність цільового продукту

Колориметричний метод аналізу амілази базується на вимірюванні інтенсивності кольору, який утворюється в результаті реакції ферменту з субстратом. Перед визначенням амілолітичної активності культуральну рідину обов'язково попередньо центрифугують, в результаті чого відділяється біомаса.

Принципу методу: здатність амілази гідролізувати крохмаль до мальтози й олігосахаридів. При додаванні розчину йоду, який утворює синьо-фіолетовий комплекс з крохмалем, виникає кількість незруйнованого крохмалю. Інтенсивність залишкового забарвлення у зразку вимірюється спектрофотометрично, що дозволяє оцінити кількість негідролізованого крохмалю і, відповідно, активність амілази.

При підготовці реакційної суміші необхідно змішати зразок амілази з буферним розчином, що містить крохмаль. Далі варто інкубувати суміш при оптимальній температурі (зазвичай 37 °С) протягом визначеного часу (зазвичай 5-10 хвилин). Далі додається розчин йоду (0,5-1 мл розчину йоду на кожен 1 мл реакційної суміші), який взаємодіє з крохмалем, утворюючи синьо-фіолетовий комплекс. Вимірювання оптичної щільності суміші відбувається за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі близько 580-620 нм. Концентрація розраховується на за допомогою порівняння результатів з калібрувальною кривою, побудованою на основі відомих концентрацій амілази [85, 86].

9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом Карбону у нашому поживному середовищі є крохмаль. Визначення будемо проводити за допомогою методу спектрофотометрії.

Принцип методу: гідроліз крохмалю з подальшим колориметричним аналізом, використовуючи динітросаліциловий реактив, при довжині хвилі 540 нм.

Визначення: для початку пробу культуральної рідини центрифугують, біомасу відокремлюють. Далі до нашого фільтрату додають хлоридну кислоту, після чого дану суміш нагрівають ($t=100^{\circ}\text{C}$) на водяній бані (30 хв). Далі суміш охолоджують і додають динітросаліциловий реактив. Витримують суміш на водяній бані при $t 100^{\circ}\text{C}$ 5 хв. Калібрувальну криву будують, використовуючи серію розчинів глюкози, отриманих шляхом розведення нашого розчину з концентрацією 1 г/л [87].

Визначення концентрації джерела азоту

Джерелом органічного амінного азоту у нашому поживному середовищі є солодовий екстракт. Визначення амінного азоту проводиться формольним титруванням (алкаліметрія за методом Серенсена).

Принцип методу: метод заснований на здатності зв'язувати формальдегідом вільні аміногрупи з утворенням метиленових похідних аміноксилот. При цьому амінокислоти втрачають свої основні властивості, а вільні карбоксильні групи відтитровують розчином лугу.

У 25-ти мл колбу наливають 3 мл культуральної рідини, далі додають краплю 0,1%-го спиртового розчину фенолфталеїну і потім краплинами додають 0,1 н. розчин їдкого натру до почервоніння рідини. Далі доливають 2 мл формольної суміші, після чого почервоніння рідини зникає. Потім проводять титрування 0,1 н. розчином гідроксиду натрію і знову з'являється червоне забарвлення.

Далі необхідно провести обчислення амінного азоту у досліджуваному матеріалі. Для цього використовують таку формулу:

$$X = \frac{V \times K \times 1.4}{N} \times 100\%$$

, де V – кількість розчину 0,1 моль/л NaOH, яка пішла на титрування досліджуваного розчину; K – поправка до титру розчину натрію гідроксиду (0,1 моль/л); 1,4 – кількість амінного азоту в мг, еквівалентне 1 мл розчину

натрію гідроксиду (0,1 моль/л); N – кількість досліджуваного розчину, г або мл; 100% – коефіцієнт перерахунку мг у відсотки [44].

ЛІТЕРАТУРА

1. Das, R., & Kayastha, A. M. (2019). β -Amylase: general properties, mechanism and panorama of applications by immobilization on nano-structures. *Biocatalysis: Enzymatic basics and applications*, 17-38.
2. Порошок β -амілази [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.megazyme.com/beta-amylase-barley-powder>
3. Goesaert, H., Slade, L., Levine, H., & Delcour, JA (2009). Амілази та зміцнення хліба – комплексний погляд. *Journal of cereal science* , 50 (3), 345-352.
4. Grime, K. H., & Briggs, D. E. (1995). Release and activation of barley β -amylase. *Journal of the Institute of Brewing*, 101(5), 337-343.
5. Bhattacharjee, I., Mazumdar, D., & Saha, S. P. (2012). Microbial amylases and their potential application in industries: A review. *Structure*, 18, 19-20.
6. Li, X., & Yu, H. Y. (2011). Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp. LY9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(11), 1837-1843.
7. Mihajlovski, K. R., Radovanović, N. R., Miljković, M. G., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M. D., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2015). β -Amylase production from packaging-industry wastewater using a novel strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS 1. *RSC Advances*, 5(110), 90895-90903.
8. Okada, S., & Higashibara, M. (1974). U.S. Patent No. 3,804,718. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
9. Державний реєстр дезінфекційних засобів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://data.gov.ua/dataset/reestr_dezzasobiv_moz
10. Амілази [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2738/amilazi>

11. Surendra Singhi, Vinni Sharma², Mahonar Lal Soni². (2011). International Journal of Pharma and Bio Sciences, 486-497.
12. Характеристика основних класів ферментів [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://spo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lekcii/730.html
13. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання/ Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук – К: НУХТ, 2019.-252с.
14. PRIMA SUPRA [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://primaterra.ua/ua/p1999522495-schelochnoe-pennoe-moyuschee.html>
15. Дезінфікуючий мийний засіб Diversey Divosan HS 35 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://chisto.ua/brand/diversey/dezinfikuyuchij-mijnij-zasib-diversey-divosan-hs-35-20-1?srsltid=AfmBOopD7mTje6zlwslz4MXOoFY4C3Jd93tNfGq3Pw7Wa7-zkoP_grmK
16. Хлорамін Б [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://novohim.com.ua/catalog/promislova-ximiya-j-sirovina/xloramin-b-2/?srsltid=AfmBOortJxviEBRaWYTOWxORfBQAuMJsV4npLwUseOkSImAy3DJJoS0v>
17. Сульфанол (алкілбензолсульфонат натрію) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.systopt.com.ua/item-sulfanol?srsltid=AfmBOorZzpR8Nor0_yAcms48ZYO4MR_N9sLVpLj7_YMqyq0s2gK4eSbB
18. Септофан [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://storage.ua.prom.st/1574132_septofan_mv.pdf

19. Фамідез Ендо [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://hlorka.in.ua/ua/p692078904-famidez-endo.html?srsltid=AfmBOorM5PK7WFSX5I4JSart9JKYIxpDMmL1XxH5VfOVsHNrz_UqO4IS
20. Стериокс [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/sterioks-baltiachemi-kiev>
21. Каустична сода [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://sata-group.com.ua/ua/p1615813768-kausticheskaya-soda-granulirovannaya.html?srsltid=AfmBOop95g-4S6M--Sg3XkYuMy9zTq15V7JDtB4S7TrfRmk8E6ypVJw_
22. Каустична сода [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kaapri.com.ua/ua/p40466902-soda-kausticheskaya-gidroksid.html>
23. Стериокс [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://interdez.com.ua/wp-content/uploads/2016/09/MV_Sterioks_2013.pdf
24. Септофан 1000 мл [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://clean-ua.com.ua/septofan-1000ml/>
25. Дівозан ХС 35 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lysoform.ua/products/divozan-hs-35-divosan-hs-35/>
26. M. Olajuyigbe, F., & M. Adeniyi, F. (2015). Production, Purification and Partial characterization of moderately thermostable β -amylase from *Bacillus polymyxa* BWB-01. *Current Biotechnology*, 4(2), 187-196.
27. Стандартизація Міністерства охорони здоров'я України. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2020/05/%D0%9D%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%A1%D0%A2-%D0%9D-%D0%9C%D0%9E%D0%97%D0%A3-42-4.0_2020.pdf
28. Державна служба статистики України [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://stat.gov.ua/uk>
29. Hamer, RJ (1995). *Enzymes in the baking industry*. У: Tucker, GA, Woods, LFJ (eds) *Enzymes in Food Processing*. Springer, Boston, MA.

[Електронний ресурс]. Режим доступу: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2147-1_6

30. Beta-Amylase from *Bacillus licheniformis* [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.foodstandards.gov.au/sites/default/files/food-standards-code/applications/Documents/A1220%20Application_Redacted.pdf

31. Totsuka, A., & Fukazawa, C. (1993). Expression and mutation of soybean β -amylase in *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry*, 214(3), 787-794.

32. Okada, S., & Higashibara, M. (1974). U.S. Patent No. 3,804,718. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

33. Muraо, S., Ohyama, K., & Arai, M. (1979). β -Amylases from *Bacillus polymyxa* No. 72. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(4), 719–726.

34. Харчова хімія: тексти лекцій частина друга для студентів напряму підготовки 181 Харчові технології / Уклад.: Гуменюк О.Л. – Чернігів: ЧНТУ, 2018. – 155 с.

35. Про затвердження Порядку проведення державної санітарно-епідеміологічної експертизи матеріалів на дезінфекційні засоби. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0726-04#Text>

36. Ma Y., Shen W., Chen X., Liu L., Zhou Z., Xu F., Yang H. Significantly enhancing recombinant alkaline amylase production in *Bacillus subtilis* by integration of a novel mutagenesis-screening strategy with systems-level 106 fermentation optimization. *Journal of Biological Engineering*. 2016, 10(1). doi:10.1186/s13036-016-0035-2.

37. ПИРОГ Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова,

харчова, природоохоронна»/ Т.П. Пирог, Л.В.Ключка. – К.: НУХТ, 2019. – 81с.

38. Крохмаль водорозчинний [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://shop.hlr.ua/ua/krahmal-vodorastvorimyy-chda-219463.html>

39. Казеїн [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://harkiv-torg.com.ua/ua/p825618913-kazein.html?srsltid=AfmBOoqqHjPDT0IP2326B0ZEqLmtm_2-0JjMZH3dzeNK_daLJmI3i5tf

40. Сіль кухонна [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://shop.silpo.ua/product/sil-rise-kukhonna-929462?gad_source=1&gclid=CjwKCAiArfauBhApEiwAeoB7qDMRg2_a8gcK1cAoJ0Fz4lppLE699ljPBIy6uxB47N5wwg43bxbIvBoCjwQQA_vD_BwE

41. Екстракт кукурудзяний [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p2499693266-ekstrakt-kukurudzyanij-litr.html>

42. М'ясний екстракт гранульований для мікробіології [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://shop.hlr.ua/ua/myasnoy-ekstrakt-granul-dmikrobiologii-500-g-234106.html>

43. Пептон ферментативний [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://shop.hlr.ua/ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>

44. Краснопольский, Ю. М., & Северина, Л. В. (2017). Фармацевтическая биотехнология: основы лабораторных исследований.

45. Xie, J. et al. Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Sci. Rep.* 6, 21329; doi: 10.1038/srep21329

46. Elliot Nicholas Grady, Jacqueline MacDonald, Linda Liu, Alex. Richman Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review// *Microb Cell Fact.*- doi: 10.1186/s12934-016-0603-7.2016

47. Калій хлористий дрібний [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://prom.ua/p1748402714-kalij-hloristyj-melkij.html>

48. Bîlbîie V., Pozsgi N., 1985, Bacteriologie Medicală, vol.II, Ed. Medicală, București.
49. Лал, С., та Табакіоні, С. (2009). Екологія та біотехнологічний потенціал *Paenibacillus polymyxa*: міні-огляд. *Індійський журнал мікробіології*, 49 (1), 2-10.
50. Priest F.G., 2009. Genus I. *Paenibacillus* Ash, Priest and Collins 1994. In: (Eds.) P.D. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3: The Firmicutes*, Springer, 269-295.
51. Buchanan R.E., Gibbons N.E., Cowan S.T., Holt J.G., Liston J., Murray R.G.E., Niven C.F., Ravin A.W., Stanier R.W. (1974) – *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eight Edition*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
52. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?maj00500 .
53. Лекція 7. Тема. Ферменти. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://chemeducation.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/14/2020/02/%D0%9B%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F_7.pdf
54. Доценко В.Ф. Харчова хімія: Конспект лекцій для студентів напряму 6.140101 «Готельно-ресторанна справа» денної форми навчання. – К.: НУХТ, 2010.– 142с.
55. Ioan, David, Alexandru, Rinovetz, Gabriel, Bujancă, Corina, Mi că, Marcel, Danci, Corina, Costescu (2014) The influence of different types of amylase on the bread dough determined through alveographic method. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 20(2), 165-170.
56. BAKING & CONFECTIONARY PRODUCTS FOR THE FOODINDUSTRY|NATURE BIOCHEM [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.naturebiochem.com/downloads/Baking-NATBIO.pdf>

57. В Україні впало споживання хліба та пшениці [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.agravery.com/uk/posts/show/v-ukraini-vpalo-spozivanna-hliba-ta-psenici>
58. Споживання хлібобулочних виробів знижується: українці все більше купують заморожений хліб [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://agroreview.com/content/spozhyvannya-hlibobulochnyh-vyrobiv-znyzhuyetsya-ukrayinczi-vse-bilshe-kupuyut-zamorozhenyj-hlib/>
59. Чисельність наявного населення України на 1 січня Number of Present Population of Ukraine, as of January 1. Державна служба статистики України State Statistics Service of Ukraine [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://db.ukrcensus.gov.ua/PXWEB2007/ukr/publ_new1/2022/zb_%D0%A1huselnist.pdf
60. Barbosa-Ríos, J.A. & Castellón-Jardón, J. & Guadarrama-Lezama, Andrea & Ponce-García, N. & Alvarez-Ramirez, J. & Carrillo-Navas, Hector. (2017). Effect of new generation enzymes addition on the physical, viscoelastic and textural properties of traditional Mexican sweet bread. *Journal of Cereal Science*. 79. 10.1016/j.jcs.2017.10.012.
61. ENZIM Enzyme - Ферменти для харчової і легкої промисловості [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://enzim.prom.ua/ua/g27430397-enzim-enzyme-fermenty>
62. Технологія приготування хліба [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://buklib.net/books/24469/>
63. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.

64. Карлаш, Ю. В. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс] : навч. посібник / Ю. В. Карлаш, В. О. Красінько ; Національний університет харчових технологій. – Київ : НУХТ, 2022. – 373 с.

65. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П. , Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.

66. Muraо, S., Ohyama, K., & Arai, M. (1979). β -Amylases from *Bacillus polymyxa* No. 72. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(4), 719–726.

67. Повітряні компресори з повітряним охолодженням. Серія SA [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://compressors.ua/vidcentrovi-povitryani-ta-gazovi-kompresory%20/tyrbokompresor_sa_seriya

68. Pocket filters / G4 (ISO Coarse 60%) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sf-filter.com/en/products/filters-for-industry/ventilation-and-air-conditioning-filter---5000008/pocket-filters---5000079/g4-coarse-60-pocket-filters/>

69. Oil Free Water Lubricated Fixed Speed Rotary Screw Air Compressor [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.dreamcompressor.com/oil-free-water-lubricated-4-10-bar/oil-free-water-lubricated-fixed-speed-screw.html?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAoae5BhCNARIsADVLzZdUPvbI8tqhz-fEoNt_s_VSmxXBCkwwMAGQg5-b0WO84xN7Y3D9nAQaAm3REALw_wcB

70. Air compressor Heat Exchanger [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.shventtech.com/product_air-compressor-heat-exchanger_23453.html

71. Carbon Steel Air Receiver Tank 15000L 10bar [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://haikong-tank.com/show/?194.html>
72. MAIN LINE FILTER [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.vataaircompressor.com/main-line-filter>
73. 1600 Scfm Inline Compressed Air Filter with High Filtration Efficiency [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sunwinsh.en.made-in-china.com/product/jalUiqZyZpkm/China-1600-Scfm-Inline-Compressed-Air-Filter-with-High-Filtration-Efficiency.html>
74. Ваги лабораторні ТВЕ з нержавіючої сталі [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://labimpex.com.ua/ua/g112180068-vesy-laboratornye-tve?srsltid=AfmBOopVMn8m00LdfN_YajzAb0_Abhv3pbJB5MIssNVOCwtAg8wUicmb
75. Реактор 10 літрів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://ua.tefictch.com/laboratory-reactors/single-layer-glass-reactor/borosilicate-glass-reactors-chemical-reactor.html>
76. LEWA ecoflow® Diaphragm Metering Pump [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.lewa.com/en-AE/pumps/metering-pumps/lewa-ecoflow>
77. CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOGBioreactor-System-Innova-2016.pdf>
78. Реактор 100 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ukrchemgroup.com/ua/p1331285332-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html>
79. Апарати сталіні емальовані з механічним змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс] – режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php

80. Ваги бункерні Норма-ТН [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1672229796-vesy-bunkernye-norma.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pl_a&utm_campaign=КТ_cpc_1_5297199152&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAxKy5BhBbEiwAYiW---c1lHrWxBp2Fd4D5knswcg_XHjdpTWCW3nDvkJSfr604S8xc8yZYBoCd1wQAvD_BwE
81. ССТ-1000N: Циліндроконічний універсальний ферментер [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://eshop.czechminibreweries.com/uk/product/cct-1000n/>
82. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напряму 6.051401 “Біотехнологія” денної форми навчання/ Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010.
83. Пирог, Т. П. Становлення та розвиток мікробіології / Т. П. Пирог // Загальна мікробіологія : підручник. - 2 вид., доп. і перероб. - Київ : НУХТ, 2010.
84. Мотроненко, В. В., Луценко, Т. М., & Дронько, Л. М. (2022). Біотехнології та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології. Рекомендації до виконання практичних робіт.
85. Dangkulwanich, M., Kongnithigarn, K., & Aurnoppakhun, N. (2018). Colorimetric measurements of amylase activity: Improved accuracy and efficiency with a smartphone. *Journal of Chemical Education*, 95(1), 141-145.
86. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів [Електронний ресурс]: Лабор. практикум для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. і заоч. форм навч. / Л.М. Буценко, С.М. Тетеріна, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 102 с.

87. Bahdanovich, P., Axelrod, K., Khlystov, A. Y., & Samburova, V. (2022). Optimized spectrophotometry method for starch quantification. *Analytica*, 3(4), 394-405.

88. Westphal, A. H., & van Berkel, W. J. (2021). Techniques for enzyme purification. *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*, 1-31.

89. Буценко Л.М. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. і заоч. форм навч. / Л.М. Буценко, С.М. Тетеріна. - К.: НУХТ, 2021. – 140 с.