

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

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

**«До захисту в ЕК»**  
Директор інституту (декан факультету)  
Грегірчак Н.М.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

**«До захисту допущено»**  
Завідувач кафедри  
Пирог Т.П.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»  
на тему: Біосинтез циклодекстринглюканотрансферази культивуванням  
*Raenibacillus ehimensis*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

Бондарчук Валерія Ігорівна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Скроцька Оксана Ігорівна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М.  
(прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Федоренко В.В.  
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2020 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь бакалавр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»  
(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Бондарчук Валерії Ігорівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез циклодекстринглюканотрансферази культивуванням *Raenibacillus ehimensis*

керівник роботи Скроцька О.І., к.б.н., доцент,

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Raenibacillus ehimensis*,  
цільовий продукт: фермент циклодекстрин-глюканотрансфераза (ЦГТ-ази)

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання. РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми виробництва ферменту ЦГТ-ази. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва ЦГТ-ази. РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва ЦГТ-ази.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)  
Технологічна схема виробництва ЦГТ-ази – 2 аркуші формат А1 і формат А2. Апаратурна схема виробництва ЦГТ-ази – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки виробництва ЦГТ-ази – 1 аркуш формату А3.

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	24.04.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	20.03.2020 – 22.03.2020	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	22.03.2020 – 28.03.2020	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	29.04.2020 – 05.04.2020	
4.	Біосинтез цільового продукту	06.04.2020 – 10.04.2020	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	11.04.2020 – 20.04.2020	
6.	Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	21.04.2020 – 28.04.2020	
7.	Специфікація обладнання	29.04.2020 – 03.05.2020	
8.	Опис технологічної схеми виробництва ферменту ЦГТ-ази	04.05.2020 – 9.05.2020	
9.	Контроль виробництва ЦГТ-ази	10.05.2020 – 15.05.2020	
10.	Автоматизація ділянки виробництва ЦГТ-ази	16.05.2020 – 20.05.2020	
11.	Оформлення пояснювальної записки	21.05.2020- 31.05.2020	
12.	Виконання графічної частини роботи	21.05.2020 - 31.05.2020	

**Здобувач** \_\_\_\_\_

( підпис )

**Бондарчук В.І.**

(прізвище та ініціали)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_

( підпис )

**Скроцька О.І.**

(прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Представлено кваліфікаційну роботу, яка присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем виробництва сухого ферментного порошку циклодекстрин-глюканотрансферази (ЦГТ-ази) зі ступенем очищення Г10Х культивуванням штаму *Raenibacillus ehimensis* IB-739. Даний фермент синтезується з досить високою активністю - 3,75 од/мл, що в у 2,3 рази більша ніж у *Bacillus megaterium* (1,61 од/мл).

ЦГТ-аза – унікальний фермент із класу трансфераз, так як є ефективним біокаталізатором, зокрема у реакціях трансглікозилювання стевіозиду з метою усунення залишкової гіркоти і післясмаку та підвищення його розчинності.

За техніко-економічним розрахунком потреба України у ферменті становить 50%, тобто 206,72 г. Потреба є сезонною (осінній період), тому виробництво триматиме 40 днів у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>.

Технологічний процес виробництва ферменту складається із допоміжних робіт (приготування мийно-дезінфікувальних засобів: «Кальцинована сода» для обладнання і «Біоконтакт» для виробничих приміщень; підготовка аераційного повітря; приготування та стерилізація поживного середовища та силіконового піногасника; приготування 75% спирту етилового) та основних стадій (вирощування інокуляту в колбі на качалках, у ферментерах об'ємом 10 л, 100 л, та виробничий біосинтез у ферментері 1000 л; відділення біомаси, концентрування цільового продукту, осадження ферменту спиртом, відділення осаду та його розчинення, сушіння та подрібнення ферментного порошку); стадії ПМВ готового продукту, що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (66 найменувань), апаратурної (2 формати А1) та технологічної (формат А1 та формат А2) схем та схеми ділянки автоматизації (формат А3). Загальний обсяг роботи – 170 сторінок друкованого тексту, містить: 27 таблиць та 24 рисунки.

**Ключові слова:** циклодекстрин-глюканотрансфераза, *P. ehimensis* IB-739, крохмаль, біосинтез, стевіозид, трансглікозилювання, післяферментаційні процеси, порошкоподібний фермент.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	11
1.1 Фізіологічні функції ферменту циклодекстрин- глюканотрансферази .....	12
1.2 Фізико-хімічні властивості ЦГТази .....	13
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	15
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування .....	15
2.2 Розрахунок складу поживного середовища для біосинтезу ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази культивуванням <i>Paenibacillus</i> <i>ehimensis</i> IB-739 .....	19
2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента .....	21
2.4 Історія зміни назви мікроорганізму .....	23
2.5 Таксономічний статус біологічного агента.....	24
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ .....	25
3.1 Потреба використання цільового продукту .....	25
3.1.1 Застосування циклодекстрин-глюканотрансферази.....	25
3.1.2 Вихідні дані для розрахунку річної потреби у ферменті циклодекстрин-глюканотрансферази.....	27
3.2 Розрахунок потужності виробництва.....	31
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для одержання ЦГТ-ази <i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739.....	32
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази <i>Paenibacillus</i> <i>ehimensis</i> IB-739 .....	34
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	37

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату .....	37
4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт .....	39
<b>РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.</b>	<b>44</b>
5.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу .....	44
5.1.1 Обґрунтування способу культивування .....	44
5.1.2 Обґрунтування вибору ферментера .....	45
5.1.3 Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, для культивування <i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739 – продуцента ЦГТ-ази ...	46
5.1.4 Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів.....	49
5.1.5 Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій .....	55
5.2 Обґрунтування післяферментаційних стадій виділення та очищення цільового продукту - ферменту ЦГТ-ази.....	64
5.2.1 Обґрунтування вибору технології отримання ферментного препарату ЦГТ-ази Г10Х.....	64
5.2.2 Методи відділення цільового продукту та обґрунтування вибору відповідного обладнання .....	68
5.2.3 Обґрунтування вибору способу концентрування супернатанту та відповідної установки.....	70
5.2.4 Обґрунтування способу осадження ЦГТ-ази та його подальшого розчинення .....	73
5.2.5 Обґрунтування виду сушіння та вибору сушарки для отримання порошку фермента ЦГТ-ази .....	77
5.2.6 Подрібнення та просіювання ферментного препарату .....	81
5.2.7. Розфасовка готового ферментного порошку.....	82
<b>РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ</b> .....	<b>85</b>
6.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів).....	86
6.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу .....	86

6.2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища та води для виробничого біосинтезу .....	87
6.2.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у посівному апараті (об'єм 100 л) ...	89
6.2.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі (об'ємом 10 л).....	92
6.2.4 Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для отримання культуральної рідини на качалочних колбах .....	94
6.3. Розрахунок напівпродуктів та баластних речовин в культуральній рідині після виробничого біосинтезу .....	96
6.4 Стадія ТП. Виділення, очищення та фасування готової продукції ....	97
6.4.1 Відділення біомаси центрифугуванням.....	97
6.4.2 Концентрування супернатанту методом упарювання .....	98
6.4.3 Осадження ферменту та відділення осаду центрифугуванням .....	98
6.4.4 Сушіння осаду в сублімаційній сушарці .....	99
6.4.5 Подрібнення ферментного препарату .....	99
6.4.6 Розрахунок активності ферменту по стадіях виділення .....	100
6.4.7 Розрахунок стадій ПМВ: пакування, маркування, відвантаження.....	101
6.5 Розрахунок матеріального балансу на один виробничий цикл одержання готового ферментного порошку ЦГТ-ази.....	102
6.6 Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання.....	105
6.7 Уточнюючий розрахунок обладнання для стадій виділення і очищення цільового продукту .....	108
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ .....	111
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ФЕРМЕНТУ ЦГТ-ази.....	116
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЦГТ-ази .....	135
9.1 Мікробіологічний контроль.....	135
9.2 Визначення показників росту та синтезу .....	136

9.2.1 Отримання супернатанту.....	136
9.2.2 Концентрація біомаси .....	137
9.2.3 Визначення активності циклодекстрин-глюканотрансферази....	137
9.2.4 Концентрація джерела вуглецю.....	138
9.2.5 Концентрація джерела азоту.....	140
9.3 Визначення вологості висушеного ферментного порошку .....	142
<b>РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ЦГТ-ази .....</b>	<b>152</b>
10.1 Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації.....	152
10.2 Опис функціональної схеми автоматизації .....	158
Список використаної літератури.....	163
Додатки.....	170

## ВСТУП

Сучасний розвиток багатьох галузей промисловості і сільського господарства неможливий без використання ферментних препаратів. Їх виробництво займає одне з провідних місць у сучасній біотехнології і належить до галузей, обсяг продукції яких постійно зростає, а сфера застосування розширюється.

Найширшим спектром використання відзначаються мікробні ферментні препарати. Це, як правило, так звані промислові або технічні ферментні препарати. Основну частину промислово важливих ферментів світового ринку на сьогодні становлять трансферази. Це ферменти, що каталізують реакції міжмолекулярного переносу хімічних груп. До таких відноситься фермент циклодекстрин-глюканотрансфераза [1].

Циклодекстрин-глюканотрансфераза (ЦГТ-аза, КФ 2.4.1.19) – фермент, який каталізує реакції міжмолекулярного трансклікозилювання, в кінцевому підсумку призводячи до деполімеризації крохмалю з утворенням циклодекстринів (ЦД) - нередукуючих макроциклічних олігосахаридів, широко використовуваних в харчовій промисловості [2].

Даний фермент знайшов своє широке використання в харчовій промисловості – реакція трансклікозилювання стевіозиду з метою усунення післясмакової гіркоти та підвищення його розчинності, а також у випічці безглютенових хлібів, тим самим покращуючи якості хліба - об'єму та структури, а також пришвидшуючи сам процес приготування випічки. ЦГТ-аза використовується і медицині для створення циклодекстринів, які в свою чергу використовуються у фармацевтичних технологіях з метою створення складних комплексів з різними АФІ [3].

Біотехнологічний спосіб отримання даного ферменту є альтернативою його дороговартісному хімічному синтезу. Найбільший вихід зазначеного вище ферменту отримують культивуванням продуцентів на поживних середовищах,

					НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Бондарчук В.І.					Д	8	169
Консульт.								
Керівник	Скряцька О.І.							
Н. Контр.								
Зав. каф.	Пирог Т.П.					Кафедра БТМ		

що містять крохмаль, декстрини, зернові та бобові культури, картоплю, дані сполуки є індукторами синтезу ферменту. Після процесу біосинтезу фільтрат культуральної рідини є тим вихідним матеріалом для отримання препаратів ферментів різної очистки. В залежності від фізико-хімічних властивостей даного ферменту вибирають найоптимальніші та найзручніші методи його виділення і очистки, при цьому не інактивуючи його і не порушуючи цілісної структури. При виробництві в промислових масштабах використовують досить просте та легке в експлуатації обладнання, без використання лабораторних методик отримання ферментного препарату [2,4].

На сьогодні виробництво ЦГТ-ази в Україні та країнах СНГ відсутнє, тому потреба у ферменті на разі є актуальною для промисловості та харчових виробництв в цілому. Враховуючи це необхідним також постає питання вибору продуцента ЦГТ-ази, який синтезує фермент з високою каталітичною активністю та специфічністю, щоб задовольнити потреби ферменту у промислових масштабах [5].

### ***Актуальність***

Налагодження виробництва ЦГТ-ази, в Україні, з метою забезпечення вітчизняного ринку даним ферментним препаратом та можливого експорту товару, як конкурентноспроможного, за кордон.

Перспективною галуззю для ЦГТ-ази є його використання, як ефективного біокаталізатора в харчовій промисловості, для реакції трансглікозилювання стевіозиду. Перевагою використання ЦГТ-ази в порівнянні з іншими ферментами (ізомальтаза,  $\beta$ -фруктофуранозидаза), що здатні також здійснювати дану реакцію, є те, що утворюються  $\alpha$ -1,4-глюкози-похідні, причому трансглікозилюються як 13-О- так і 19-О-глюкозильні залишки в молекулах стевіозиду. Як результат ми отримуємо стабільний моноглікозильований стевіозид, що володіє відмінними смаковими властивостями без залишкової гіркоти при цьому підвищується його ступінь розчинення [6].

***Новизною*** даної роботи пропонується використовувати штам виду *Raenibacillus ehimensis* ІВ-739, який у порівнянні з іншими продуцентами даного

ферменту, росте на досить простому поживному середовищі з крохмалем (який також виконує роль індуктора) і синтезує ЦГТ-азу широкої специфічності з досить високою активністю - 3,75 од/мл що в у 2,3 рази більша ніж у *Bacillus megaterium* (1,61 од/мл) та у 6,25 разів більша ніж у *Bacillus circulans* В-65 (0,6 од/мл). Це значно здешевлює вартість кінцевого продукту біосинтезу і збільшує вихід цільового ферменту [7].

Також серед проаналізованих способів виділення і очищення ферментів було обґрунтовано оптимальну, досить просту та економічно вигідну методику виділення і очищення ферментного препарату ЦГТ-ази зі ступенем очищення Г10Х з метою застосування у промислових масштабах для харчових виробництв.

Модифікація процесів виділення і очищення ЦГТ-ази зі ступенем очищення Г10Х, що передбачає концентрування отриманого супернатанту, з подальшим осадженням ЦГТ-ази органічним розчинником – етанолом з оптимально підбраною, для осадження ЦГТ-ази, концентрацією 75% та подальшого сушіння і подрібнення готового продукту. Дана технологія є досить простою у реалізації та менш витратною в порівнянні з мембранними, сорбційними та хроматографічними процесами [4,5].

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Циклодекстрин-глюканотрансфераза – унікальна амілаза (1,4- $\alpha$ -D-глюкан-4- $\alpha$ -(1,4- $\alpha$ -глюкано)-трансфераза, КФ 2.4.1.19) вперше була виділена з культури *Bacillus macerans* в 1974 році. Це фермент мікробного походження, який належить до класу трансфераз з молекулярною масою, що коливається в межах від 60 до 110 кДа, тому що залежить від його специфічності та мікроорганізму, що його продукує. Робоча назва ферменту – циклодекстрин-глюканотрансфераза (ЦГТ-аза). Він циклізує частину ланцюга 1,4- $\alpha$ -глюкана шляхом утворення 1,4- $\alpha$ -глікозидного зв'язку [4].

До складу ЦГТ-ази входять 683 амінокислоти, які знаходяться у її п'яти доменах. Структура білка у вигляді 3D моделі для ЦГТ-ази була визначена за допомогою гомологічного моделювання. Присутність іонних взаємодій всередині структури ЦГТ-ази порівнювали з її п'ятьма кристалічними структурами. Мезофільні ЦГТ-ази мають меншу кількість іонних пар (в середньому 72,3 пари), ніж термофільні (в середньому 78,6 пар). Більшість іонних взаємодій у ЦГТ-ази були виявлені в домені А і найскладніша іонна мережа та активний сайт даного ферменту також були в цьому каталітичному домені [8].

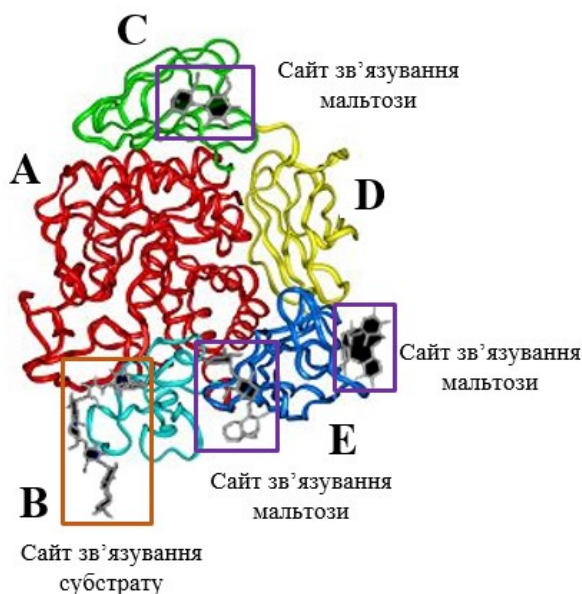
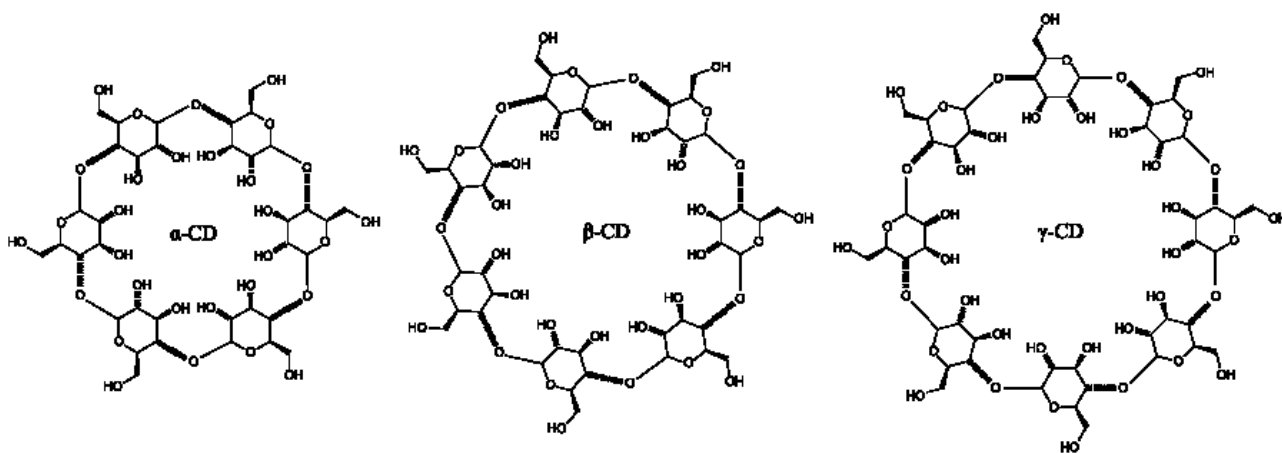


Рис. 1.1 Структурна 3D модель ЦГТ-ази

					НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 1.</b> <b>ХАРАКТЕРИСТИКА</b> <b>ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>					
Розроб.	Бондарчук В.І.							Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.								Д	11	169
Керівник	Скороцька О.І.							Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Зав. каф.	Пирог Т.П.									

Як і інші ферменти сімейства  $\alpha$ -амілаз є одними з найбільш ефективних із ферментів – збільшують ступінь гідролізу субстрату в  $10^{15}$  раз. Він циклізує частину ланцюга 1,4- $\alpha$ -глюкана шляхом утворення 1,4- $\alpha$ -глікозидного зв'язку. При дії на крохмаль і аналогічні субстрати утворюються циклічні нередуковані декстрини (декстрини Шардингера) різних розмірів.



*Рис 1.2 Структури трьох основних циклодекстринів*

Циклодекстрини мають гідрофільну поверхню і гідрофобну внутрішньомолекулярну порожнину. Бактеріальні ЦГТ-ази виробляють переважно  $\alpha$ -циклодекстрини,  $\beta$ -циклодекстрини, і слідові кількості  $\gamma$ -циклодекстринів, що складаються з шести, семи або восьми глікозидних одиниць, відповідно.

Циклічні циклодекстрини широко використовуються у харчовій, фармацевтичній, хімічній, косметичній та сільськогосподарській галузях через їх здатність здатні утворювати комплекси-включення з різними органічними і неорганічними молекулами, змінюючи їх фізико-хімічні властивості, за рахунок чого можна досягти таких ефектів, як збільшення в десятки і сотні разів розчинності в воді неполярних з'єднань, збільшення стабільності різних речовин до дії кисню, повітря, світла, температури [4].

### **1.1 Фізіологічні функції ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази**

Бактеріальна ЦГТ-аза є багатофункціональним ферментом. Вона може каталізувати реакції гідролізу, розщеплюючи зв'язки в молекулі крохмалю, яка супроводжується реакцією розщеплення продукту з водою, в результаті чого

утворюється новий редукуючий кінець. Однак ЦГТ-аза зазвичай має малу активність гідролізу і переважно каталізує три реакції трансглікозилювання:

- *циклізація* (розщеплення  $\alpha$ -глікозидного зв'язку в амілозі або крохмалі і подальше утворення циклодекстринів, тобто - це процес, за допомогою якого розщеплюється лінійний полісахаридний ланцюг і з'єднуються два кінці розщепленого фрагмента, утворюючи круговий декстрин (циклодекстрин або ЦД));
- *сполучення* (можна легко описати як зворотний процес циклізації: фермент розщеплює циклодекстрин, а саме:  $\alpha$ -глікозидний зв'язок циклодекстринового кільця, з утворенням лінійного декстрину, який згодом приєднується до лінійного олігосахариду);
- *реакція диспропорціонування* (дуже схожа на сполучення, але розщеплений декстрин - це не циклодекстрин, а лінійний олігосахарид, який потім приєднується до другого олігосахариду) [9].

Циклодекстрин-глюканотрансфераза також широко застосовується у харчовій промисловості, а саме: у випічці безглютенних хлібів, так як покращує їх структуру і смакові властивості, та під час реакцій глікозилювання вуглеводів, наприклад похідних стевіозиду - інтенсивного підсолоджувача з рослин *Stevia rebandania*, тим самим покращує смакові властивості (усунення гіркоти) і підвищуючи його розчинність [10].

Оскільки даний фермент бере участь у різних видах каталітичних реакцій, то за його допомогою досягли значних успіхів у створенні нового трансглікозилюваного похідного тіаміну, яке було синтезоване за допомогою реакції ЦГТ-ази з *B. stearothermophilus* і глюкоамілази *Rhizopus sp.* з сумішшю декстрину і тіаміну. Отриманий  $O$ - $\alpha$ -глюкозилтіамін був без запаху і слабосолодким, без присмаку на язиці; і виявилось, що він є більш стабільним, ніж тіамін гідрохлорид у водних розчинах при рН 7,0 і рН 9,3 [11].

## 1.2 Фізико-хімічні властивості ЦГТази

Стандартними методами були визначені температурний і рН оптимуми, температурна і рН стабільність очищеного препарату. Випробовуваний фермент

проявляв найбільшу циклізуючу активність при  $T = 40-45^{\circ}\text{C}$ , величина якої істотно залежала від кислотності розчинів з оптимумом  $\text{pH} = 6,0$ . Препарат був відносно стійкий в діапазоні  $\text{pH} 5,5-8,5$ , при температурах до  $60^{\circ}\text{C}$ . Додавання іонів кальцію у вигляді  $\text{CaCl}_2$  (в кінцевій концентрації  $10 \text{ мМ}$ ) виявляло лише незначну стабілізуючу дію на досліджуваний фермент. ЦГТ-ази володіють афінністю до субстрату [12].

## РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Циклодекстрин-глюканотрансфераза – фермент мікробного походження, що каталізує реакції міжмолекулярного трансглікозилювання. Штами, придатні для промисловості, повинні швидко розвиватися у великих ферментерах, утворювати мінімальну кількість інших ферментів, а також не повинні виділяти токсичні метаболіти і не бути патогенними.

До теперішнього моменту ЦГТ-аза з різними властивостями виявлена у ґрунтових мікроорганізмів різних родів *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Micrococcus*, *Thermoanaerobacter* та інші. Ці продуценти ЦГТ-аз відносяться до груп мезофільних, термофільних або алкалофільних бактерій. В результаті подальших досліджень ЦГТ-аза вперше була ідентифікована у галофільних споруутворюючих бацил і термоактноміцетів [2,13].

Так як найчастіше використовували бактеріальні штами роду *Bacillus*, *Paenibacillus* як джерело ферменту ЦГТ-ази, то для порівняння візьмемо: *Paenibacillus ehimensis* IB-739, *Bacillus megaterium*, а також розглянемо алкалофільного представника - *Bacillus circulans* В-65, який здатний також продукувати даний фермент.

Культивування проводиться в інтервалі температур 30 – 39°C. Це пов'язано з тим, що дана температура є оптимальною для синтезу циклодекстрин-глюканотрансферази. Показник рН у двох порівнюваних мікроорганізмів коливається в діапазоні від близько нейтрального до слабо лужного – 6,0-8,0, проте також наявний і алкалофільний мікроорганізм рН якого становить 9,2.

Характеристика продуцентів та особливості їх культивування представлені у табл. 2.1

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Бондарчук В.І.			<b>РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Консульт.						Д	15	169
Керівник		Скороцька О.І.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Пирог Т.П.						

## Порівняльна характеристика продуцентів ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази

Склад поживного середовища (г/л)	Особливості культивування	Активність ферменту (Е), концентрація (С) та його молекулярна маса (ММ)	Література
<b><i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• крохмаль – 10;</li> <li>• пептон – 4;</li> <li>• дріжджовий екстракт – 5;</li> <li>• КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 1;</li> <li>• СаСО<sub>3</sub> – 1.</li> </ul>	<p>t = 37-39°C; pH = 7,0-7,2; T = 72 год Перемішування 180 об/хв.</p>	<p>E = 3,75 од/мл; ММ = 75 кДа; C = 57 мг/л.</p>	<p><i>Мильман П.Ю., Гильванова Е.А.</i> Конструирование питательной среды для стабильного биосинтеза циклодекстрин-глюканотрансферазы <i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739 // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. – 2013. – № 3. – С. 26-29.</p>
<b><i>B.circulans</i> B-65</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• розчинений крохмаль – 10;</li> <li>• пептон - 5;</li> <li>• дріжджовий екстракт - 5;</li> <li>• К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> - 1;</li> <li>• MgSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O - 0,2;</li> <li>• Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 10.</li> </ul>	<p>t = 37°C; pH = 9,2; T = 96 год Перемішування 200 об/хв.</p>	<p>E = 0,6 од/мл; ММ = 70 кДа; C = 11 мг/л.</p>	<p><i>Stankovic S., Pesic D., Beric T., Simic D.</i> Determination of cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic <i>Bacillus circulans</i> strain B-65n // Botanica Serbica. – 2016. – 1, N 40. – P. 49-54</p>
<b><i>Bacillus megaterium</i></b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• картопляний екстракт – 100 мл;</li> <li>• кукурудзяний екстракт – 5;</li> </ul>	<p>t = 37°C; pH = 7,5; T = 72 год Перемішування 200 об/хв.</p>	<p>E = 1,61 од/мл; ММ = 70 кДа; C = 20 мг/л.</p>	<p><i>Zhekoval B.Y., Ivan Genov Pishtiyski I. G., Stanchev V.S.</i> Investigation on Cyclodextrin Production with Cyclodextrin Glucanotransferase from <i>Bacillus megaterium</i> // Food Technol. Biotechnol. – 2008. – 3, N 46. – P. 328-334</p>

При порівнянні активності ферментів, якій приділялась найбільша увага, найвищою серед усіх зазначених була у *Paenibacillus ehimensis* IB-739, а саме: 3,75 од/мл, що у 2,3 рази більша ніж у *Bacillus megaterium* (1,61 од/мл) та у 6,25 разів більша ніж у *Bacillus circulans* B-65 (0,6 од/мл).

Важливим показником є також тривалість культивування. Він дає змогу скоротити витрати ресурсів електроенергії і докладається менше робочої сили. Біосинтез циклодекстрин-глюканотрансферази за допомогою *Bacillus circulans* B65 є найдовшим, а саме: 96 год, що економічно не вигідно порівняно з 72 годинами культивування інших порівнюваних продуцентів.

Проте така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою, тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість поживних середовищ, використовуваних даними продуцентами (табл. 2.2).

Для росту культури і біосинтезу ферменту ЦГТ-ази джерелом вуглецю в основному служать крохмаль, декстрини, зернові та бобові культури. Джерелами азоту - пептон, дріжджовий екстракт, кукурудзяний екстракт, дріжджові клітини або амонійний азот. В якості мінеральних добавок використовується одно- і двоаміщений фосфат калію, одно- і двоаміщений фосфат амонію, карбонат кальцію. Порівнявши різних продуцентів ЦГТ-ази можна сказати, що середовища для їх культивування є відносно однакові за складом, так як в деяких присутні дріжджовий екстракт і пептон. Також відрізняються наявністю різних солей та екстрактів, що суттєво впливає на вартість поживного середовища для біосинтезу даного ферменту.

Таблиця 2.2

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів циклодекстрин-глюканотрансферази**

Біологічний агент (назва і номер штаму)	Концентрація кожного компонента середовища, г/л	Ціна компонента поживного середовища, грн/кг	Вартість компонента (грн) для приготування 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739	крохмаль – 10;	22,90	0,229	1
	пептон – 4;	720	2,88	2

	дріжджовий екстракт – 5;	936	4,68	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1;	48	0,048	1
	CaCO <sub>3</sub> – 1.	12,90	0,0129	1
	Вартість 1 л середовища – 7,85 грн			
<i>Bacillus circulans</i> В-65	розчинений крохмаль – 10;	60	0,6	1
	пептон - 5;	720	3,6	2
	дріжджовий екстракт - 5;	936	4,86	1
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 1;	150	0,15	1
	MgSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O - 0,2;	65	0,013	1
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> - 10.	9	0,09	1
Вартість 1 л середовища –9,3 грн				
<i>Bacillus megaterium</i>	картопляний екстракт –100 мл;	245 грн/л	24,5	3
	кукурудзяний екстракт – 10;	214	1,07	4
	Вартість 1 л середовища –25,57 грн			

**Примітка:** \* – ціни наведено станом на травень 2020 р.: 1. <https://prom.ua/ua/>; 2 <https://www.systopt.com.ua/>; 3. <https://www.formedium.com/>; 4. <https://www.mtcbaits.com/>.

Проаналізувавши *табл. 2.2* можна бачити, що ціна за 1 л поживного середовища для *Paenibacillus ehimensis* ІВ-739 в три рази дешевша ніж у *Bacillus megaterium* і лише на 1,50 грн від *Bacillus circulans* В-65. Це вказує на те, що отримання ЦГТ-ази за допомогою *Paenibacillus ehimensis* ІВ-739 на поживному середовищі наступного складу *табл. 2.1* буде доцільніше з економічної точки зору.

Враховуючи попередні критерії порівняння процентів ЦГТ-ази, для більшого обсягу аналізу варто визначити вартість 1 мг ферменту, яка наведена в *табл. 2.3*.

При розрахунках найнижчою становила *Paenibacillus ehimensis* ІВ-739, а саме: 0,137 грн/мг, що близько в 9 та 6 разів дешевше ніж вартість 1 мг ферменту у *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* В-65 відповідно.

## Вартість 1 мг цільового продукту – циклодекстрин-глюканотрансферази

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища (грн.)	Активність ЦГТ-ази, ОА*/л	Концентрація ЦГТ-ази, мг/л	Вартість 1 мг ЦГТ-ази, грн/мг	Тривалість культивування, год	Активність ферменту утвореного за годину, ОА/год
<i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739	7,85	3750	57	0,137	72	52
<i>Bacillus megaterium</i>	25,57	1610	20	1,27	72	22,36
<i>B.circulans</i> B-65	9,3	600	11	0,845	96	6,25

Примітка: ОА\* - одиниця активності (ферменту)

Таким чином більш перспективним та економічно вигідним продуцентом для промислового біосинтезу ферменту ЦГТ-ази є *P.ehimensis* IB-739, так як синтезує фермент з досить високою ферментативною активністю (3,75 од/мл) при рості на середовищі простому за складом, основним компонентом якого є крохмаль, не потребує титрувальних агентів і при найменших витратах на процес біосинтезу з усіх порівнюваних нами продуцентів.

Отже, здійснивши різноплановий аналіз продуцентів ферменту ЦГТ-ази за допомогою мікроорганізмів, можна стверджувати, що *P.ehimensis* IB-739 переважає інших порівнюваних нами ферментів у всіх проаналізованих показниках і є найбільш кращим промисловим продуцентом ЦГТ-ази.

## 2.2 Розрахунок складу поживного середовища для біосинтезу ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази культивуванням *Paenibacillus ehimensis* IB-739

Середовище для культивування *Paenibacillus ehimensis* IB-739 має такий склад г/л [7]:

- крохмаль - 10;
- пептон - 4
- дріжджовий екстракт - 5;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;
- $\text{CaCO}_3$  – 1.

Тривалість культивування становить 72 год, а концентрація біомаси 1 г/л. Джерела вуглецю і азоту - це основні компоненти від яких залежить накопичення цільового продукту та біомаси. Інші компоненти середовища необхідні для росту зазвичай містяться в надлишку. Бактеріальна клітина складається на 50% з Карбону та з 10% з Нітрогену [14].

### ***Потреба для синтезу біомаси та цільового продукту***

#### *Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення*

Відомо, що у біомасі міститься 50 % вуглецю, а тому вміст вуглецю у 1 г біомаси становить 0,5 г.

Як основне джерело вуглецю в середовищі використовується крохмаль, а додатковими можуть бути пептон і дріжджовий екстракт. Крохмаль відноситься до полісахаридів і має молекулярну формулу  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Його маномером є глюкоза. Так як до складу крохмалю входить також до 2% неуглеводневих компонентів - білків, ліпідів, зольних елементів, то загальна кількість вуглеводів становитиме в ньому  $10 - (10 \cdot 0,02) = 9,8$  г (4,5 г)

Для розрахунку кількості карбону в пептоні і дріжджовому екстракті зазначаємо, що вони на 50 % складаються з нього:

пептон:  $4 \cdot 0,5 = 2$  г;

дріжджовий екстракт:  $5 \cdot 0,5 = 2,5$  г.

З вище порохованого випливає, що у середовищі міститься 9 г вуглецю. Враховуючи те, що при вирощуванні близько 50% субстрату окислюється до  $CO_2$  для отримання енергії - «холосте окиснення» для подальшого конструктивного метаболізму, то вміст Карбону в середовищі становитиме 4,5 г.

Оскільки для біосинтезу біомаси необхідно, щоб у поживному середовищі містилось 0,5 г/л, тоді залишок становить 4 г/л. Так як немає достовірної інформації про структурну формулу і вміст кількості Карбону у цільовому продукті, то можна припустити, що 4 г/л Карбону в поживному середовищі цілком достатньо для синтезу 0,057 г/л цільового продукту.

### *Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення*

У біомасі міститься приблизно 14% азоту, тому у 1 г біомаси вміст азоту становить 0,14 г. Джерело Нітрогену у середовищі є пептон і дріжджовий екстракт. Отже з 9 г джерел Нітрогену (пептон - 4 г та дріжджовий екстракт 5 г в середовищі), то отримуємо:  $9 \cdot 0,1 = 0,9$  г Нітрогену.

Оскільки для біосинтезу біомаси потрібно 0,14 г/л Нітрогену, що має міститись у поживному середовищі, то залишок становить 0,76 г/л.

Так як немає достовірної інформації про структурну формулу і вміст кількості Нітрогену у цільовому продукті, то можна припустити, що 0,76 г/л Нітрогену в поживному середовищі цілком достатньо для синтезу 0,057 г/л цільового продукту.

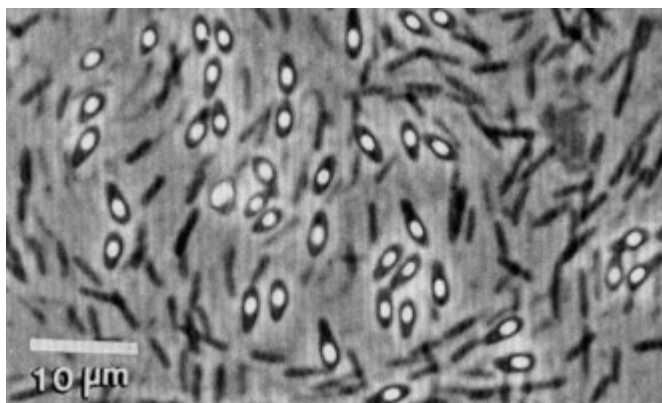
Проаналізувавши узагальнені розрахунки, можна сказати, що склад середовища підібраний оптимально, концентрація джерел вуглецю і азоту є достатньою для культивування *Paenibacillus ehimensis* IB-739 для отримання ферменту – циклодекстрин-глюканотрансферази.

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

Штам мікроорганізму *Paenibacillus ehimensis* IB-739 був виділений у 1987 році зі зразка орних земель (вилуженого чорнозему) в селі Булгаково Уфимського району Республіки Башкортостан. Не є генетично модифікованим штамом і володіє чітко вираженою ЦГТ-азною активністю. Не проявляє токсичних чи вірулентних ознак, проте даний штам розцінюється як слабкий алерген [12].

Клітини являють собою грампозитивні рухливі палички розміром  $0,3-0,5 \times 1,7-4,2$  мкм. Рухливість забезпечується наявністю перитрихально розташованих джгутиків. Спори еліптичні, розташовані термінально. На агаризованому середовищі з крохмалем (K1) на 1 добу формуються 2 типи колоній: одні кремові, інші - більш темні. Всі колонії напівпрозорі, овальні, гладкі, діаметром 2-4 мм, рівномірно опуклі, блискучі, з рівним краєм, однорідні.

На 7 добу росту формуються зморшкуваті і складчасті колонії, які стають ще більш опуклими, яскравими і блискучими. У чашках Петрі, по мірі росту колоній, вони все більше розростаються і зливаються одна з одною і стають крупнозернистої структури, колір яких коливається від напівпрозорого до світло-кремового. При рості мікроорганізмів по штриху на середовищі К1 спостерігається рясний ріст дифузного вигляду в основі штриха і суцільного вигляду з хвилястим краєм до його кінця [15,16].



*Рис. 2.1 Фазово-контрастна мікрофотографія клітин штаму  
*Paenibacillus ehimensis**

*P. ehimensis* IB-739 по відношенню до кисню - аероб. Добре росте в інтервалі температур від 30 до 45°C та широкому діапазоні рН=6,0-9,0. Не росте в присутності 7% NaCl. Здатний споживати крохмаль, глюкозу, сахарозу, арабінозу, маніт, гліцерин, етанол в якості джерел вуглецю. При зброджуванні цукрів газ не утворюється, проте кислота виділяється. Гідролізує крохмаль з утворенням циклодекстринів. В якості джерела азоту засвоює як органічні форми (пептони, автолізати, екстракти), так і мінеральні (солі амонію, нітрати). Слабо росте на без азотистому середовищі. А при використанні, в якості єдиного джерела азоту, KNO<sub>3</sub> і NaNO<sub>3</sub> здатний виділяти в культуральну рідину велику кількість полісахаридів, аж до гелеподібного стану.

Реакція Фогес-Проскауера (утворення ацетилметилкарбінолу) негативна. Індол не утворює. Дезамінування фенілаланіну не відбувається. Тирозин не розкладає. Виявляє гемолітичну активність - β гемоліз, кисень незалежного типу.

На середовищі з крохмалем утворює кристали циклодекстринів. На середовищах з хітином синтезує хітиназу і хітозаназу.

*P.ehimensis* IB-739 стійкий до стрептоміцину, тому наявність клітин даного штаму в досліджуваному матеріалі визначається шляхом висіву мікробної суспензії досліджуваного зразка на щільне поживне середовище з даним антибіотиком. Аналіз та ідентифікація здійснюються відповідно до морфологічних ознак даного штаму [12,16].

#### **2.4 Історія зміни назви мікроорганізму**

*P.ehimensis* IB-739 вперше був відкритий як *Bacillus ehimensis* IB-739 в 1987 році. В результаті ретельного дослідження його фізіолого-біохімічних, морфологічних і культуральних ознак було встановлено приналежність штаму до аеробних спороутворюючих бактерій, але відповідно до існуючих в той час таксономічних ключів, виду приналежність штаму встановити не вдалося. Проте, з метою депонування та інших протокольних заходів, штам був визначений як *Bacillus* sp. 739.

Однак сучасний стан молекулярно-генетичних методів надав можливість встановити таксономічне положення даного штаму. Рід *Paenibacillus* (майже бацили) був перший запропонований Ешом, Прістом та Колінсом в 1993 році, на основі по філогенетичних даних з 16S рДНК послідовностей. За результатами секвенування нуклеотидної послідовності гена ДНК, що кодує 16S рРНК і на підставі філогенетичного аналізу штам був ідентифікований як *P.ehimensis* IB-739. В 16S рДНК послідовність була порівняна з представницькими послідовностями з родами *Bacillus* і *Paenibacillus* і пов'язаних з ними таксонами з використанням CLUSTAL W програмного забезпечення (Томпсон і ін., 1994). Прогалини в 59 і 39 кінцях цього порівняння були опущені з подальшого аналізу. Відповідно до узагальнення всіх фенотипових ознак, досліджуваний штам IB-739 був таксономічно позиціонований як близький до типової культури *Paenibacillus ehimensis* JCM9907T (Kuroshima et al., 1996; Lee et al., 2004) За даними аналізу послідовностей гена 16S рРНК побудовано

філогенетичне дерево. Послідовність гена зареєстрована в базі GenBank за номером FN582329.1 [17,18].

## 2.5 Таксономічний статус біологічного агента

Згідно із дев'ятим виданням керівництва Бергі з систематики бактерій *Raenibacillus ehimensis* належить [19]:

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Bacillales*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: *Bacillus*

Вид: *ehimensis*

Згідно із десятим виданням керівництва Бергі з систематики бактерій *Raenibacillus ehimensis* належить [20]:

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Bacillales*

Родина: *Raenibacillaceae*

Рід: *Raenibacillus*

Вид: *ehimensis*

Як видно з вище написаного таксономічне положення *Raenibacillus ehimensis* не сильно змінилось у філогенетичній систематиці в порівнянні з фенотиповою систематикою. В результаті повного секвенування нуклеотидної послідовності гена деякі представники з роду *Bacillus* були перенесені до роду *Raenibacillus*. Назва роду походить від латинського слова «*raeni*» («майже») - в назві роду відображено схожість з родом *Bacillus* (назва роду можна буквально перекласти як «майже бацили») [21].

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1 Потреба використання цільового продукту

Використання ферментів дозволяє підвищувати швидкість технологічних процесів, відчутно збільшувати вихід готової продукції, покращувати її якість, економити ціну сировину і знижувати кількість відходів. На відміну від більшості каталізаторів неорганічної природи, ферменти володіють більш високою ефективністю і специфічністю дії [22].

#### 3.1.1 Застосування циклодекстрин-глюканотрансферази

**Підвищення біодоступності ЛЗ та покращення їх фізико-хімічних характеристик.** ЦГТ-аза як біокаталізатор має певні застосування, пов'язані з його каталітичними реакціями. Загалом даний фермент використовують у виробництві циклодекстринів (являють собою циклічні невідновлювальні олігосахариди), що в подальшому використовуються у фармацевтичній промисловості для покращення розчинності лікарських засобів та біодоступності. Прикладом є включення в комплекс  $\beta$ -циклодекстрину з індометацином – підвищується розчинність останнього. При включенні в комплекс  $\beta$ -циклодекстрину з валідолом усувається специфічний запах препарату, підвищується його стабільність [23].

**Трансглікозилювання вуглеводів.** Зокрема фермент циклодекстрин-глюканотрансфераза також відіграє важливу роль у поліпшенні властивостей вуглеводів таких як розчинність, стабільність та зменшення гіркоти за допомогою реакції трансглікозилювання. Наприклад, ЦГТ-аза каталізує глікозилювання стевіозиду, що зменшується його гіркота та збільшується розчинність. При дії ферменту на неогесперидин утворювалась його глікозильована форма (моноглікозид неогесперидину), розчинність у воді якої стала у 1500 разів більшою, а гіркота зменшилась приблизно у 10 разів, на відміну від неглікозильованої форми. Крім того дія ферменту спостерігалась на нарінгін, розчинність глікозильованої форми якої становила у 1000 разів більше,

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
Розроб.		Бондарчук В.І.			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
Консульт.					Д	25	169
Керівник		Скороцька О. І.			<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Пирог Т.П.					

ніж у вихідної сполуки [11].

**Використання ферменту в хлібопекарстві.** Даний фермент знайшов своє використання також у випічці безглютенового хліба, який є альтернативою людей, що хворіють на целиакію (непереносимість глютену). Глютен - це білок, який знаходиться в сім'ях більшості злакових культур (пшениця, жито, овес і ячмінь). У сухому вигляді він безбарвний і не має смаку, але при додаванні води стає сіруватим і за текстурою нагадує клей (звідси ще одна назва - клейковина). Саме завдяки глютену борошно, змішане з водою, перетворюється на еластичне і пружне тісто, що має велике значення в хлібопекарській промисловості. Після приготування хліба без глютену з використанням традиційного інгредієнта для випічки – борошна без глютену (рисове, кукурудзяне, тощо), ми отримуємо досить специфічний хліб: невеликий в об'ємі, частково гливкий, твердуватий, який відносно швидко черствіє.

Однак фермент ЦГТ-аза, з його здатністю циклізувати і гідролізувати крохмаль з утворенням ЦД, може бути використаний для поліпшення хліба без глютену. Цей фермент розкладає крохмаль борошна, отриманого з різних джерел, до циклодекстринів (ЦД) за допомогою реакції трансглікозилювання (циклізація). При додаванні ферменту до борошна, яке далі використовувалось при випічці безглютенових хлібів, інтенсифікувався процес приготування тіста й поліпшення якості хліба – об'єму (збільшується) та структури (м'якший і пухкіший). Так спостерігалось збільшення об'єму безглютенових хлібів з ЦГТ-азою на 11% порівняно з контрольним зразком [24].



*Рис. 3.1* Схема застосування ЦГТ-ази

### 3.1.2 Вихідні дані для розрахунку річної потреби у ферменті циклодекстрин-глюканотрансферази

Однією з галузей застосування ЦГТ-ази є трансглікозилювання вуглеводів для поліпшення їх смакових якостей та покращення фізико-хімічних показників (зменшення гіркоти і збільшення розчинності). Одним з таких вуглеводів є стевіозид (глікозид отриманий із рослин стевії).

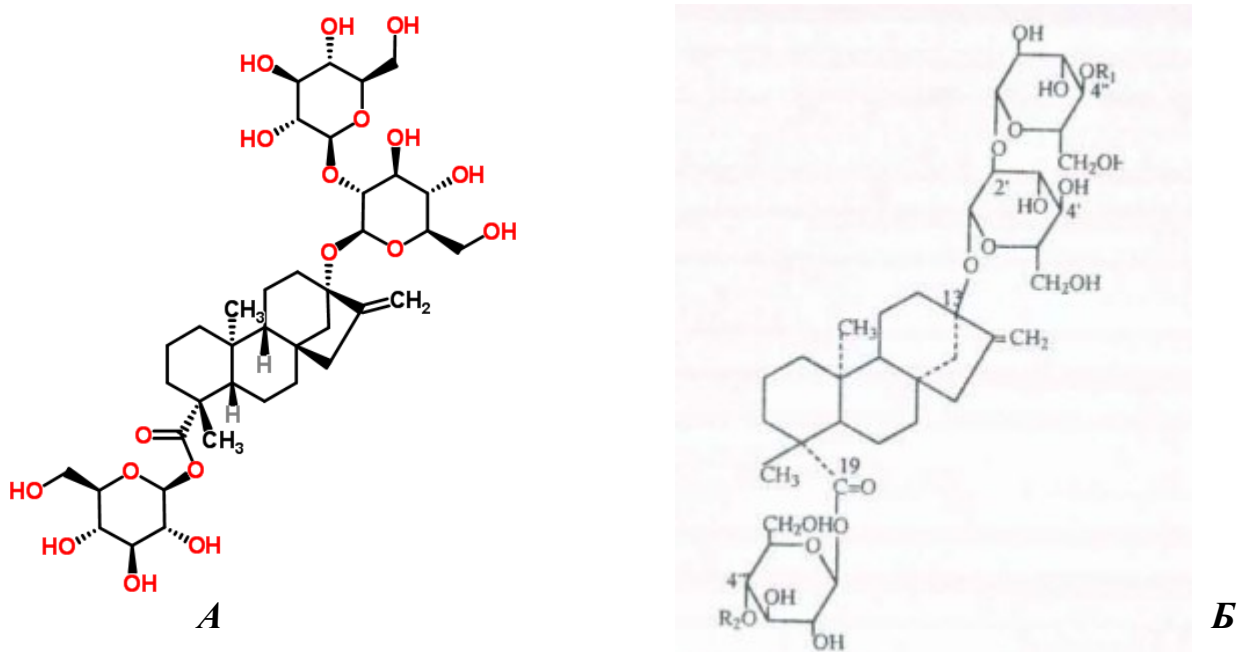


Рис. 3.2. Структурна формула стевіозиду:

*А - нативна формула; Б - глікозилювана формула*

Стевіозид виступає в ролі цукрозамінника і переважає цукор, так як медичні дослідження останніх десятиліть довели, що надмірність споживання «солодкого піску» тільки шкодить здоров'ю людини.

Незважаючи на те, що в даний час відомо велика кількість штучних хімічних сполук, що володіють високим ступенем солодкості, так звані штучні підсолоджувачі: сахарин, цикламат, ацесульфам К, аспартам, однак, вони мають побічні ефекти, негативний вплив на здоров'я людей, зокрема це можуть бути: появи мігрень, депресій або й взагалі можуть ініціювати злякисну пухлину [25].

Серед безпечних цукрозамінників натуральним є стевія (медова трава) – це солодка рослина, що знижує рівень цукру в крові без протипоказань і побічних ефектів. Ця рослина, як і її глікозид (стевіозид) позитивно впливає на людський організм: підвищує імунітет, нормалізує тиск і омолоджує. Показано, що стевію

можна вживати в їжу постійно при чому без будь-яких наслідків для здоров'я людини [26].

На сьогодні продукти переробки стевії затверджені як харчова добавка в багатьох країнах світу, зокрема, країнах Північної Америки, Латинської Америки, Азіатсько-Тихоокеанського регіону, Європи, таких як Франція, Швейцарія. Зараз основними виробниками стевії є Китай і Парагвай, хоча вирощують її також в Бразилії, США, В'єтнамі, Новій Зеландії та інших країнах. Україна належить до небагатьох країн, де культивується природний цукрозамінник – стевія, яка є надійною альтернативою цукру, оскільки, на відміну від інших натуральних видів цукру, має низький глікемічний індекс [27].

*Табл.3.1*

**Цукрозамінник стевіозид, представлений на ринку України**

<b>Виробник</b>	<b>Країна</b>	<b>Фасовка, г</b>	<b>Вартість, грн</b>
iHerb	США	100	150
Now foods	США	30	200
Свита-Sweta	Росія	50	100
Кристал	Росія	250	400
Стевіасан Бактосила	Україна	80	100
Solo svit	Україна	50	80

Дослідження, проведені Інститутом біоенергетичних культур і цукрових буряків (ІБКЦБ) 17 років, показали, що ця рослина добре пристосувалася та успішно вирощується в різних ґрунтово-кліматичних умовах: в Центральному та Західному Лісостепу України, в Закарпатті, Кримській АР. Стевія – високопродуктивна рослина, тому економічна ефективність її вирощування досить висока. Перші дослідження, проведені в Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків (ІБКЦБ), показали, що кожен гектар, зайнятий цією культурою, може дати 20 центнерів і більше маси сухих листків. Залежно від сорту та форми стевії можна одержати від 140 до 200 кг чистого продукту (стевіозиду) з одного гектара, засіяного цією рослиною.

Наразі в Україні вирощування стевії здійснюється на площі всього 20 га, так як основне промислове виробництво сухих листків стевії базувалося більшою частиною в Криму, який тимчасово окупований [27,28].

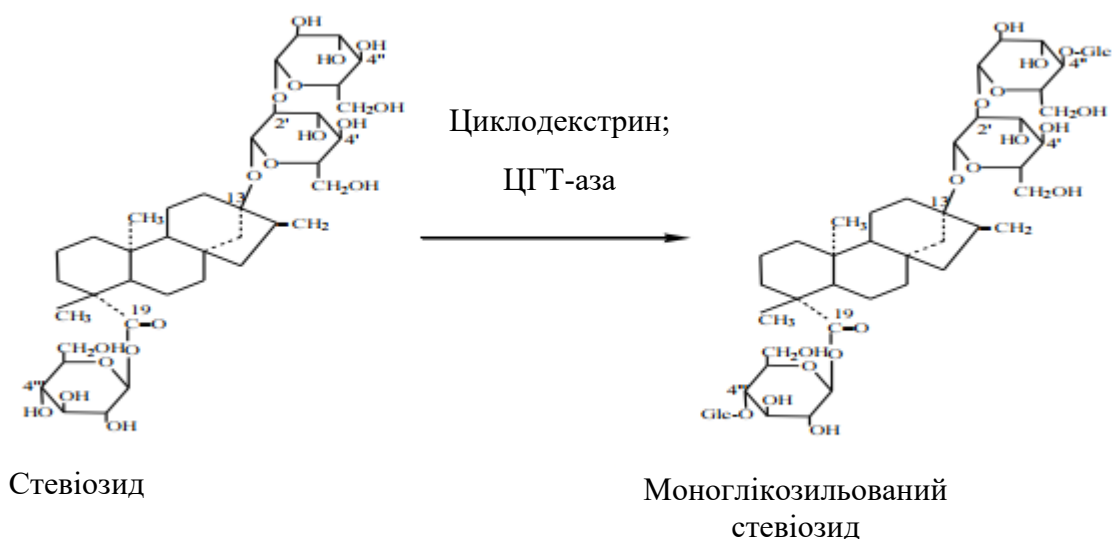
Однак стевіозид, окрім своїх корисних властивостей, має залишкові гіркоту і післясмак, які впливають на його якісні характеристики. Їх можна усунути реакцією міжмолекулярного трансглікозилювання під дією різних ферментів, упродовж якої відбувається приєднання нових вуглеводів в положеннях С-13 і С-19. Саме кількість вуглеводних одиниць в зазначених позиціях визначає якість и ступінь солодкості.

До ферментів, які здійснюють реакцію трансглікозилювання, окрім ЦГТ-ази відносять  $\beta$ -фруктофуранозидазу, пуллуланазу, ізомальтазу,  $\beta$ -галактозидазу і декстрин сахаразу. Однак вони дозволяють усунути гіркоту тільки частково.

При застосуванні  $\beta$ -фруктофуранозидази з *Arthrobacter* sp. і сахарози в якості донора, відбувається транс- $\beta$ -2,6-фруктофуранозилірування 19-О-глюкозильного залишку. Утворені залишки володіли відмінними смаковими якостями, проте відрізнялися нестабільністю і легко піддавалися гідролізу. Трансглікозилювання глікозидів стевії здійснено також  $\beta$ -галактозидазою з різних джерел, використовуючи лактозу в якості донора глікозильних одиниць. Однак, вони усувають гіркоту стевіозиду тільки частково через низький виходу похідних з необхідними якісними характеристиками.

Найкращі результати отримані при трансглікозилюванні за допомогою ЦГТ-аз мікробного походження, таких як *Paenibacillus macerans*, *Bacillus megaterium* та інших з використанням крохмалю (донор). В результаті утворюються  $\alpha$ -1,4-глюкози-похідні, причому трансглікозилюються як 13-О-, так і 19-О-глюкозильні залишки в молекулах стевіозиду. Практично всі отримані похідні мають поліпшені смакові якості. У присутності циклічних або лінійних мальтоолігосахаридів або крохмалю в якості донорів глюкозних одиниць, ЦГТ-аза каталізує міжмолекулярної реакцію трансглікозилювання, в результаті якої відбувається перенесення  $\alpha$ -глюкозильних одиниць від вуглеводу і приєднання в положеннях С-13 і С-19 глікозидів стевії ( $\alpha$ -1,4 - трансглікозилювання) [6].

Хімічна схема ферментативної обробки на прикладі стевіозиду в присутності ЦД, як донора глікозильних одиниць представлена на (рис. 3.3).



**Рис. 3.3 Трансглікозилювання стевіозиду за допомогою ЦГТ-ази в присутності ЦД (донор)**

При використанні ЦГТ-ази, спостерігалось поліпшення смакових властивостей стевіозиду, підвищувалась його розчинність. У праці [29] показано, що найкращих результатів досягли при використанні 8 ОД активності ферменту на 1 г стевіозиду.

Враховуючи вищенаписане ми можемо розрахувати річну потребу у ферменті ЦГТ-ази для трансглікозилювання стевіозиду. З 1 га засіяного стевією отримують від 140 до 200 кг чистого стевіозиду [28]. Приймаємо середнє значення 170 кг. А так як вирощування стевії на території України здійснюється на 20 га [27], то отримаємо наступне:

$$1 \text{ га} - 170 \text{ кг}$$

$$20 \text{ га} - x$$

$$X = (20 \cdot 170)/1 = 3400 \text{ кг}$$

Тобто з 20 га землі отримаємо 3400 кг чистого стевіозиду.

Далі розраховуємо необхідну кількість одиниць активності ферменту:

$$1 \text{ г стевіозиду} - 8 \text{ од. акт. ЦГТ-ази}$$

$$3\,400\,000 \text{ г стевіозиду} - y \text{ од. акт. ЦГТ-ази}$$

$$Y = (3\,400\,000 \cdot 8)/1 = 27\,200\,000 \text{ од. акт. ЦГТ-ази}$$

### 3.2 Розрахунок потужності виробництва

На ринку України представлені ферментні препарати ЦГТ-аз виготовлені в різних країнах, зокрема:

Таблиця 3.2

#### Препарати ЦГТ-ази представлені на ринку України

Країна виробник	Товарна форма	Фасовка
Китай (Shanghai Soyoung Biotechnology Inc)	Сухий порошок	25 кг
Великобританія (Amano Enzyme Europe Ltd)	Сухий порошок	1 кг
Данія (Novozymes)	Сухий порошок	10 кг
США (US Biological)	Сухий порошок	100 мг
Росія («Біохіммаш» (для лабораторних об'ємів))	Сухий порошок	100 мг

**Примітка:** Ціна 6 доларів за 1 г, (0,006 доларів за 1 мг) що еквівалентно 170 грн за 1 г (або 0,17 грн за 1 мг). В усіх препаратах ступінь очищення 10X, одиниці активності 90 од/г.

В Україні виробництво ферменту ЦГТ-ази та ЦД відсутнє, тому розробка науково-обґрунтованих, високоефективних біотехнологій ЦГТ-аз і ЦД є актуальною проблемою сьогодення.

Незважаючи на поставки ферменту з-за кордону, а також зародження розвитку його виробництва в Росії Україна має розробити власне виробництво даного ферменту.

Для того щоб розрахувати потужність виробництва ЦГТ-ази, потрібно від загальної потреби у даному ферменті відняти поставки готового препарату з інших країн, а саме: (50%). Тобто щоб забезпечити ферментом ЦГТ-азою всього 50% ринку України.

Оскільки фермент ЦГТ-аза продукується *Raenibacillus ehimensis* IB-739, з 1 л культуральної рідини, якого отримуємо 3750 од. активності ферменту [7], що є рівним 0,057 г білку (ферменту) [12], то:

$$27\ 200\ 000 \text{ од. активності} - X$$

$$3750 \text{ од. активності} - 0,057 \text{ г білку}$$

$$X = (27\ 200\ 000 \cdot 0,057) / 3750 = 413,44 \text{ г.}$$

Враховуючи, що нам необхідно забезпечити даним ферментом всього 50% ринку України, то отримаємо наступне:

$$G_{\text{нт}} = \frac{413,44 \cdot 50}{100} = 206,72 \text{ г ферменту}$$

Враховуючи те, що 0,057 г ферменту отримуємо з 1 л КР, то 206,72 г ферменту:

$$0,057 \text{ г} - 1 \text{ КР}$$

$$206,72 \text{ г} - Y \text{ КР}$$

$$Y = (206,72 \cdot 1) / 0,057 = 3627 \text{ л КР}$$

Приймаємо, сумарні втрати цільового продукту при виділення які становитимуть 30% (використання у харчовій промисловості), тому необхідно отримати наступну кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = \frac{3626,7}{1 - 0,3} = 5181 \text{ л}$$

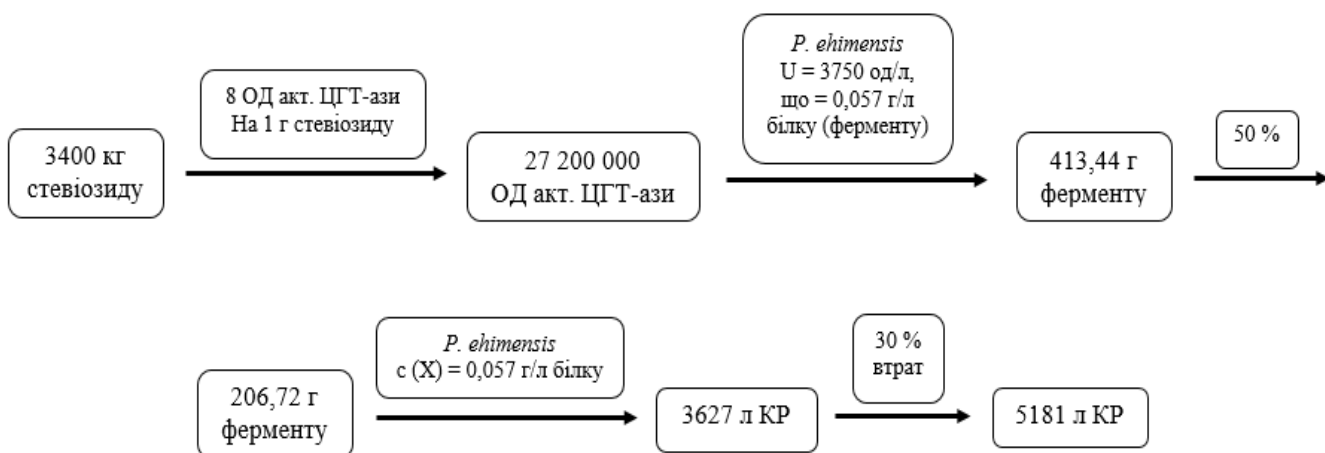


Рис. 3.4 Схема ТЕО потреби ЦГТ-ази для забезпечення ринку України

### 3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для одержання ЦГТ-ази *Paenibacillus ehimensis* IB-739

Дана потреба у ферменті сезонна, так як стевию збирають в основному у вересні (осінні сільськогосподарські роботи), можуть так само два рази на початку червня і на початку вересня. А термін зберігання ЦГТ-ази становить від 3 до 5 місяців.

Для того, щоб забезпечити ринок України нашим ферментом всього на 50% необхідно отримати 206,72 г ферменту.

Прийmemo кількість робочих трудоднів ( $T_{рд} = 40$ ), а вологість сухого продукту 9%, відповідно абсолютно сухої її буде  $CP_{гп} = 91\%$ . Втрати при виробництві приймаємо 30% ( $E_{св}$ ). Тривалість культивування становить 72 години.

1) Розраховуємо кількість ферменту, яку можна отримати за добу, при цьому враховуємо кількість трудоднів ( $T_{рд} = 40$ ).

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 0,20672 / 40 = 0,00517 \text{ кг/добу або } 5,2 \text{ г/добу}$$

2) Кількість готового продукту за цикл становитиме наступне:

$$G_{цк} = (G_{нтд} \cdot T_{ц}) / 24 = (0,00517 \cdot 80) / 24 = 0,01723 \text{ кг/цикл або } 17,23 \text{ г/цикл}$$

де  $T_{ц}$  – цикл роботи ферментера, який включає в себе тривалість виробничого біосинтезу (72 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год).

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

Після завершення всіх циклів, приміщення та обладнання переобладнують для виробництва іншого ферменту – кристалічної  $\alpha$ -амілази.

3) В подальших діях використовуємо  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1$ ). Далі знаходимо об'єм КР (культуральної рідини), що зливається за одну ферментацію з урахуванням втрат при виділенні з урахуванням втрат ( $E_{св} = 30\%$ ) буде наступним:

$$V_{кр} = (K_1 \cdot G_{цк} \cdot CP_{гп}) / ((P_{кр} \cdot (1 - E_{св}))) = (1,1 \cdot 0,01723 \cdot 0,91) / (0,057 \cdot (1 - 0,3)) = 0,432 \text{ м}^3 = 432 \text{ л}$$

4) Кількість циклів ферментації відповідно становитиме:

$$N_{цк} = G_{нт} / G_{цк} = 0,20672 / 0,01723 = 12 \text{ циклів}$$

Після завершення всіх циклів і робіт, приміщення та обладнання переобладнують для виробництва іншого ферменту, наприклад,  $\alpha$ -амілази.

5) Розраховуємо вихід препарату у кг з 1  $\text{м}^3$  КР:

$$P_{кр} = G_{цк} / V_{кр} = 0,01723 / 0,432 = 0,0399 = 0,04 \text{ кг}$$

При визначеному коефіцієнту заповнення ( $K_{зап} = 0,5-0,6$ ) 432 л

культуральної рідини ( $V_{кр}$ ), що зливається за один цикл, враховуючи втрати, можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого становитиме:

$$V_{г} = V_{кр} / K_{зап} = 432/0,5 = 864 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер:  $V_{ф} = 1000 \text{ л}$  ( $1\text{м}^3$ ) при цьому уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = 432/1000 = 0,43$$

### **3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази *Paenibacillus ehimensis* IB-739**

Для отримання  $V_{кр} = 432 \text{ л}$  культуральної рідини у ферментері потрібно врахувати втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становитимуть 10%. Отже кількість поживного середовища і посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом у самому ферментері буде становити:

$V_{роб1} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 432 / (1 - 0,1) = 480 \text{ л}$ , де  $E_{ф}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюватиметься у ферментері з робочим об'ємом  $V_{роб1} = 480 \text{ л}$ .

Вибравши коефіцієнт заповнення ( $K_{зап} = 0,5$ ), розрахуємо можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{ф}$ ), що становить:

$$V_{ф} = V_{роб1} / K_{зап} = 480/0,5 = 960 \text{ л}$$

Прийmemo найближчий за об'ємом стандартний ферментер:  $V_{сф} = 1000 \text{ л}$  ( $1\text{м}^3$ ) та уточнюємо прийнятий нами раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап1} = V_{роб1} / V_{сф} = 480/1000 = 0,48$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,45-0,55), тому геометричний об'єм ферментера вибрано вірно. Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становитиме 10% від об'єму самого поживного середовища.

Отже кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб1} / (1 + X_{вф}) = 480 / (1 + 0,1) = 436,4 = 436 \text{ л}$$

де  $X_{вф}$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу буде становити наступне:

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 480 - 436 = 44 \text{ л}$$

Для отримання 44 л посівного матеріалу в посівному апараті нам необхідно врахувати втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%. Тоді кількість поживного середовища і посівного матеріалу перед культивуванням у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - X_{па}) = 44 / (1 - 0,1) = 48,9 = 49 \text{ л},$$

де  $X_{па}$  – втрати інокуляту під час культивування.

Кількість посівного матеріалу (доза) становитиме 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті становитиме:

$$V_{пс2} = V_{роб2} / (1 + X_{па}) = 49 / (1 + 0,1) = 44,5 \text{ л},$$

де  $X_{па}$  – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 49 - 44,5 = 4,5 \text{ л}.$$

Кількість інокуляту  $V_{роб2} = 49$  л можна одержати в період культивування бактерій у посівному апараті геометричний об'єм якого:

$$V_{па2} = V_{роб2} / K_{зап} = 49 / 0,5 = 98 \text{ л}.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 100$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап2} = V_{роб2} / V_{сф} = 49 / 100 = 0,49$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,6), отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

Для отримання 4,5 л посівного матеріалу в посівному апараті нам необхідно врахувати втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%. Тоді кількість поживного середовища і посівного матеріалу перед культивуванням у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб3} = V_{пм2} / (1 - X_{па}) = 4,5 / (1 - 0,1) = 5 \text{ л},$$

де  $X_{па}$  – втрати інокуляту під час культивування.

Кількість посівного матеріалу (доза) становитиме 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті становитиме:

$$V_{псз} = V_{робз} / (1 + X_{па}) = 5 / (1 + 0,1) = 4,5 \text{ л,}$$

де  $X_{па}$  – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пмз} = V_{робз} - V_{псз} = 5 - 4,5 = 0,5 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{робз} = 5$  л можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті геометричним об'ємом:

$$V_{паз} = V_{робз} / K_{зап} = 5 / 0,5 = 10 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 10$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{запз} = V_{робз} / V_{сф} = 5 / 10 = 0,5$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,6), отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

Кількість посівного матеріалу для засіву інокулятора  $V_{пмз} = 0,5$  л можна одержати шляхом культивування мікроорганізмів у колбах на качалці. Для цього використовуємо качалочні колби об'ємом  $V_{колб} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Тоді кількість колб для посівного матеріалу становитиме:

$$N_{колб} = V_{пмз} / (V_{колб} \times K_{зк}) = 0,5 / (0,75 \times 0,2) = 3,33 = 4 \text{ качалочних колб.}$$

Отже, процес одержання інокуляту для забезпечення біосинтезу ферменту ЦГТ-ази у ферментері об'ємом  $1000$  л ( $1 \text{ м}^3$ ) з коефіцієнтом заповнення  $0,5$  проходить в три етапи: 1 – вирощування в лабораторії (у пробірках на скошеному агаризованому середовищі і в колбах на качалці на рідкому поживному середовищі; 2-3 – вирощування в посівному апараті та інокуляторі об'єм яких відповідно: 2 –  $0,01 \text{ м}^3$ ; 3 –  $0,1 \text{ м}^3$ ; 4 – виробничий біосинтез у ферментері об'ємом  $1 \text{ м}^3$ .

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату

Джерелом вуглецю та енергії у поживному середовищі для синтезу ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази є крохмаль [7], основною складовою якого є глюкоза. У зв'язку з відсутністю у Кіотській енциклопедії генів і геномів для *Raenibacillus ehimensis* схеми шляхів метаболізму окиснення даного субстрату, як приклад наводимо її для *Bacillus amyloliquefaciens* CC178, який також є продуцентом циклодекстрин-глюканотрансферази.

Оскільки, крохмаль – це полімер, він не може проникати через клітинну мембрану. Тому мікроорганізм синтезує позаклітинні ферменти, що розкладають його до невеликих молекул, які в подальшому можуть транспортуватись у клітину (рис. 4.1) (KEGG – дод. 1).



Рис. 4.1 Гідроліз крохмалю

Ферменти: 1 –  $\alpha$ -амілаза (КФ.3.2.1.1); 2 – оліго-1,6-глюкозидаза (КФ.3.2.1.10).

Згідно з KEGG катаболізм у *Bacillus amyloliquefaciens* CC178 відбувається за гліколітичним шляхом (рис.4.2) (KEGG – дод. 2), про що свідчить наявність відповідного ключового ферменту 6-фосфофруктокінази (КФ 2.7.1.11).

Гліколізу у *Bacillus amyloliquefaciens* CC178 притаманні певні особливості, пов'язані з ферментами, що функціонують у даному метаболічному шляху.

Спочатку D-глюкоза перетворюється за допомогою ферменту глюкокінази (КФ 2.7.1.2) на D-глюкозо-6-фосфат, який вже заключається в гліколіз і далі переходить у фруктозо-6-фосфат за допомогою ферменту

					НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Бондарчук В.І.			Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.					Д	37	169
Керівник		Скряцька О. І.			Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Пирог Т.П.					

глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9). З фруктозо-6-фосфату під дією 6-фосфофруктокінази I (КФ 2.7.1.11) утворюється фруктозо-1,6-дифосфат.

Фермент фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13), здійснює перетворення фруктозо-1,6-дифосфату на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат. Перетворення 3-фосфогліцерату на 1,3-дифосфогліцерат відбувається за допомогою гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12), подальше перетворення на 3-фосфогліцерат та 2-фосфогліцерат зумовлюють ферменти фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3) та фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12) відповідно. Далі 2-фосфогліцерат перетворюється на фосфоенолпіруват під дією ферменту енолази (КФ 4.2.1.11).

Заключною стадією гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату на піруват, що каталізується ферментом піруваткіназою (КФ 2.7.1.40).

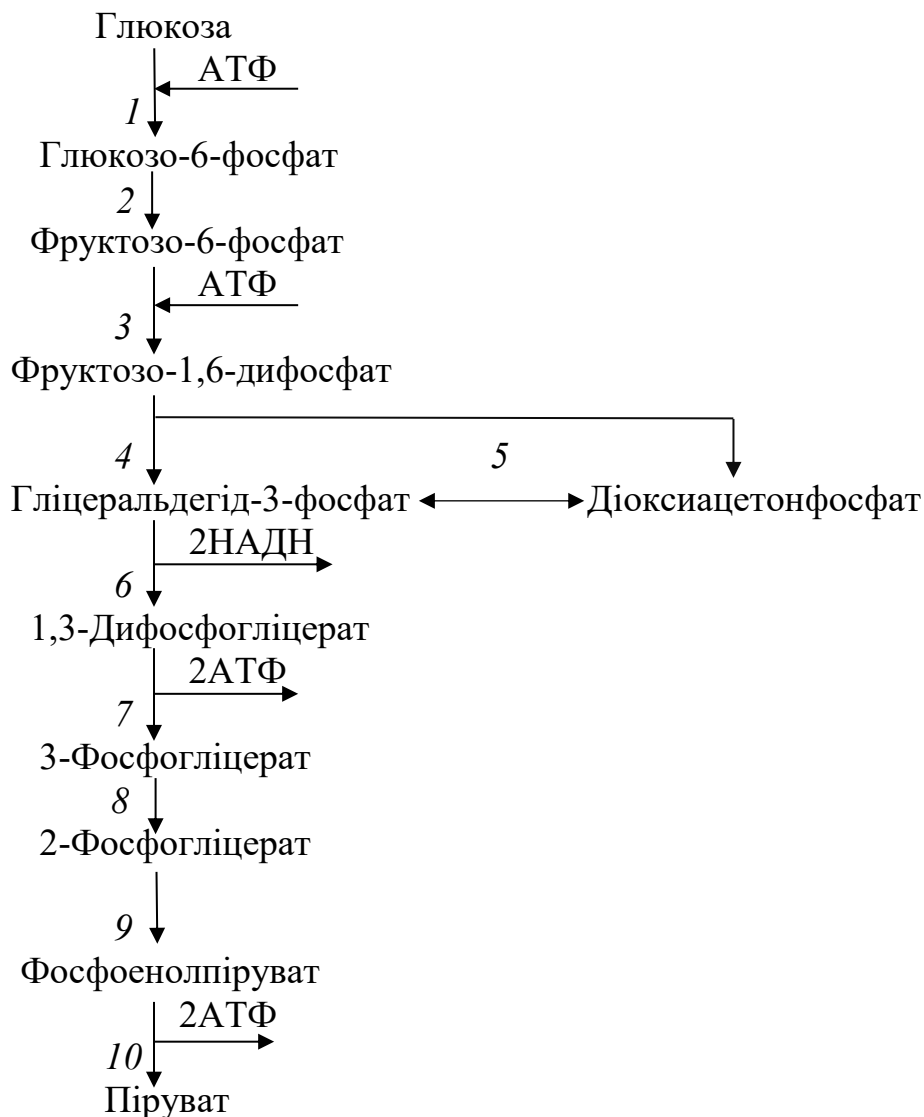


Рис. 4.2 Гліколітичний шлях (шлях окиснення глюкози)

**Ферменти:** 1 – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13); 5 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-біфосфатзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

#### 4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Циклодекстрин-глюканотрансфераза – фермент, а отже білок, до складу якого входять певні амінокислоти. Не маючи точного амінокислотного складу даного ферменту, то синтезуємо всі 20 амінокислот. Всі вони утворюються з певних метаболічних попередників (рис. 4.3).

<b>Попередники біосинтезу амінокислот</b>	
<b>Попередник</b>	<b>Амінокислота</b>
Піруват	Аланін, валін, лейцин
Оксалоацетат	Аспарат, аспарагін, метіонін, пілін, треонін, ізолейцин
2-Оксоглутарат	Глутамат, глутамін, аргінін, пролін
3-Фосфогліцерат	Серин, гліцин, цистеїн
Фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат	Фенілаланін, тирозин, триптофан
5-Фосфорибозил-1-пірофосфат + АТФ	Гістидин

Рис. 4.3 Попередники синтезу амінокислот

Піруват є кінцевим продуктом гліколізу. Оксалоацетат і 2-окоглутарат – це інтермедіати циклу трикарбонових кислот. Фосфоенолпіруват і 3-фосфогліцерат є проміжними продуктами гліколітичного шляху. А еритрозо-4-фосфат і 5-фосфорибозил-1-пірофосфат отримуємо з пентозофосфатного циклу. Далі через ряд перетворень за допомогою відповідних ферментів синтезуємо всі 20 амінокислот.

Також у *Raenibacillus ehimensis* IB-739 та *Bacillus amyloliquefaciens* CC178 (для якого ми наводимо схему біосинтезу нашого ферменту), як і у всіх мікроорганізмах, що ростуть на вуглецевому середовищі функціонують наступні анаплеротичні реакції:

- карбоксилювання фосфоенолпірувату з утворенням оксалоацетату;
- карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату.

Шлях утворення гістидину починається з  $\alpha$ -D-глюкозо-6-фосфат який під дією ферменту глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на  $\beta$ -D-глюкозо-6-фосфат. В ряді подальших перетворень отримуємо сполуку рибулозо-5-фосфат, з якої далі утворюються ксилулозо-5-фосфат і рибозо-5-фосфат за допомогою рибулозо-фосфат-3-епімерази (КФ 5.1.3.1) та рибозо-5-фосфат ізомерази В (КФ 5.3.1.6) відповідно. В подальшому з рибозо-5-фосфат під дією фермента рибозо-фосфат пірофосфокінази (КФ 2.7.6.1) утворюється 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. При подальших реакціях за допомогою ферменту імідазолгліцерол-фосфат синтази субодиниці HisF (КФ 4.3.2.10) отримуємо проміжну сполуку імідазол-гліцерол-3-фосфат.

Кінцевим етапом синтезу гістидину є перетворення гістидиналю в дану амінокислоту за допомогою гістидинол дегідрогеназа (КФ 1.1.1.23).

Наступним етапом є синтез ароматичних амінокислот. Фенілаланін, тирозин і триптофан синтезуються іншим шляхом. Фермент 3-деокси-7-фосфогептулонат синтаза (КФ 2.5.1.54) конденсує еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват з утворенням  $C_7$  – сполуки, яка піддається циклізації. В подальшому отримуємо шикінат. З 3-дегідрошикінат за допомогою шикінат дегідрогенази (КФ 1.1.1.25). Через ряд ферментативних реакції, останнім ферментом в якій є хоризмат синтаза (КФ 4.2.3.5) перетворюється у хоризмат. У цій точці біосинтетичний шлях розгалужується на 2: утворення триптофану через антранілат та утворення тирозину і фенілаланіну через префенат. Останній утворюється за допомогою ферменту хоризмат мутази (КФ 5.4.99.5). Далі наша сполука розгалужується на фенілпіруват і 4-гідроксифенілпіруват під дією префенат дегідратази (КФ 4.2.1.51) і префенат дегідрогенази (КФ 1.3.1.12) відповідно. З першої утворюється фенілаланін, а з другої тирозин за допомогою гістидинол-фосфат амінотрансферази (КФ 2.6.1.9).

В подальшому повертаємось до пірувату, який є вихідною сполукою для трьох амінокислот: аланіну, валіну і лейцину. Перша утворюється в результаті

однієї реакції з пірувату за допомогою ацетолактат синтази I/III малої субодиниці (КФ 2.2.1.6). Для інших двох з пірувату в ряду реакцій утворюється 2-оксоізовалерат під дією дигідрокси-кислоти дегідратази (КФ 4.2.1.9), з якого одразу утворюється амінокислота валін за допомогою лейцин дегідрогенази (КФ 1.4.1.9). Після 2-оксивалерату в ряду послідовних реакцій отримуємо проміжну сполуку 4-метил-2-оксопентаноат в результаті спонтанного перетворення з 2-ізопропіл-3-оксосукциату. Останньою реакцією синтезу лейцину є перетворення з 4-метил-2-оксопентаноату в дану амінокислоту за допомогою лейцин дегідрогенази (КФ 1.4.1.9)

Далі повертаємось до циклу трикарбонних амінокислот де з одного з інтермедіатів, а саме: 2-оксоглутарату, в ряді ферментативних реакцій утворюються глутамат, глутамін, пролін та аргінін. Першою реакцією є утворення з 2-оксоглутарату за допомогою ферменту глутамат синтази  $\beta$ -субодиниці (КФ 1.4.1.13) глутамату, з якого отримуємо глутамін під дією глутамін синтетази (КФ 6.3.1.2). Також з глутамату утворюється L-глутаміл фосфат під дією глутамат 5-кінази (КФ 2.7.11). Наступною реакцією є утворення L-глутамат-напівальдегід за допомогою ферменту глутамат-5-напівальдегід дегідрогенази (КФ 1.2.1.41). Далі з L-глутамат-напівальдегіду утворюється 1-піролін-5-карбоксилат. І кінцевим етапом є утворення проліну з останнього за допомогою піролін-5-карбоксилат редуктази (КФ 1.5.1.2). З глутамату також утворюється N-ацетил-глутамат в результаті дії глутамат N-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.1). В ряду подальших ферментативних реакцій ми отримуємо ще одну проміжну сполуку для синтезу аргініну - N-ацетилорнітин за допомогою ацетилорнітин амінотрансфераза (КФ 2.6.1.11) з N-ацетилглутамату напівальдегіду. N-ацетилорнітин під дією ферменту ацетилорнітин деацетилаза (КФ 3.5.1.16) транспортується у орнітин. Останній за участі ферменту орнітин-карбамоїлтрансферази (КФ 2.1.3.3) утворює цитрулін. Він конденсується з аспаратом за участі аргіносукцинат синтази (КФ 6.3.4.5) з утворенням аргіносукцинату, який трансформується аргіносукцинат лігазою (КФ 4.3.2.1) з виділенням аргініну і фумарату (повертається у цикл трикарбонних кислот).

Аспартат утворюється з оксалоацетату з участі ферменту аспартат-амінотрансферази (КФ 2.6.1.1), за допомогою ферменту аспарагін синтази (КФ 6.3.5.4) аспартат перетворюється на аспарагін.

Фермент аспартат кіназа (КФ 2.7.2.4) перетворює аспартат на 4-аспартилфосфат, який далі ферментом аспартат-напівальдегід дегідрогеназою (КФ 1.2.11), трансформується у аспартат-4-напівальдегід, з якого за допомогою 4-гідрокси-тетрагідродипіколінат синтази (КФ 4.3.3.7) утворюється 4-гідрокси-2,3,4,5,-тетрагідро дипіколінат, а також за участі ферменту гомосерин дегідрогенази (КФ 1.1.1.3) –гомосерин.

В результаті синтезу першого продукту ми в подальшому отримуємо лізин. З 4-гідрокси-2,3,4,5,-тетрагідро дипіколінату за участі фермента 4-гідрокси-тетрагідродипіколінат редуктаза (КФ 1.17.1.8) утворюється L-2,3,4,5,-тетрагідро дипіколінат. Далі з останнього ми отримуємо N-ацетил-L-2-аміно-6-оксопімелат за дії тетрагідродипіколінат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.89). В результаті подальших ферментативних реакцій ми отримуємо мезо-2,6 діамінопімелат під дією діамінопімелат епімераза (КФ 5.1.1.7). Останній проміжний продукт перетворюється у лізин за допомогою діамінопімелат декарбоксилаза (КФ 4.1.1.20).

Повертаючись до вищесказаного ми також з аспартат-4-напівальдегіду отримали гомосерин, який в подальшому дає початок метаболічним шляхам в яких утворюється метіонін, треонін та ізолейцин, а також гліцин, серин, цистеїн.

Гомосерин за участі ферменту гомосерин O-сукцинілтрансфераза (КФ 2.3.1.46) утворює O-сукциніл-L-гомосерин, з якого далі під дією одного фермента цистатіонін  $\gamma$ -синтаза (КФ 2.5.1.48) синтезується дві сполуки: гомоцистеїн та L-цистатіонін. З яких утворюємо метіонін під дією гомоцистеїн метилтрансферазою (КФ 2.1.1.10) і 5-метилтетрагідропероїлтриглутамат - гомоцистеїн метилтрансферазою (КФ 2.1.1.14), а також цистеїн за допомогою цистатіонін  $\beta$ -ліаза (КФ 4.4.1.1) відповідно. З гомосерину під дією гомосерин кінази (КФ 2.7.1.39) утворюємо O-фосфо-L-гомосерин, який дає початок для синтезу треоніну треонін синтазою (КФ 4.2.3.1). Треонін дає розгалуження на

2-оксобутаноат та L-2-аміно-ацетоацетат під дією ферментів треонін дегідратази (КФ 4.3.1.19) і треонін 3-дегідрогенази (КФ 1.1.1.103) відповідно.

Перший разом з піруватом конденсується за участю ферменту ацетолактат синтази I/III малої субодиниці (КФ 2.2.1.6) з утворенням 2-ацето-2-гідроксибутаноат. В ряді подальших ферментативних реакції отримуємо 3-метил-2-оксопентаноат за допомогою дигідрокси-кислоти дегідратази (КФ 4.2.1.9). З останнього синтезуємо ізолейцин під дією двох ферментів: лейцин дегідрогеназа (КФ 1.4.1.9) та амінотрансферази амінокислот з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42).

Також з треоніну ми отримуємо L-2-аміно-ацетоацетат за участі треонін 3-дегідрогенази (КФ 1.1.1.103). Він дає можливість синтезу гліцину під дією гліцин С-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.29). Гліцин одразу перетворюється на серин за допомогою гліцин гідрометилтрансферази (КФ 2.1.2.1). Останній перетворюється на проміжну сполуку для синтезу цистеїну, а саме: О-ацетил-L-серин за участі серин ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.30). З останньої сполуки за допомогою цистеїн синтази (КФ 2.5.1.47) утворюємо цистеїн.

Таким чином ми насинтезували всі 20 амінокислот, який формують наш фермент - циклодекстрин-глюканотрансферазу. Загальна схема катаболізму ростового субстрату і його біотрансформація у цільовий продукт а також перелік ферментів, що беруть участь у даних реакціях наведені в додатках.

## РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

#### 5.1.1 Обґрунтування способу культивування

*Paenibacillus ehimensis* IB-739 (раніше *Bacillus ehimensis*) [17] – мезофільний мікроорганізм, так як оптимальною температурою для синтезу ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази – цільового продукту даного мікроорганізму є 37-39°C. Значення рН близьке до нейтрального, коливається в межах від 7,0 до 7,2 [13]. Дані умови створюють потенційний ризик контамінації сторонньою мікрофлорою. Отже, виникає необхідність забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, чого неможливо досягти при поверхневому культивуванні. Тому для культивування даного мікроорганізму є доцільним використання глибинного способу.

Глибинне культивування - це спосіб, який переважає у мікробіологічних виробництвах. Воно має ряд наступних переваг: менш трудомістке і його легше автоматизувати та контролювати, а найголовніше - отримати більший вихід продукції. Зазначимо те, що за даного способу культивування поживні речовини середовищ споживаються мікроорганізмами раціональніше, внаслідок чого скорочуються відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого поживного середовища [30]. Стерилізація обладнання, комунікацій та поживного середовища, аераційного повітря також забезпечить необхідні асептичні умови при виробничому біосинтезі. Для запобігання контамінації у ферментері важливим параметром є так само створення надлишкового тиску.

*P.ehimensis* IB-739 – грампозитивний, спороутворюючий аероб, який потребує достатньої аерації для культивування [18], відповідно ферментер повинен бути оснащений барботером. Фермент ЦГТ-аза, яку продукує *P.ehimensis* IB-739 є позаклітинним метаболітом, тобто виділяється в культуральну рідину [12], а отже для більш ефективного виділення цільового продукту продуцент культивується на рідкому поживному середовищі, тоді

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>			
<b>Змн.</b>	<b>Лист</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
Розроб.		Бондарчук В.І.			<b>РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Консульт.						Д	44	169
Керівник		Скороцька О. І.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Пирог Т.П.						

ферментер повинен бути оснащений мішалкою.

Глибинне культивування мікроорганізмів може бути періодичним або безперервним. Останнє являє собою тривалу, довгострокову операцію, що займає чималий проміжок часу, в ході якого поживні речовини додають в середовище в міру їх витрачання, а надлишок культури відбирають [14]. Варто зазначити, що за періодичного способу культивування весь об'єм поживного середовища засівають чистою культурою і вирощування відбувається в оптимальних умовах протягом відповідного часу до накопичення потрібної кількості цільового продукту.

Зважаючи на те, що ЦГТ-аза – це фермент, який досягає максимальної концентрації та активності у стаціонарній фазі, то доцільніше буде використати саме періодичне культивування, оскільки при безперервному культивуванні культура постійно знаходиться у експоненційній фазі росту.

Отже, культивування *P.ehimensis* IB-739 необхідно здійснювати глибинно періодичним способом, при цьому підтримуючи аерацію стерильним повітрям.

### **5.1.2 Обґрунтування вибору ферментера**

При виборі ферментера враховують морфолого-культуральні, а також фізіолого-біохімічні особливості штаму продуцента, а також економічні аспекти потреби продукції. *P.ehimensis* IB-739 – аероб [12], а тому для виробничого біосинтезу цільового продукту, необхідна постійна аерація, яку можна досягти, встановивши барботер. Він забезпечить безперервну подачу стерильного повітря, а також забезпечить додаткове перемішування у ферментері та підвищить показники ефективності культивування продуцента.

Для забезпечення контролю за рН середовища, необхідно встановити у ферментер відповідний датчик, що відображає значення рН.

Середовище для культивування містить дріжджовий екстракт і пептон, які спричиняють піноутворення, тому необхідний піногасник для забезпечення нормальних умов культивування продуцента.

Для забезпечення високого рівня масообміну нам необхідно перемішування. Його можна досягти за рахунок мішалки. Врахуємо те, що

*P.ehimensis* IB-739 характеризується здатністю до утворення екзополісахаридів альгінатного типу, що в процесі культивування призводить к формуванню в'язучого середовища (50-70 сПа) [2]. Для малов'язких рідин, зазвичай, використовують швидкохідні мішалки (турбінні, гвинтові), для високов'язких — тихохіді. Отже проаналізувавши різні типи мішалок, можна використовувати, лопатеву мішалку, так як межа застосування по в'язкості становить 0,1 - 50 Па\*с [31], а кількість лопатей візьмемо 6. В апараті для культивування варто також встановити відбивні перегородки для запобігання утворення воронки, які, до того ж, будуть сприяти виникненню вихрів тим самим збільшуватимуть турбулентність системи, що буде призводити до підвищення ефективності перемішування.

Отже, для ферментації *P.ehimensis* IB-739 необхідно обрати ферментер з лопатевою мішалкою, барботером, механічним піногасником та відбивними перегородками. Обираємо ферментер об'ємом 1 м<sup>3</sup>, з коефіцієнтом заповнення 0,48. Прикладом даного апарата може слугувати пілотний ферментер фірми Bioengineering.



Рис 5.1. Ферментер пілотний р-типу

### 5.1.3 Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, для культивування *Paenibacillus ehimensis* IB-739 – продуцента ЦГТ-ази

Виробництво ферменту на основі культивування *P.ehimensis* IB-739 здійснюється впродовж 40 днів. Приблизний план приміщення наведений на рис. 5.2, в якому встановлюємо ферментер – Фр (об'ємом 1000 л (1м<sup>3</sup>), посівний

апарат - ПА (100 л); інокулятор – І (10 л), два реактори-змішувачі (Р1, Р2). Він має площу  $7 \times 7 = 49 \text{ м}^2$ .

Варто зазначити, що вона зумовлена тим, що відстань між апаратами, відповідно до вимог, має становити не менше 1 м і від стін не менше 1,5 м. Автоклав та качалки будемо розташовувати в лабораторному приміщенні.

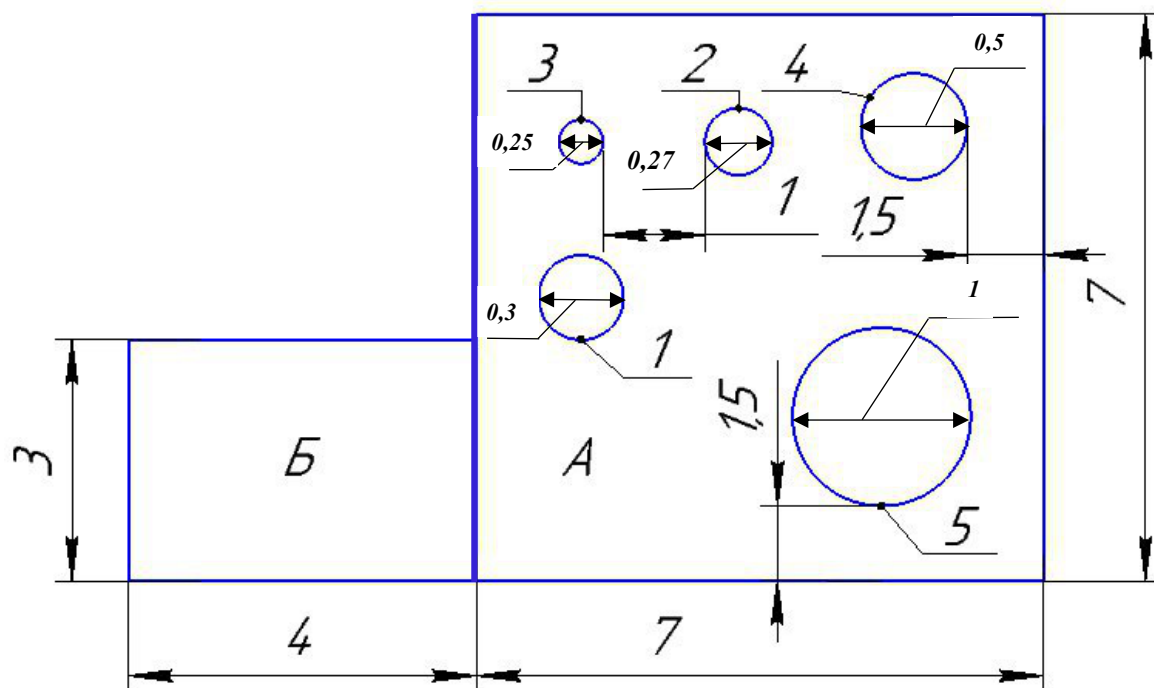


Рис. 5.2 План виробничого приміщення для виробництва ферменту ЦГТ-ази культивуванням *Paenibacillus ehimensis* ІВ-739

*А* – виробниче приміщення (1 – реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції *А*; 2 – реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції *Б*; 3 – інокулятор, 4 – посівний апарат, 5 – ферментер)

*Б* – лабораторне приміщення

Розміри обладнання наведені в табл 5.1.

Таблиця 5.1

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва ферменту ЦГТ-ази *Paenibacillus ehimensis* ІВ-739

Обладнання	Геометричний об'єм, м <sup>3</sup>	Діаметр, м
Ферментер	1	1
Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції <i>А</i>	0,02	0,3

Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	0,014	0,27
Посівний апарат	0,1	0,5
Інокулятор	0,01	0,25
<b>Всього</b>	<b>1,144 м<sup>3</sup></b>	

Висота стін становить 4 м. Так як приміщення не має певного класу чистоти і не потребує дотримання правил строгої асептики, тому здійснюємо миття стіни на висоту лише 2,5 м. Отже загальна площа миття стін у виробничому приміщенні відповідно становитиме:

$$((7 \times 2,5) + (7 \times 2,5)) \times 2 = 70 \text{ м}^2$$

Виробництво включає також лабораторне приміщення для проведення різноманітних операцій, де знаходяться автоклави, бокс, термостати, холодильники, вимірювальні прилади, тощо. Оптимальна площа такого приміщення становить: 12 м<sup>2</sup> (3•4 м), отже площа підлоги відповідно 12 м<sup>2</sup>. Висоту стін, яку необхідно мити також складає 2,5 м. Загальна площа стін у лабораторному приміщенні буде наступною:

$$((3 \times 2,5) + (4 \times 2,5)) \times 2 = 35 \text{ м}^2$$

Враховуючи вищенаписане загальна площа стін, яку необхідно мити у виробничому та лабораторному приміщеннях становить 105 м<sup>2</sup>.

Загальний об'єм обладнання для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу та реакторів-змішувачів становить 1,144 м<sup>3</sup>. А кількість виробничих циклів відповідно 12. Обладнання необхідно ретельно мити та дезінфікувати всередині і зовні перед кожним виробничим циклом, тобто 12 рази на рік (кількість циклів на рік).

Тоді загальний об'єм миття апаратури становитиме:

$$1,144 \times 12 = 13,728 \text{ м}^3$$

Площа підлоги становить 61 м<sup>2</sup> (49 м<sup>2</sup> виробничого приміщення і 12 м<sup>2</sup> лабораторного). Миття здійснюється кожного дня (40 разі у відповідності до кількості трудоднів). Так, як генеральне прибирання здійснюється раз на місяць, під час якого миють та дезінфікують стіни, двері та вікна, то визначаємо, що буде проведено два генеральних прибирання. Для санітарно-епідеміологічної

обробки повітря і поверхонь приміщень необхідно використовувати бактерицидні лампи. Їх вмикають за відсутності в приміщенні людей на 1-2 години саме після генерального прибирання.

Узагальнений розрахунок площі поверхонь, які потрібно мити та/або дезінфікувати наведено в *табл.5.2*.

*Таблиця 5.2*

**Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва ферменту ЦГТ-ази**

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість процесів миття та/або дезінфекцій за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )
Обладнання, інвентар, комунікації	1,144	12	13,728
Підлога	61	40	2440
Стіни, двері, вікна	105	2	210

#### **5.1.4 Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів**

Санітарну обробку необхідно проводити після використання обладнання та після закінчення технологічного процесу. У випадку безперервної роботи - санітарну обробку проводять вже саме після закінчення робочого циклу.

Мийно-дезінфікувальні асоби необхідно використовувати з інтервалом в 3 місяці, для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів чи будь-яких резистентних форм. Так як виробництво триває лише 40 трудоднів, отже достатньо лише одного м'якого засобу - для оброблення поверхонь.

Обладнання, яке не використовується вже після миття і дезінфекції більше 6 годин, повторно споліскується та дезінфікується перед початком наступної роботи [32].

Для вибору м'яких та дезінфікувальних засобів, потрібно врахувати їх вартість, ефективність а також витрати для обробку необхідної площі виробничого приміщення. На 1 м<sup>2</sup> - затрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного або ж дезінфікувального засобу (згідно з методичних

рекомендацій, щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502) [33].

Враховуючи такі вимоги, до миючих та дезінфікуючих засобів саме, як здатність забезпечувати повне змочування всіх поверхонь із різних конструкційних матеріалів, забезпечувати пом'якшення жорсткої води, необхідність забезпечувати повне видалення механічного, білкового чи жирового забруднень шляхом їх безпосереднього диспергування та емульгування, а також бути найбільш ефективними, безпечними і недорогими, тому нами було проаналізовано наступні миючі та дезінфікуючі засоби: кальцинована сода, «Бланідас-А ацид», «Аквалін», «Біоконтакт», «Дезекон», «Фермісепт» (табл. 5.3).

Враховуючи те, що немає необхідності підтримувати певний високий клас чистоти у виробничому приміщенні, тоді щоденне прибирання будемо здійснювати питною водою. Для одного миття підлоги витрачаємо приблизно 6,1 л води, а для всього періоду виробництва – 244 л.

Для миття і дезінфекції обладнання, а саме: ферментера (1 м<sup>3</sup>), посівного апарата (100 л), інокулятора (10 л) та двох реакторів-змішувачів для приготування композицій (на 14 л і 20 л) найкращим вибором є використання СІР-мийки. Автоматизована система СІР-мийки призначена для безпосереднього забезпечення безрозбірного миття обладнання, а також трубопроводів миючими розчинами принципом ополіскування, хімічної та термічної дезінфекції в автоматичному режимі. Установка СІР-мийки дає змогу контролювати необхідну і задані температуру, тиск, об'єм води, концентрацію розчинів, швидкості їх потоку, рівні миючих розчинів в ємностях, необхідний час мийки, також спостерігати відповідний стан клапанів, насосів, аварії, тощо. Варто зазначити, що об'єми миючого засобу при циркуляційній мийці складає 20 % від об'єму обладнання, саме: за рахунок багаторазовій циркуляції мийних засобів в контурі мийки [34].

Миття обладнання, інвентарю, комунікацій від залишків поживного середовища та решти речовин можемо здійснювати кальцинованою содою, миючим засобом з дезінфікуючим ефектом «Бланідас-А ацид» та «Акваклін».

Миття обладнання (1,144 м<sup>3</sup>) відбудуватиметься циркуляційним способом, за допомогою використання СІР-мийки. Об'єм миючого засобу становить - 20% об'єму обладнання. Отже, для одного циклу необхідно витратити близько 228,8 л робочого розчину мийного засобу.

**Кальцинована сода** (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) виробляється у вигляді гранул або ж у вигляді порошку. Вона швидко розчиняється у воді та не відрізняється характерним запахом. Універсальний, водопом'якшуючий, миючий, чистячий засіб. Справляється зі стійкими забрудненнями. Гігроскопічний порошок. Водні розчини мають сильно лужну реакцію, також утворюють кристалогідрати. Серед переваг продукту слід назвати невисоку вартість. Належить, відповідно, до речовин 3-го класу небезпеки відповідно до ГОСТ 12.1.007 (помірно небезпечна речовина). При роботі з кальцинованою содою працівники мають бути оснащеними спеціальним одягом і взуттям, а також індивідуальними засобами захисту, так як при потраплянні аерозолі технічної кальцинованої соди при потраплянні на вологу шкіру чи слизові оболонки очей і носа може викликати роздратування, а при тривалому її впливі - дерматит

Для миття обладнання за допомогою СІР-мийки рекомендовано застосувати робочий розчин з концентрацією кальцинованої соди 1-2% [35].

**Бланідас-А ацид** - порошкоподібний засіб, з широким спектром протимікробної активності (віруліцидна, бактерицидна, туберкулоцидна, фунгіцидна, спороцидна). Кислотний продукт на основі азотної кислоти. За допомогою спеціального інгібітору - пригнічується утворення нітрозних газів в концентраті. Володіє очисними і антинакипними властивостями. Неорганічні відкладення (включаючи оксалат кальцію) розчиняються, органічні компоненти окислюються і видаляються. Концентрація робочого розчину 0,5%. Розчини Бланідас-А ацид легко змиваються, і при цьому, не залишаючи після себе ніяких залишків. Володіє відмінними миючими властивостями. Висока ефективність

досягається при низьких концентраціях Видаляє механічні, білкові чи жирові забруднення. Добре змивається, не залишає нальоту на поверхнях [36].

**Акваклін** – миючий засіб з дезінфікуючим ефектом, створений на основі ортофосфорної кислоти, оцтової кислоти та перекису водню, для використання у фармацевтичній чи харчовій, промисловостях. Концентрація робочого розчину відповідно становить - 2%.

При роботі з даним засобом, або ж його розчинами необхідно завжди використовувати засоби індивідуального захисту за ГОСТ 12.4.103, захисні окуляри типу Г-ГОСТ 12.4.013, а також рукавиці з поліхлорвінілу або інші аналогічні засоби [37].

Для миття та дезинфекції стін, підлоги, вікон та дверей проаналізуємо такі засоби, як «Біоконтакт», «Дезекон», «Фермісепт».

**Біоконтакт** – мийно-дезінфікувальний засіб, котрий містить в якості діючих речовин: гліоксалевої альдегід, глутаровий альдегід, четвертинні амонієві солі, та в якості допоміжних речовин: піноутворюючі компоненти, полігексаметиленгуанідин, інгібітори корозії, а також воду.

Даний засіб - являє собою прозору рідину жовто-коричневого кольору зі слабким специфічним запахом. Препарат проявляє антимікробну дію на грампозитивну та грамнегативну мікрофлору: стафілококи, сальмонели, колібактерії, протей, псевдомонас кластридії (*S.aureus*, *S.enteritidis*, *E.coli*, *Proteus vulgaris*, *P.aeruginosa*, *C.perfringens*, інших бактерій та їх спор), проявляє віруцидну дію (ДНК- та РНК- вмісні віруси), проявляє діє проти дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* тощо). Використовують, зазвичай, 0,1 - 0,3% водний робочий розчин даного препарату. При роботі із засобом та його розчинами необхідно застосовувати засоби особистого захисту. Приготування робочих розчинів проводити у провітрюваному приміщенні де є вода. Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007) [38].

**Дезекон ОМ** - лужний і водночас низькопінний концентрований дезінфекційний засіб на основі композиції четвертинних амонієвих солей, амінів

та бігуанідів для дезінфекції, комплексної мийки, дезодорування. Має бактерицидні (включаючи збудників туберкульозу, *P.aeruginosa*, *S.aureus*), віруліцидні (включаючи віруси гепатитів В, С, ВІЛ, герпесу, грипу), фунгіцидні властивості. При підвищенні температури розчинів їх антимікробну активність і миюча здатність збільшуються. Відноситься до V класу небезпеки (мало небезпечні речовини по ГОСТ 12.1.007-76) при нанесенні на шкіру. Володіє миючими властивостями, які посилюються при підвищенні температури робочих розчинів, добре змиваються, не залишають плям і нальоту, видаляють органічні забруднення. Дезекон ОМ застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації в діапазоні від 0,02% до 5% в залежності від сфери застосування, цілі обробки, виду забруднення, збудника і об'єктів обробки [39].

**Фермісепт** - універсальний та безальдегідний нехлорний засіб для поточної, заключної, профілактичної дезінфекції та одночасного миття всіх типів поверхонь, для проведення генеральних прибирань. Засіб не містить хлору та альдегідів. Універсальне застосування. Відмінно очищає поверхні інструментів без додаткового механічного впливу. Концентрація робочих розчинів має діапазон від 0,02% до 5%, володіють вираженими миючими, дезодоруючими, змочувальними та емульгуючими властивостями. Видаляють механічні, білкові, жирові забруднення, зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів Фермісепт володіє бактерицидною, віруліцидною, фунгіцидною, активністю [40].

Таблиця 5.3.

## Узагальнений розрахунок потреби мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва ЦГТ-ази

Назва мийного/дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або стерилізації	Вартість 1 л/(кг) мийного та/або дезінфікуючого засобу, грн.	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (л)	Кількість робочого розчину на весь період виробництва, л	Загальна вартість миття за весь період, грн
Кальцинована сода <sup>1</sup>	Обладнання, інвертар, комунікації	10	1	0,1	13 728	2746	274,6
Бланідас-А ацид <sup>2</sup>		57	0,5	0,285	13 728	2746	782,6
Акваклін <sup>3</sup>		45	2	0,9	13 728	2746	2471,4
Біоконтакт <sup>4</sup>	Стіни, підлога, вікна, двері, тара	195	0,3	0,585	332	33,2	19,4
Дезекон ОМ <sup>1</sup>		260	1	2,6	332	33,2	86,3
Фермісепт <sup>1</sup>		300	1	3	332	33,2	99,6

**Примітки:** Ціни мийних та/або дезінфікуючих засобів станом на травень 2020: 1 - <https://prom.ua>; 2 - <https://blanidas.com.ua>; 3 - <http://kronos-agro.com.ua>; 4 - <https://agronet.ua>.

Проаналізувавши дані, наведені у *табл. 5.3*, можна зробити наступні висновки:

- для миття обладнання, інвентарю, комунікацій - доцільно застосовувати кальциновану соду, як миючий засіб, так як її загальна вартість є найнижчою серед порівнюваних – 274,6 грн. Вона швидко розчиняється в воді, при цьому не відрізняється характерним запахом. Даний засіб є зручним у приготуванні, добре змивається, не залишає нальоту на оброблюваних поверхнях;
- для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон а також дверей, відповідно для генерального прибирання, варто застосовувати такий мийно-дезінфікувальний засіб, як «Біоконтакт». Він знищує практично всі потенційно небезпечні контамінанти і є найдешевшим серед порівнюваних (19,4 грн), а отже економічно доцільним. Також варто зазначити, що він відноситься до речовин IV класу небезпек.

### **5.1.5 Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій**

До основних стадій підготовки обладнання, а також комунікацій відносять:

- ✓ Миття
- ✓ Технічний огляд
- ✓ Перевірка на герметичність
- ✓ Стерилізація

**Миття.** Для підготовки обладнання та комунікацій доцільно обрати автоматизовану систему миття – СІР-мийку. Основними характеристиками відповідної пакетної мийки - це повторне використання промивної води та миючих розчинів, автоматична підтримка температури і концентрації миючих середовищ, зменшення загального часу мийки, тощо. Процес миття займає близько однієї години, відбувається за такими етапами:

1. Ополіскування водою (температура близько 20°C). Тривалість обробки становить 15 хвилин.
2. Циркуляція розчину кальцинованої соди (температура 75±5°C). Тривалість обробки відповідно 30 хвилин.

3. Ополіскування водою (промивна вода може бути використана повторно).

Температура води  $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ , тривалість процесу відповідно становить 15 хвилин [41].

**Стадія технологічного огляду.** Після миття та ополіскування відповідного ємнісного обладнання для виробництва - проводять перевірку якості проведених робіт, а саме: його технічний огляд, для виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх наявності - необхідно здійснити підтягування різьбових з'єднань, або їх заміну.

**Перевірка на герметичність** є наступним етапом підготовки обладнання і комунікації. Її проводять з метою виявлення можливих неущільнень та їх ліквідацій. На сьогодні існує два методи перевірки на герметичність:

- 1) омилування розчином звичайного господарського мила;
- 2) використання сучасних течіешукачів.

Перший є значно простим і доступним методом, так як в місцях неущільнення апарату виділяються бульбашки. Проте даний метод є досить застарілим і довготривалим, а також менш ефективним порівняно із галогенним методом. Сучасні технології використовують новітні галоїдні течіешукачі, котрі дозволяють фіксувати галогенопохідні алканів. Для цього: необхідно закачати тетрахлорметан, в герметично закриті обладнання та комунікації до тиску 0,3 МПа, далі за допомогою датчика-течіешукача галогенопохідних - БГТШ-5 здійснимо огляд всіх з'єднань відповідного обладнання та у самих комунікацій. У випадку якщо обладнання виявилось негерметичним - пристрій подасть звуковий сигнал.

Якщо нещільності виявлено між з'єднаннями, необхідно ретельно провести їх підтягування та перепаковування, а для обладнання слід здійснити підтягування кришок, або з'єднань і в випадку необхідності - заміну ущільнюючих прокладок люків та кришок.

**Стерилізація обладнання та комунікацій** здійснюють, за допомогою наступних методів: *термічним* (шляхом автоклавування, подачею пари), *хімічний спосіб* (використання дезрозчинів) та *УФ-опроміненням*.

Хімічний спосіб стерилізації використовується, зазвичай, лише для лабораторного обладнання, яке не стійке до впливу високої температури. Використання хімічних методів не забезпечить нам високого рівня асептики, так як можуть виникнути резистентні форми бактерій до використовуваних дезрозчинів. Використання УФ-опромінення є недоцільним, оскільки УФ промені не проникнуть в важкодоступні місця обладнання.

Отже, найдоцільніший метод стерилізації ферментера - термічний спосіб. Основним визнаним в біотехнології стерилізаційним прийомом є обробка обладнання та комунікацій насиченою водяною парою при  $t = 125-145^{\circ}\text{C}$ . Зазначимо те, що даний метод забезпечить високу асептику всередині ферментера, так як пара проникає у всі його важкодоступні місця. Перевага даного способу полягає - саме у його економічності і не потребує довготривалої підготовки.

Стерилізація проводиться - з метою знищення мікроорганізмів та можливих контамінантів Вона включає такі етапи як: нагрівання апарата, сама стерилізація та подальше охолодження обладнання, що стерилізується.

*Нагрів апарата.* Попередньо в сорочку апарата подають глуху пару і відбувається відповідно прогрівання обладнання до температури  $80-90^{\circ}\text{C}$  [42].

#### **5.1.6 Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря для культивування *Paenibacillus ehimensis* IB-739**

*Paenibacillus ehimensis* IB-739 – аероб, для культивування якого, щоб забезпечити синтез ферменту ЦГТ-ази необхідно здійснити аерацію поживного середовища. Основна вимога до аеруючого повітря - це його безпосередня стерильність.

Забір повітря будемо проводити на висоті 10 м над землею, так як враховуючи висоту приміщення: 1 м – фундамент, 4 м – приміщення, 1,5 м – дах та сам повітрязбірник, який розташовується, як правило, на висоті 2-3 метри від поверхні даху.

Саме багатоступінчата система очистки буде забезпечувати необхідну ефективну стерилізацію повітря, що дозволяє запобігти контамінації поживного середовища різними сторонніми мікроорганізмами.

Спершу використовуємо фільтри грубого очищення, у яких фільтраційним матеріалом слугують сітки з металу або тканини з синтетичних волокон (наприклад – акрилу). Ступінь очищення становить: 75 – 80%. Конструюють їх у формі панель з фільтруючими прокладками чи гофрованими листами або іншими матеріалами. Дані фільтри мають структуру, яку можна контролювати. Також варто зазначити, що вони є хімічно інертними, легко очищуються, володіють високою міцністю, і при цьому досить дешеві та прості при процесі виготовленні та самого обслуговування. Отже економічно вигідніше використовувати для очищення повітря фільтр грубої очистки, а у якості матеріалу для фільтрування використовувати сітки з металу, так як вони мають довшу зносостійкість.

У подальших фільтрах тонкого очищення, зазвичай, використовується склотканина. У складчастих фільтрах як правило в основному використовують гофровану фільтруючу тканину зі скловолокна. Рамка фільтра складається з гальванізованого листового металу, а в якості ущільнювача застосовують поліуретан. Саме на таких фільтрах ефективність очищення повітря є значно вищою. Вони також здатні видаляти частинки розміром 1-50 мкм, а ступінь очищення повітря складає відповідно 95%. Зважаючи на те, що до складу фільтрувального матеріалу входить скловолокно, то саме ці фільтри ми вибиратимемо.

Далі для отримання повітря із ступенем очищення 99,99% необхідно використовувати фільтри індивідуальної очистки, що мають встановлюватися безпосередньо перед ферментером. Матеріал для фільтрування можуть використовувати фторопластові фільтри чи фільтри із боросилікату. Вони здатні затримувати частинки розміром 1-0,01 мкм.

Отже, будемо використовувати панельний металічний фільтр фірми «General filter», в якості матеріалу для фільтрування виступає плетена алюмінієва проволока, у якості фільтру грубої очистки, так як ступінь очищення

в такому фільтрі становить 75%. Фільтр тонкої очистки будемо замовляти теж у фірми «General filter», у якості фільтрувального матеріалу буде мікроскловолокно з алюмінієвими розділювачами, ступінь очищення якого в фільтрі тонкої очистки – 95%. Для індивідуальної очистки замовлятимемо фільтр також фірми «General filter», завдяки якому ступінь очищення відповідно становитиме найвищий ступінь - 99,999%. Основу даного фільтру складає гідрофобний матеріал, як сконструйований з просторового боросилікатного мікрофіламентного волокна без зв'язуючих добавок з внутрішнім об'ємом 95% [43].

### **5.1.7 Обґрунтування вибору та підготовка піногасника**

Піногасники та антивспінюючі агенти – це речовини, які можуть руйнувати утворену піну під час процесу культивування. *P.ehimensis* IB-739 культивується глибинним методом з доволі інтенсивною аерацією також в середовищі наявні кукурудзяний екстракт та пептон, що зумовлюють утворення піни. Отже піногасіння відіграє велику роль у такому виробництві. Зазначимо те, що також необхідно дотримуватись збалансованих пінних режимів, тому що при піноутворенні - збільшується міжфазна контактна поверхня і, при цьому, досягається інтенсивний масообмін між поживним середовищем і аеруючим повітрям [44].

Для забезпечення ефективного процесу піногасіння застосовують хімічні, механічні та комбіновані піногасники. Механічного піногасника для такого процесу буде недостатньо.

Хімічні піногасники бувають синтетичні та жирові. Жирам піногасні властивості притаманні, за високих концентрацій – 0,2-1,0% об'єму поживного середовища і вище. Також зазначимо, що в багатьох мікробіологічних процесах жири розкладаються до жирних кислот, які змінюють рН середовища [45].

Ефективнішими піногасниками для застосування є синтетичні, а саме силіконові, які випускаються з метою використання у харчовій промисловості. Силіконові піногасники мають ряд переваг серед інших: кращі за органічні аналоги по піногасним властивостям, швидше працюють, та довше діють. Також

вони економічніші (витрата від 0,00001 до 1% вологи) – їх поверхневий натяг дуже малий, а отже вони, відповідно, досить швидко розтікаються по середовищу. Дані піногасники хімічно інертні до багатьох речовин – діють незалежно від компонентів, які сприяють піноутворенню.

Застосовують в діапазоні температур – від  $-40^{\circ}\text{C}$  до  $+250^{\circ}\text{C}$ . Відрізняються від інших піногасників за такими показниками:

- мала токсичність,
- нелетучість,
- здатність працювати в різних середовищах,
- пожежо- та вибухобезпечність.

До складу силіконових піногасників зазвичай входить силіконове масло, яке має назву полідиметилсилоксан (ПДМС) і діоксиду кремнію. Виготовляються у вигляді емульсій, тобто дуже зручні для диспергування у водне середовище.

Завдяки, саме невеликій в'язкості цих піногасників, вони легко перекачується насосом. Також компоненти самого піногасника не вступають в різні реакції в процесі обробки, тобто є інертними, так, як взаємодіють з середовищем типу «олія-вода». Відпрацьований піногасник не впливає негативно на довкілля, тому, що ПДМС розкладається абіотичним принципом нп:

- вуглекислий газ;
- воду;
- діоксид кремнію.

Отже, у даній роботі, доцільно застосовувати піногасник на основі ПДМС. Обираємо силіконовий піногасник «*XIAMETER® AFE-1510 Antifoam Emulsion*», який є відносно дешевим та дозволеним для використання у процесі вирощуванні бактерій. Товарна форма піногасника вже є готовою для вживання, значення дозування приблизно складає 1% від маси системи.

## Розрахунок кількості силіконового піногасника

Об'єм ферментера, л	Кількість поживного середовища з посівним матеріалом, л	Кількість силіконового піногасника, л
10	5	0,05
100	49	0,49
1000	480	4,8

Готовий для використання хімічний піногасник стерилізують за температури 131°C протягом 40 хв [46].

### 5.1.8 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

*Raenibacillus ehimensis* ІВ-739 вирощують на рідкому поживному середовищі наступного складу, г/л:

- крохмаль - 10;
- пептон - 4
- дріжджовий екстракт - 5;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;
- $\text{CaCO}_3$  – 1.

Вирощування посівного матеріалу проходить на середовищі аналогічного складу.

#### Обґрунтування вибору компонентів

Крохмаль – це полісахарид, основне джерело вуглецю, необхідного для росту бактерій *P.ehimensis* ІВ-739. Варто зазначити, що даний компонент утворює в'язкий розчин і потребує попередньої обробки, тобто спочатку його треба заварити близько 20-30 хв в окремому апараті, в якому там же його і стерилізують.

Дріжджовий екстракт - в основному складається з вільних пептидів. Він натуральним чином збагачений амінокислотами, введений як джерело азоту (містить близько 70% речовин, що мають у своєму складі азот).

Пептон - продукт неповного гідролізу білків, що складається з амінокислот, дипептидів, трипептидів, а також водорозчинних поліпептидів.

$\text{CaCO}_3$  – відіграє роль стабілізації рН поживного середовища, та зменшує його можливу в'язкість.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – це звичайна фосфатна сіль (калій дигідрофосфат), яка є джерелом таких необхідних хімічних елементів як калій і фосфор.

Оскільки дріжджовий екстракт та пептон містять термолабільні речовини у своєму складі, котрі за високих температур втрачають свої властивості, та крохмаль який є полісахаридом, необхідно вибрати для них більш м'який режим стерилізації – температура  $112^\circ\text{C}$ , тиск  $0,1\text{ МПа}$ , впродовж 30 хв. Зазначимо те, що пептон та кукурудзяний екстракт можуть пінитись, тому їх стерилізують разом в одній композиції. А крохмаль може утворювати в'язкі розчини з іншими компонентами, тому також виносимо в окрему композицію.

Решта компонентів не містить у своєму складі термолабільних чи токсичних компонентів, отже стерилізуємо їх за більш екстремального режиму - температури  $131^\circ\text{C}$ , тиску  $0,2\text{ МПа}$ , упродовж 40 хв.

### **Приготування і стерилізація 0,5 л поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках**

На даному етапі вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці необхідним є приготування поживного середовища ( $\approx 0,5\text{ л}$ ), яке необхідно стерилізувати в автоклаві. Отже для стерилізації обираємо автоклав з вертикальним завантаженням, об'ємом 10 л. Склад композицій та режими стерилізацій:

**Композиція А:** заварений крохмаль (стерилізація 30 хв., тиск  $0,05\text{ МПа}$  при температурі  $112^\circ\text{C}$  у термостійкій плоскодонній колбі об'ємом 50 мл);

**Композиція Б:** дріжджовий екстракт, пептон (стерилізація 30 хв., тиск  $0,05\text{ МПа}$  при температурі  $112^\circ\text{C}$  у термостійкій плоскодонній колбі об'ємом 50 мл);

**Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації  $131^\circ\text{C}$ , 40 хв. та тиску  $0,15\text{ МПа}$  у колбі об'ємом 1 л);

**Композиція Г:**  $\text{CaCO}_3$  (стерилізація 40 хв. при температурі  $131^\circ\text{C}$  та тиску  $0,15\text{ МПа}$  у колбі об'ємом 50 мл).

### **Приготування і стерилізація 4,5 л поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 10 л**

На цьому етапі об'єм середовища, що необхідний для вирощування посівного матеріалу у ферментері, становить 4,5 л. Поживне середовище розділимо на ті ж композиції як і в колбах. Стерилізацію проводимо в автоклаві. *Композицію В* розчинаємо у колбі (150 мл), але стерилізуємо у ферментері в автоклаві, попередньо додавши необхідну кількість води.

**Композиція А:** заварений крохмаль (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 °С у термостійкій плоскодонній колбі об'ємом 500 мл);

**Композиція Б:** дріжджовий екстракт, пептон (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 °С у термостійкій плоскодонній колбі об'ємом 300 мл);

**Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації 131 °С, 40 хв. та тиску 0,15 МПа у ферментері об'ємом 10 л);

**Композиція Г:**  $\text{CaCO}_3$  (стерилізація 40 хв. при температурі 131 °С та тиску 0,15 МПа у колбі об'ємом 50 мл).

### **Приготування і стерилізація 44,5 л поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 100 л**

Об'єм поживного середовища становить 44,5 л, яке ми ділимо на такі ж композиції як і на двох попередніх етапах. *Композиції А, Б, Г* готуємо в лабораторному посуді і стерилізуємо у автоклаві. *Композицію В* розчинаємо у колбі (750 мл), але стерилізуємо у ферментері, попередньо додавши необхідну кількість води та врахувавши конденсат.

**Композиція А:** заварений крохмаль (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 °С у термостійкій плоскодонній колбі об'ємом 4 л);

**Композиція Б:** дріжджовий екстракт, пептон (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 °С у термостійкій плоскодонній колбі об'ємом 3 л);

**Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації 131 °С, 40 хв. та тиску 0,15 МПа у ферментері об'ємом 100 л);

**Композиція Г:** CaCO<sub>3</sub> (стерилізація 40 хв. при температурі 131 °С та тиску 0,15 МПа у колбі об'ємом 500 мл).

### **Приготування і стерилізація 436 л поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1000 л**

Об'єм поживного середовища відповідно становить 436 л, яке ми ділимо на такі ж композиції як і в попередніх етапах. *Композицію Г* готуємо в лабораторному посуді і стерилізуємо у автоклаві. *Композицію В* розчинаємо у колбі (4 л), але стерилізуємо вже у ферментері, попередньо додавши необхідну кількість води, та врахувавши конденсат. *Композицію А та Б* готуємо у відповідних реакторах-змішувачах та стерилізуємо безпосередньо у автоклаві.

**Композиція А:** заварений крохмаль (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 °С у реакторі-змішувачі об'ємом 36 л);

**Композиція Б:** дріжджовий екстракт, пептон (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 °С у реакторі-змішувачі об'ємом 20 л);

**Композиція В:** КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (режим стерилізації 131 °С, 40 хв. та тиску 0,15 МПа у ферментері об'ємом 1000 л);

**Композиція Г:** CaCO<sub>3</sub> (стерилізація 40 хв. при температурі 131 °С та тиску 0,15 МПа у колбі об'ємом 4 л).

## **5.2 Обґрунтування післяферментаційних стадій виділення та очищення цільового продукту - ферменту ЦГТ-ази**

### **5.2.1 Обґрунтування вибору технології отримання ферментного препарату ЦГТ-ази Г10Х**

Під час обґрунтування відповідного методу виділення та концентрування того чи іншого продукту м/б синтезу необхідно враховувати наступні фактори:

1. Фізичні та хімічні властивості культуральної рідини.
2. Властивості, котрі безпосередньо притаманні цільовому продукту (термолабільність чи термостабільність, стійкість до різних хімічних агентів, тощо).
3. Вимоги до кінцевої форми випуску продукту (ступінь чистоти або ж ступінь концентрування).

4. Технологічні та відповідні техніко-економічні показники (вихід продукту та продуктивність обладнання, необхідність подальшої обробки та ін.).

Всі методи виділення продуктів мікробіологічного синтезу з культуральної рідини поділяють на дві групи:

- Якщо цільовий продукт в розчині: іонний обмін, адсорбція, кристалізація, екстракція тощо.
- Якщо цільовий продукт у вигляді твердої фази: методи осадження, фільтрування, центрифугування, флотації, сепарування тощо.

Зазвичай, неможливо виділити цільовий продукт використовуючи при цьому лише один метод, тому застосовують комбінацію декількох і в процесі виділення - переводять продукт з розчинної форми в нерозчинну (або навпаки). Як правило, при виділенні розчинених речовин культуральну рідину, за потреби, необхідно піддавати попередній обробці і очищенню за допомогою таких методів як: фільтрування, центрифугування, сепарування, осадження або ж мембранних методів (електродіаліз або ультра – і мікрофільтрація) [47].

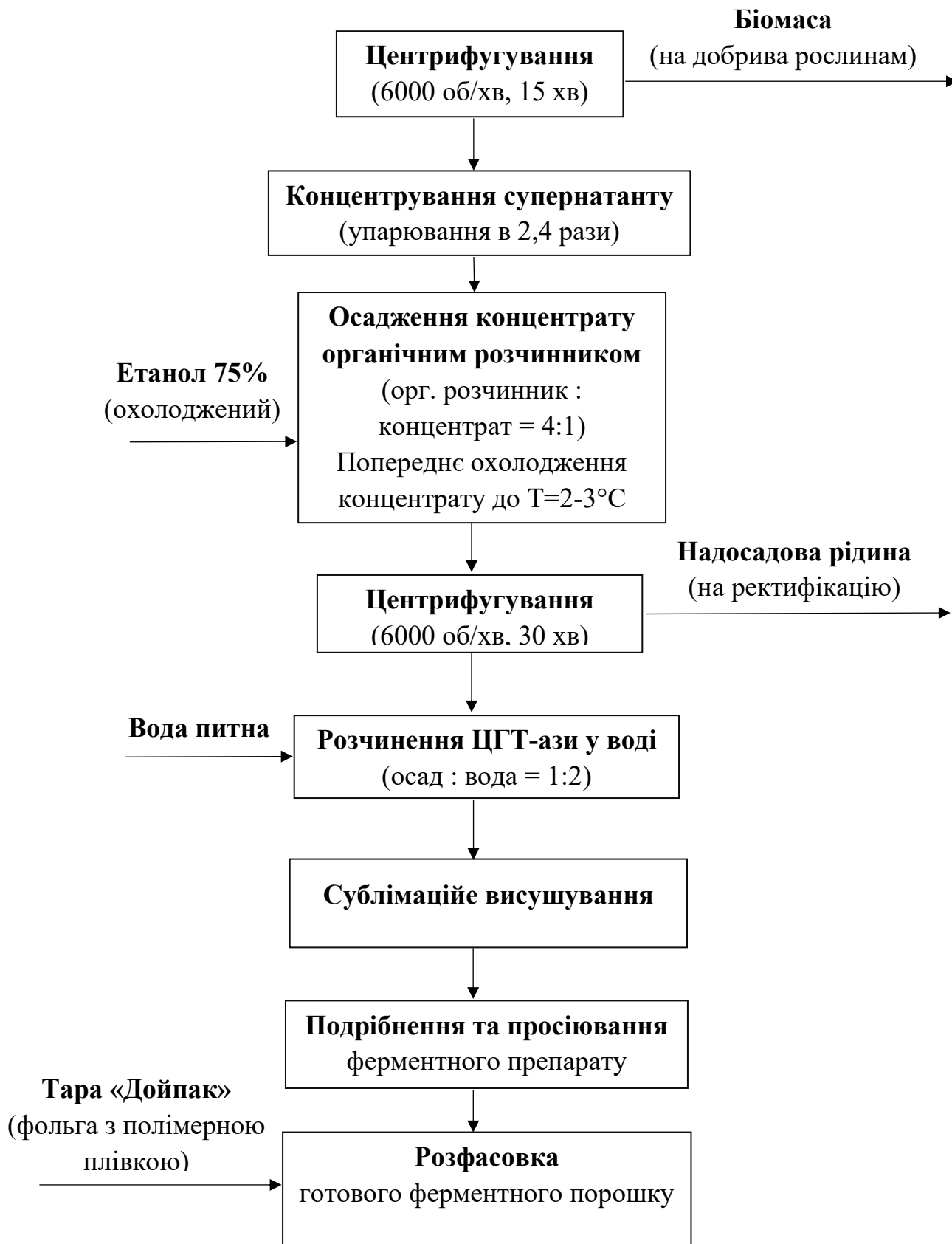
Фермент циклодекстрин-глюканотрансфераза (ЦГТ-аза) використовується у харчовій промисловості для реакції трансглікозилювання стевіозиду, тому ступінь очищення становитиме Г10Х і кінцева форма являтиме собою сухий, подрібнений ферментний порошок.

ЦГТ-аза – це екзометаболіт, який продукується в культуральну рідину, тому першим етапом буде відокремлення біомаси від культуральної рідини. Вибір методу виділення та подальшого очищення продукту ґрунтується саме на властивостях цільового продукту. Враховуючи те, що цей фермент термолабільний [12] (витримує лише  $T = 55-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), подальші стадії виділення і очищення, відповідно, обираємо без впливу температур на фермент, задля збереження його максимальної активності та структури білка.

Наступним етапом буде зменшення об'єму культуральної рідини методом концентрування. Є два основні способи, а саме: фільтрація (ультрафільтрація, зворотній осмос, тощо) та упарювання розчинів. Зважаючи на те, що перший

спосіб надто повільний, та малоефективний в даному випадку, то обираємо упарювання, як швидкий, ефективний та доволі легкий процес.

Так як упарений концентрат містить окрім цільового продукту ряд інших ферментів амілаз чи протеаз, то доцільно використати осадження ЦГТ-ази. В якості осаджувачів використовуються етанол, пропанол, ацетон, ізопропанол. Подальшим відділенням утвореного згустку від надосадової рідини здійснювали за допомогою центрифугуванням. Осаджений фермент перерозчиняли у невеликій кількості води з наступним його висушуванням, подрібненням та розфасовкою готового ферментного порошку в упаковку [5,4].



*Рис. 5.3* Схема отримання ферментного препарату ЦГТ-ази Г10Х

## 5.2.2 Методи відділення цільового продукту та обґрунтування вибору відповідного обладнання

Найрозповсюдженішими методами відділення біомаси продуцента від рідкої фази є:

- Фільтрування.
- Флотація.
- Центрифугування.
- Сепарування.

*Таблиця 5.5*

**Порівняльна характеристика способів відокремлення біомаси**

Спосіб	Переваги	Недоліки
Фільтрування	-простота проведення процесу	-утворення дрібнозернистих чи драглистих осадів, що володіють великим опором; -відносно невелика швидкість процесу 50 л/м <sup>2</sup> ; -значні витрати фільтрувального матеріалу [47]
Флотація	-простота і доступна вартість технологій; -легкість обслуговування	-призначений здебільшого для відокремлення дріжджів та мікроміцетів; -ступінь очищення культуральної рідини від клітин - невисокий [48]
Центрифугування	-висока інтенсивність та швидкість процесу; -можливість автоматизації; -відсутність необхідності попередньої обробки КР; -герметичність процесу; -відсутність витратних матеріалів	-складність конструкції та експлуатації [49]
Сепарування	-швидкість процесу (більше ніж 8 тис. об./хв)	-часто використовують для згущення суспензій; -використання здебільшого на молочних підприємствах [50]

Зважаючи на вищенаписане, можна сказати наступне, що на процес фільтрування впливає ряд мікрофакторів, так як частинки осаду, опір фільтрувальної перегородки, товщина подвійного електричного шару на поверхні частинок тощо) мають вирішальний вплив на процес фільтрування і ускладнюють його масштабування. А процес флотації недоцільно використовувати, так як він призначений для згущення більших і важчих клітин.

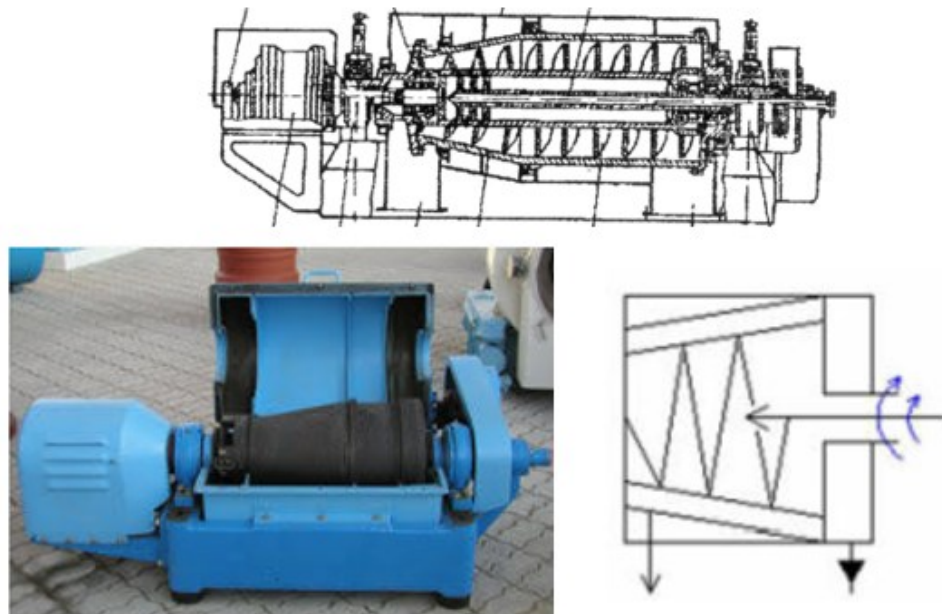
Сепарування має доцільність більше у молочній промисловості. Отже найдоцільнішим вважається центрифугування - розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. Зважаючи на те, що об'єм середовища є досить великий (432 л), тому даний метод є доцільним для використання (з економічної точки зору).

Отже, на основі оглянутої вище інформації, пропонується використовувати саме центрифугування, оскільки цей метод має перед іншими такі переваги [49]:

- відсутність у необхідності попередньої обробки КР перед процесом;
- можливість автоматизувати процес;
- розвинена поверхню осадження;
- високий фактор розділення;
- коли процес вимагає безперервності в умовах високої стерильності;
- високий ступінь розділення високодисперсних систем;
- висока продуктивність і компактність обладнання.

Відповідно до методів розділення центрифуги підрозділяють на: відстійні, фільтруючі та комбіновані центрифуги. При виборі центрифуг головними факторами є також безпосередньо їхні технічні характеристики й фізичні властивості оброблюваного матеріалу, а також фактор розділення. Найбільш досконалими по конструкції вважаються *центрифуги зі шнековим вивантаженням осаду*, потім - з поршньовим, потім - саморозвантажні, з ножовим та з ручним вивантаженням осаду. Осаджувальні центрифуги застосовують в тих випадках, коли необхідно отримати освітлену рідку фазу найбільшої чистоти [42].

Найдоцільніше використати центрифугу осаджувальну горизонтальну зі шнековим вивантаженням осаду типу ОГШ, котра застосовується для розділення суспензій з незначною концентрацією твердої фази (1-10%) розміром частинок більше 2-5 мкм. При цьому одержують чистий фугат та осад незначної вологості. Дана центрифуга оснащена вибухозахищеним електроустаткуванням [51].



*Рис. 5.4* Схематичне зображення, зовнішній вигляд і апаратурне позначення центрифуги ОГШ-202К-05

### 5.2.3 Обґрунтування вибору способу концентрування супернатанту та відповідної установки

Зважаючи на великий об'єм супернатанту (надосадова рідина) 431,7 л, перед подальшим етапом виділення цільового продукту, необхідно зменшити її об'єм шляхом концентрування. Для одержання мікробних концентратів культуральну рідину зневоднюють.

Наступним завданням є концентрація цільового продукту. Існують два основні способи концентрування речовин, а саме, це фільтрація (мікро-, ультрафільтрація, зворотній осмос тощо) та упарювання розчинів.

*Таблиця 5.6*

**Порівняльна таблиця способів концентрування цільового продукту**

Спосіб	Переваги	Недоліки
Ультрафільтрація	-простий; -легко піддається автоматизації	- потребує ретельної підготовки та очищення розчину; - виникнення концентраційної поляризації; - великі витрати фільтрувального матеріалу; - утворення великої кількості пермеатів.

Упарювання	-регенерація теплоносія і використання у виробництві; -простота технології; -ефективність; -розчини не потребують ретельної підготовки та очищення	-витрата теплоносія [51]
------------	---	--------------------------

Застосування фільтрації в даному випадку не є доцільним, через велику витрату фільтрувального матеріалу, низьку швидкість протікання процесу та відносно низьку ефективність. Натомість, процес випарювання є значно доцільнішим через свою простоту, швидкість, ефективність та легкість випарювання.

При згущенні суспензії мікробного синтезу необхідно враховувати високу термолабільність продукту. Даний фермент ЦГТ-аза проявляє свою стабільність при  $T=55-60^{\circ}\text{C}$ , проте максимальна температура концентрування ферментів повинна бути не більше  $35^{\circ}\text{C}$ . Тому, для концентрування продуктів мікробіологічного синтезу, необхідно підтримувати більш низьку температуру за більш короткий час. Звідси - високі вимоги до обладнання.

Існує три види випарювання:

- під надлишковим тиском;
- при атмосферному тиску;
- під вакуумом.

У мікробіологічній промисловості найбільш широко використовуються процеси випарювання на вакуумних установках (апаратах) як найбільш економічний спосіб відповідного попереднього концентрування продуктів біосинтезу. При використанні саме вакуумного способу знижується температура кипіння розчину, що дозволяє ефективно проводити видалення вологи з розчинів термолабільної природи. Температури кипіння нижче  $100^{\circ}\text{C}$  досягаються - шляхом створення відповідного вакууму у випарних апаратах. Процес випарювання проводять у випарних апаратах різноманітних конструкцій. Прикладом таких для концентрування цільового продукту можуть бути: роторно-плівковий випарний апарат та випарний апарат трубчастого типу.

Порівняльна характеристика випарних апаратів

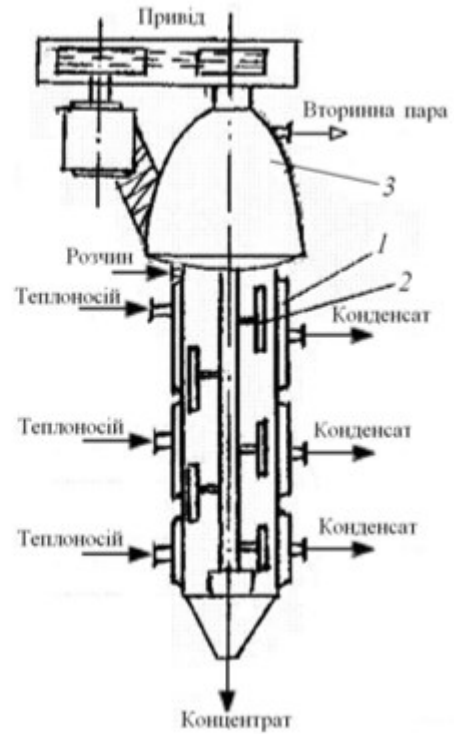
Апарат	Переваги	Недоліки
Роторно-плівковий випарний апарат	<ul style="list-style-type: none"> <li>-концентрування термолабільних розчинів (ферментів);</li> <li>-не відбувається пригорання;</li> <li>-збереження складу первинного продукту,</li> <li>-малий гідравлічний опір;</li> <li>-високий енергетичний потенціал вторинної пари;</li> <li>-високі коефіцієнти теплопередачі;</li> <li>-велика продуктивність при порівняно невеликих розмірах</li> <li>високий ступінь випарювання;</li> <li>-джерело тепла - водяна пара</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-нестабільність роботи при відхиленнях швидкості потоків висхідного розчину та грючої пари;</li> <li>-наявність обертання ротора [42]</li> </ul>
Випарний апарат трубчастого типу	<ul style="list-style-type: none"> <li>-циркуляція розчину проходить вільно;</li> <li>-розчин в камері для нагрівання не закипає;</li> <li>-тривалість на упарювання до 1 год.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-застосовують для середовищ, що не піняться;</li> <li>-утворення накипу на поверхні нагріву;</li> <li>-невисокі коефіцієнти тепло та масообміну через незначні швидкості циркуляції розчину [51]</li> </ul>

**Тонкоплівковий вакуум-випарний апарат** – використовується саме для згущення термолабільних розчинів, в біотехнологіях отримання кормових дріжджів, ферментів, антибіотиків, амінокислот, вітамінів.

Тепло, для випарювання, можна забезпечити різними теплоносіями. Для нагрівання розчинів, що випарюються до кипіння, можуть бути використані: топкові гази, електрообігрівання, але найбільше застосування знаходить водяна пара, і як безпосередньо характеризується високим коефіцієнтом тепловіддачі.

**Переваги:** незначний час контакту з температурою (1-2 с), високий коефіцієнт тепловіддачі (до 10 кВт/(м<sup>2</sup>\*К), мінімальні втрати біологічно активних речовин [51].

Планується упарити культуральну рідину у 2,4 рази. Отримаємо приблизно 175 л концентрату.



**Рис. 5.5 Зовнішній вигляд та схематичне зображення роторно-плівкового випарного апарата**

#### **5.2.4 Обґрунтування способу осадження ЦГТ-ази та його подальшого розчинення**

Переважає більшість, промислово важливих, ферментів є водорозчинними білками. Розчини ферментів неоднорідні і є складними свлерідними системами, що містять крім ферментів, велику кількість розчинних у воді сполук. Розчинність білка визначається розподілом гідрофобних і гідрофільних залишків на поверхні молекули.

Змінюючи деякі властивості білкових розчинів (температуру, іонну силу, рН, додавання нейтральних солей, водорозчинних органічних сполук або інших інертних речовин), можна вплинути на гідратний або сольватний шар і викликати агрегацію білкових молекул і випадіння їх в осад [52].

*Осадженням* називають процес, в якому додавання певних реагентів або зміна фізико-хімічних умов - викликає випадіння розчиненої речовини (частіше за весь білок) в осад. Даний процес широко застосовується у ферментній промисловості. Найчастіше для осадження ферментів використовують нейтральні солі (в цьому випадку процес має назву - *висолюванням*) або органічні розчинники, а також методи, засновані на зміні оптимальної температури або

діапазону рН розчину, також при додаванні високомолекулярних полімерів і інших [42].

Способи осадження ферментів:

- органічними розчинниками;
- висококонцентрованими розчинами солей (висолювання);
- органічними полімерами;
- вибірковою денатурацією.

Зважимо на те, що останній спосіб виділення прийнятний лише для термостабільних ферментів, які відповідно зберігають стійкість до екстремальних умов. Наприклад, для глюкоізомерази, яв здатна витримувати температуру до 90-95°C. Для проведення вибіркової денатурації - використовують три фактори: високу температуру, рН і дію органічних розчинників, які можна застосовувати окремо або комбінувати їх.

При використанні органічного полімера, на прикладі - ПЕГ (поліетиленгліколь), як осаджувача білків потрібна його низька концентрація. Сам реактив порівняно недорогий (57 грн/кг), проте його набагато важче видалити з ферментної фракції, ніж сіль або органічний розчинник.

Один із способів осадження ферментів - висолювання. Додавання солі до розчину білка - призводить до того, що при певній концентрації солі, розчинність білка стає нижчою за його концентрації у розчині, і відповідно білок починає випадати в осад. Різні білки по-різному реагують на процес висолювання. Найскладніша стадія даного процесу осадження - внесення солі і способу її розчинення. В осадках, отриманих при висолюванні, міститься від 25 до 80% солі (близької до концентрації насичення), тому препарати харчового або медичного призначення необхідно піддавати додатковому очищенню (наприклад, за допомогою електродіалізу, що є дуже тривалим і вартісним процесом).

При додаванні до розчину ферменту органічного розчинника (етанолу, метанолу, ізопропанолу, ацетону і ін.) знижується діелектрична постійна середовища, так як знижується активність води. При цьому, як при висолюванні, руйнується оболонка гідрату білка, а це означає, що він випадає в осад.

Концентрація розчинника, необхідна для осадження різних білків, природно, також різниться, що дозволяє проводити їх фракціонування. Однією із переваг фракціонування саме за допомогою органічних розчинників є те, що його можна проводити з-за температур нижче нуля, так як всі розчинники, що змішуються з водою, утворюють суміші, що замерзають за температури значно нижчої за 0°C. Це є дуже важлива властивість, так як в процесі фракціонування необхідно підтримувати низьку температуру.

При виборі розчинника треба враховувати його можливу токсичність, вибухонебезпечність і можливість його регенерації. Він повинен змішуватись з водою і не сполучатися з ферментом. Придатними є етанол, ізопропанол і рідше - ацетон [52].

Таблиця 5.8

**Порівняльна характеристика органічних осаджувачів**

Органічний розчинник	Ступінь шкідливості ГДК, мг/м <sup>3</sup>	Температура кипіння T <sub>кип.</sub> , °C	Співвідношення орг. роз. : концентрат 4 : 1	Ціна за 1 л розчинника, грн
Ацетон	0,35	56,2	мінімальний вихід	39
Етанол	5,0	78	максимальний вихід	45
Ізопропанол	0,6	80	середній вихід	42

**Примітка:** інформація наведена згідно джерела [5,53]; ціни наведені згідно prout.ua

Аналізуючи таблицю, можна сказати, що ціна порівнюваних розчинників майже однакова, але врахуємо те, що ціна вказана за 96% етанол, а нам необхідний 75% для осадження ферментів, який ми отримаємо провівши відповідні розрахунки, тому відповідно він буде дешевший для проведення даної стадії виділення цільового продукту.

*Розрахунок кількості 96% етилового спирту*

За законом концентрацій  $C_1V_1 = C_2V_2$ , де С-концентрація розчину, V - об'єм розчину, отримаємо:

$$75 \cdot 700 = 96 \cdot X$$

$$X = (75 \cdot 700) / 96$$

$$X = 547 \text{ л - потрібно 96\% етилового спирту}$$

Кількість води, яку необхідно додати до 700 л, щоб з 96% етанолу отримати 75%:

$$700 - 547 = 153 \text{ л}$$

Також врахуємо і те, що ацетон та ізопропанол мають більший ступінь шкідливості та різкіший запах, що негативно впливає на здоров'я людини, ніж етанол. Варто також зазначити, що за ступенем токсичності ізопропанол є небезпечніший серед порівнюваних нами органічних осаджувачів [53].

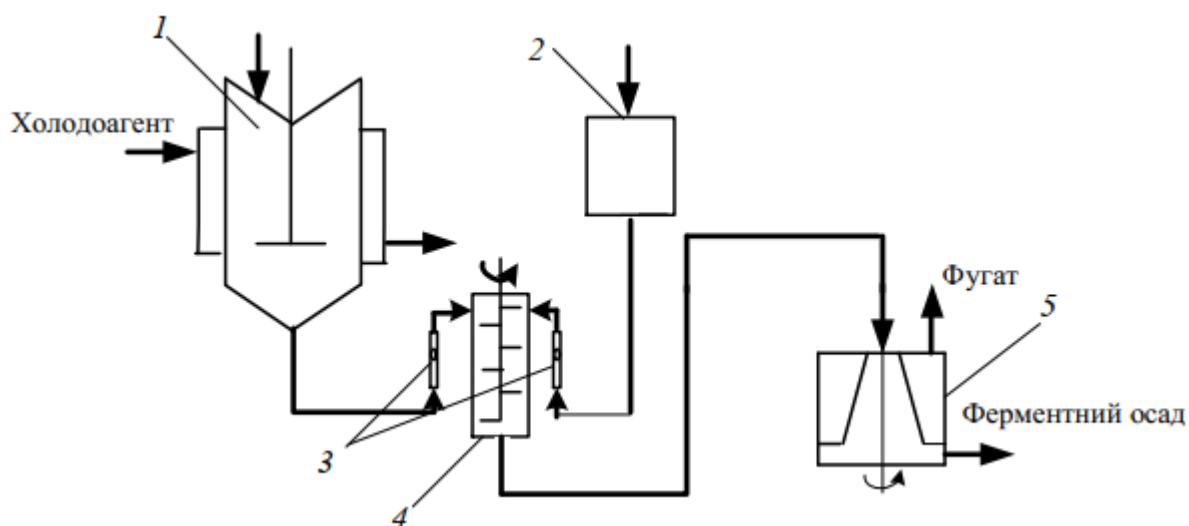
На процес осадження ферментів, саме органічними розчинниками, істотно впливає температура. В більшості випадків цей процес проводять при температурі від 0 до 5°C. Для цього водний розчин ферменту охолоджують (за допомогою подачі в рубашку апарата заохолодженого розсолу NaCl) до 2-3°C, а розчинник – до -1-2°C з урахуванням того, що при змішуванні води із спиртом суміш нагрівається. Підвищення температури приводить до денатурації багатьох ферментів, оскільки їх термолабільність при додаванні органічних розчинників сильно зростає. Даний метод осадження ферментів має недолік, який полягає в тому, що вживані реагенти відносно дорогі, вогнебезпечні і вельми отруйні, тому потрібне виконання відповідних заходів безпеки. Не дивлячись на це, осадження органічними розчинниками досить широко застосовується у ферментній промисловості [42,53].

В якості осаджувачів використовують етанол, ізопропанол і ацетон у співвідношеннях осаджувач (розчинник) : концентрат = 2:1, 3:1, 3,5:1, 4:1. Осадження проводять при 5°C. Під час підбору оптимальних умов даного експерименту найкращого ефекту досягли використовуючи 75% етанол як розчинник при співвідношенні 4:1. Тобто, якщо ми отримали 175 л концентрату, то нам потрібно в 4 рази більше розчинника, а саме 700 л. Попередньо перед осадженням отриманий раніше нами концентрат, за допомогою плівкової вакуум-випарної установки, необхідно охолодити до 2-3°C. Зваживши все вищенаписане найкращим способом осадження ферментів буде за використання органічних розчинників, а саме етанолу, так як він безпечніший за ізопропанол

та ацетон і при його використанні досягається найвищий вихід ферменту та його активності.

Осад, що сформувався в процесі осадження відокремлюють на центрифугу. Для повернення білку в розчинену форму його перерозчиняють у невеликій кількості води у приблизному співвідношенні осад : вода = 1:2, тобто, якщо ми отримуємо 21 г осаду білку, то води додаємо приблизно 50 мл [5].

Також варто зазначити, що відцентрифугована надосадова рідина, яка містить 50-75% розчинника, подається на регенерацію у ректифікаційне відділення. Після процесу регенерації розчинник знову надходить у виробництво на стадію осадження.



**Рис. 5.6 Апаратне зображення установки безперервного осадження ферментів: 1 - збірник концентрату; 2 - збірник охолодженого розчинника; 3,4 - ротаметри; 5- центрифуга**

Утворений осад безперервно відділяється на центрифугу. При такому способі осадження тривалість контакту білків і розчинника скорочується в десятки разів, а вихід в осад підвищується на 15-20% [4].

### **5.2.5 Обґрунтування виду сушіння та вибору сушарки для отримання порошку фермента ЦГТ-ази**

Наступним етапом виділення і очищення ЦГТ-ази є висушування перерозчиненого у воді фермента і отримання порошкоподібного продукту.

З метою збереження та подальшого отримання готового продукту - використовують процес сушіння, тобто видалення вологи з відповідно вологого матеріалу. Сушіння ферментного препарату має на меті - отримання стабільний при тривалому зберіганні продукт.

Сушіння саме термолабільних продуктів біосинтезу є, відносно, технологічно складним процесом. Для вибору методів та певних режимів сушіння матеріалу різної природи основним критерієм служить саме якість сухого продукту.

Вибір методу сушіння залежить в першу чергу від вологості, термостійкості, структури теплофізичних властивостей та хімічного складу середовища. Найбільш складним процесом є сушіння термолабільних об'єктів (бактеріальні препарати), активного білка (ферменти). Білок, відповідно, може денатурувати, а ферменти - інактивувати.

Вибір оптимального режиму сушіння залежить, в першу чергу, від трьох факторів: температури, тривалості та кінцевої вологості продукту.

Основним методом сушіння продуктів мікробіологічного синтезу є теплове: при атмосферному тиску, під вакуумом або під глибоким вакуумом при температурах в діапазоні від  $-30$  до  $+60^{\circ}\text{C}$ . Можливе також, сушіння в електромагнітному полі, але внаслідок значно високої вартості установок, для діелектричного нагрівання з метою зневоднювання продуктів мікробіологічного синтезу, майже не використовують [52].

Вологі ферментні препарати (ФП) направляють на сушіння (тоді отримують ферментні препарати з індексами Г10Х чи П10Х) або для одержання високоочищених ФП - з використанням мембранних, адсорбційних та інших методів.

*Існує цілий ряд методів сушіння речовин:* конвективне сушіння; контактне сушіння; терморадіаційне; сушіння при нагріванні струмами високих частот; акустичний метод сушіння; сублімаційне сушіння тощо.

Усі ці методи мають свої переваги та, відповідно - недоліки, орієнтовані на специфічні речовини, а також - технологічні процеси, однак, при виборі способу

сушіння необхідно керуватися, насамперед, властивостями цільового продукту (фізико-хімічними) та можливістю використання того чи іншого типу сушіння.

Для ферментних препаратів використовують, зазвичай, сушіння із використанням часто сублімаційних сушильних установок. Також можлива реалізація, і розпилювальних установок, і використання вакуум-сушильних шаф.

Інші сушильні установки чи шафи не вигідно використовувати через: високу температуру сушіння, що негативно впливає на якість кінцевого продукту (інактивує повністю).

Сушіння ферментних препаратів має за мету отримати стабільний при зберіганні продукт із культуральної рідини, її концентрату чи ж з вологої пастоподібної маси, отриманої при осадженні ферментів органічними розчинниками і солями [4].

Таблиця 5.9

**Порівняння способів сушіння ферменту ЦГТ-ази**

<b>Спосіб сушіння</b>	<b>Переваги</b>	<b>Недоліки</b>
Розпилювальне	-простота; -швидкість сушіння	-втрата активності ферментів 7-10%; -низька вологість сушильного агента та необхідність його попередньої підготовки
Вакуум-сушильне	-автоматизований процес сушки; -можливість рекуперації тепла	-довготривалий процес сушіння (12-16 год.); -велика втрата активності ферментів - 10-12%; -часто необхідно додатково висушування препарату, що призводить до ще більших втрат.
Сублімаційне	- отримання стабільного сухого препарату; -завдяки низьким температурам процесу (30-35°C) не руйнується білок та відсутня небезпека м/б зараження; - для термолабільних речовин; - практично не відбувається втрата активності ферменту та його інактивації	-тривалість процесу (8-10 год); -вартість обладнання (51 тис. грн.), що у два рази дорожче ніж розпилювальне (21 тис. грн.) та у 1,7 раз дорожче ніж вакуум-сушильне (30 тис. грн.) [51]

Не зважаючи, на деякі певні переваги вакуум-сушильних шаф, все ж втрати активності достатньо великі і часто висушений препарат потребує додаткового досушування, що в свою чергу призводить, відповідно, до збільшення втрат. Так як використання парово-конвеєрних, розпилювальних та інших сушильних установок мають певні суттєві недоліки, тому у технології отримання ферментного препарату доцільно використовувати **сублімаційне сушіння**.

Останнім часом спостерігається така тенденція, щоб випускати стабільні рідкі ФП у вигляді упарених концентратів або ж використовувати для сушіння сублімаційні сушарки. В останньому ж - процес ведуть при значно глибокому вакуумі. Матеріал на початкових стадіях поступово віддає частину вологи, далі охолоджується і самозаморожується. Залишковий тиск, відповідно, становить 13-133 Па, температура ж препарату, що висушується спочатку становить в інтервалі мінус 20 - мінус 30°C. Коли вологість знижується до мінімуму, тоді температуру піднімають до +30 - + 40°C.

Процес висушування ферментних осадів в сублімаційних сушарках складається з наступних трьох стадій:

1. Заморожування осаду.
2. Возгонка льоду.
3. Видалення залишкової вологи.

В перший період процесу видаляється 12-18% загальної кількості вологи, в другий вже основна частина - 50-65%, і за останній вилучають решту вологи до рівноважної, яка відповідно має становити - 6-8%. В цих сушарках ферменти практично не інактивуються.

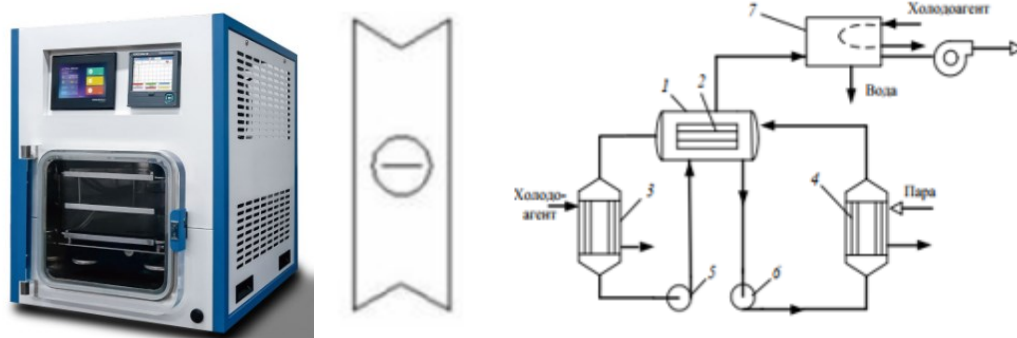


Рис. 5.7 Зовнішній вигляд, апаратурне позначення та схематичний принцип дії сублімаційної сушки

Сублімаційні сушки бувають камерного, або ж колекторного типів. Різниця, між ними, полягає в тому, що в першій - камерній отримують нерозфасований продукт, а в колекторній - сублімаційне сушіння продукту відбувається вже безпосередньо у тарі (флаконах чи ампулах).

Оскільки кінцевою метою є отримання сухого ферментного препарату, який далі буде йти на стадії подрібнення і фасування, то обираємо камерну сублімаційну сушарку.

Таким чином, сублімаційний спосіб більш надійний, так як зберігає структурну цілісність та, відповідно, активність ферментного препарату і при цьому може довгий час зберігати продукт при помірному охолодженні [42].

### **5.2.6 Подрібнення та просіювання ферментного препарату**

Сухі продукти мікробіологічного синтезу, зазвичай, використовують у здрібненому стані. Іноді, при розпилювальному і деяких інших видах сушіння, готовий продукт не потребує додаткового здрібнювання. В інших випадках, коли готовий продукт попередньо повинен розпорошуватися, при цьому ж, швидко розчинятися або змішуватися до гомогенного стану, запроваджують операцію здрібнювання.

У технології мікробіологічного синтезу, звичайно, застосовується не дроблення, а помел, при якому ступінь здрібненості становить в діапазоні від 50 до 100 мкм. У промислових умовах подрібнення здійснюється: роздавлюванням, розколюванням, розтиранням та ударом, або комбінацією цих способів. Щоб здійснити подрібнення, необхідно подолати сили взаємного зчеплення часток матеріалу.

Для середнього, тонкого, надтонкого (колоїдного) помелу матеріалів та продуктів мікробного синтезу використовують млини штифтові, барабанні шарові, кільцеві, вібраційні, струминні та колоїдні [31].

В даний час процес подрібнення здійснюється, переважно дробильно-подрібнюючими устаткуванням, яке ж є недостатньо ефективним, внаслідок значного зношування робочих органів (у молоткових, роторних дробарках), низької питомої продуктивності (у кулькових і струменевих млинах), порівняно

високих енерговитрат на привід та інших факторів. Прогресивним типом подрібнювачів є **вібраційні млини**, так як, вони мають високу продуктивність, значно малі енерговитрати і широкі технологічні можливості. Установки що виконують дроблення в умовах вібраційного технологічного поля, здебільшого, застосовують для самоподрібнення крупно кускових матеріалів, дрібного дроблення та помелу. Процес вібраційного дроблення здійснюється за рахунок удару і стирання оброблюваного матеріалу при взаємодії його частинок між собою та з поверхнею робочого тіла [54].

Вібромлини з горизонтальним розташуванням робочих ємностей ефективні при невеликому виході продукції, в них раціонально використовується весь об'єм робочих камер, також здійснюється в повній мірі ударне навантаження на оброблювану продукцію, що забезпечує високу енергоємність процесу подрібнення, та невисоку зношуваність робочих тіл.

Рівномірний розподіл оброблюваної продукції по всій площі поперечного перерізу помольної камери, що сприяє задіяння всіх робочих тіл в процесі помелу [55].



*Рис. 5.8* Схематичне зображення та зовнішній вигляд вібраційного млина

### **5.2.7. Розфасовка готового ферментного порошку**

Так як цільовий фермент ЦГТ-аза застосовується у харчовій промисловості для трансглікозилювання вуглеводів і зі ступенем очистки Г10Х, то необхідно провести наступний технологічний етап - розфасовка у тару. Так як готовий висушений і подрібнений сухий ферментний порошок становить 18 г, тоді доцільно буде використовувати Крафт-пакет «Дой-Пак» з металізацією. Це

економічна, функціональна та просто зручна у використанні упаковка для різних сипучих продуктів. Для збільшення терміну придатності вмісту внутрішній шар пакета має вологозахисне поліетиленове покриття, яке служить бар'єром між навколишнім середовищем і продуктом. Пакети Дой-Пак оснащені денцем, що дозволяє упаковці в наповненому вигляді стояти вертикально. Зовнішній шар пакета виконаний із крафт-паперу, а внутрішній шар - поліетилен з металізацією, який забезпечує герметичність продукту та можливість запаювання пакета, наприклад, за допомогою імпульсного зварювача плівок.

**Основними перевагами** використання такої упаковки є те, що вона не схильна до ризиків бою тари, вона зручна у виробництві, складуванні і транспортуванні, її можна виготовляти з матеріалів, що не пропускає сонячні промені, вологу і запахи [56].



**Рис. 5.9 Крафт-пакет «Дой-Пак» з металізацією**

Врахуємо те, що на 1 г стевіозиду припадає 8 ОД активності ферменту, тобто 0,1216 мг сухого порошку (так як 3750 од - 57 мг ферменту), тоді, якщо за партію ми отримаємо 18 г сухого ферментного порошку, то виходить:

1 г стевіозиду – 0,1216 мг ферменту (8 ОД акт.)

X г стевіозиду – 18 000 мг ферменту

$$X = (1 \cdot 18\,000) / 0,1216 = 148\,000 \text{ г} = 148 \text{ кг стевіозиду}$$

Тобто 18 г ферменту можна умовно розфасувати в 4 крафтові пакети (дой-пак) по 4,5 г сухого ферментного порошку в кожному. Тоді одна пачка буде розрахована на:

148 кг стевіозиду – 18 г ферменту

У кг стевіозиду – 4,5 г ферменту

$$У = (148 \cdot 4,5) / 18 = 37 \text{ кг стевіозиду.}$$

Таким чином кожен виробник стевіозиду зможе придбати необхідну кількість сухого ферментного порошку. На самій упаковці буде вказана кількість його вмісту, відповідна активність ферменту та співвідношення кількості ферменту на 1 г стевіозиду.

## РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ

Згідно з ТЕО потреба у ферменті циклодекстрин-глюканотрансферази (ЦГТ-ази) становить 0,20672 кг, а концентрація цільового продукту у культуральній рідині складає:  $P_{кр} = 0,057$  г/л. Таку кількість ферменту одержують за  $T_{рд} = 40$  днів. Найвищий рівень синтезу можна досягти, за умов культивування культури *Paenibacillus ehimensis* IB-739 упродовж 72 год. Вміст сухих речовин становить 91%.

Відомо, що приблизна активність ЦГТ-ази, яка утворюється при культивуванні *P.ehimensis* IB-739, становить 3,75 од/мл на середовищі наступного складу, г/л:  $C_1$ : крохмаль – 10;  $C_2$ : пептон – 4;  $C_3$ : дріжджовий екстракт – 5;  $C_4$ :  $KH_2PO_4$  – 1;  $C_5$ :  $CaCO_3$  – 1. Всього:  $C_{\Sigma} = 21$  г/л. Посівний матеріал вирощують на поживному середовищі ідентичного складу.

Виділення і очищення цільового продукту

Для подальших розрахунків прийmemo наступні дані:

- час роботи ферментера  $T_{ц} = 80$  год, що включає наступні операції: тривалість культивування - 72 год і підготовка ферментатора - 8 год (миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1,5 год), стерилізація (1,5 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год) та вивантаження культуральної рідини (1 год);
- сумарні втрати під час виділенні цільового продукту  $E_{св} = 0,3$  (30%): (центрифугування - 0,06; випарювання - 0,03; осадження і подальше центрифугування - 0,06; сублімаційне висушування - 0,1; стадія подрібнення - 0,03; розфасовка готового ферментного порошку - 0,02);
- коефіцієнт запасу  $K_1 = 1,1$ .

					НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарчук В.І.			РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						Д	85	169
Керівник		Скροцька О. І.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Пирог Т.П.						

## 6.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів)

1.1 Кількість продукту за добу:

$$G_{\text{нтд}} = G_{\text{нт}} / T_{\text{рд}} = 0,20672 / 40 = 0,00517 \text{ кг/добу або } 5,2 \text{ г/добу}$$

1.2 Кількість виділеного і очищеного продукту за цикл:

$$G_{\text{цк}} = (G_{\text{нтд}} \cdot T_{\text{ц}}) / 24 = (0,00517 \cdot 80) / 24 = 0,01723 \text{ кг/цикл або } 17,23 \text{ г/цикл}$$

1.3 Кількість готового препарату за цикл з урахуванням втрат при його виділенні

$E_{\text{св}} = 0,3$  (частка):

$$G_{\text{цк}} = (G_{\text{нтд}} \cdot T_{\text{ц}}) / 24 / (1 - E_{\text{св}}) = (0,00517 \cdot 80) / 24 / (1 - 0,3) = 0,02462 \text{ кг або } 24,62 \text{ г}$$

1.4 Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$V_{\text{кр}} = (K_1 \cdot G_{\text{цк}} \cdot \text{CP}_{\text{гп}}) / ((P_{\text{кр}} \cdot (1 - E_{\text{св}}))) = (1,1 \cdot 0,01723 \cdot 0,91) / (0,057 \cdot (1 - 0,3)) = 0,432 \text{ м}^3 = 432 \text{ л}$$

1.5 Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} / G_{\text{цк}} = 0,20672 / 0,01723 = 12 \text{ циклів}$$

1.6 Кількість ферменту у кг з 1 м<sup>3</sup> КР:

$$P_{\text{кр}} = G_{\text{цк}} / V_{\text{кр}} = 0,01723 / 0,432 = 0,0399 = 0,04 \text{ кг}$$

## 6.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

Кількість ПС та посівного матеріалу у ферментері до культивування становить:

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{432}{1 - 0,1} = 480 \text{ л}$$

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

Кількість поживного середовища в ферментері складатиме:

$$V_{\text{псф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{1 + X_{\text{вф}}} = \frac{480}{1 + 0,1} = 436,4 = 436 \text{ л}$$

де  $X_{\text{вф}}$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{псф}} = 480 - 436 = 44 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення самого ферментера  $K_{зф} = 0,5$ , його приблизний геометричний об'єм ферментера становитиме

$$V_{гф} = \frac{V_{ф}}{K_{зф}} = \frac{480}{0,5} = 960 \text{ л}$$

Оскільки кількість посівного матеріалу становить  $X_{ф} = X_i = X_{колб} = 0,1 \%$  від кількості ПС визначаємо кількість ПМ для інших стадій. Приблизна кількість ПМ для інших стадій становитиме:

ПМ для ферментера з посівного апарата:

$$V_{пмф} = 44 \text{ л}$$

ПМ для посівного апарата з інокулятора:

$$V_{па} = V_{пмф} \cdot X_{па} = 44 \cdot 0,1 = 4,4 \text{ л}$$

ПМ для інокулятора з качалочних колб:

$$V_{пмі} = V_{па} \cdot X_{ін} = 4,4 \cdot 0,1 = 0,44 \text{ л}$$

Отже маємо 3 ступеневу стадію отримання посівного матеріалу.

### **6.2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища та води для виробничого біосинтезу**

Об'єм ПС для виробничого біосинтезу у 1000 л ферментері = 480 л.

У відповідності з прийнятим складом ПС для того, щоб здійснити виробничий біосинтез загальні витрати компонентів на визначений об'єм ПС разом з посівним матеріалом  $V_{псф}$  складатимуть наступне:

$$G_{ф} = V_{псф} \times C_{\Sigma} = 480 \times 21 = 10,08 \text{ кг, в тому числі:}$$

$$\text{крохмаль} \quad G_1 = G_{ф} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 10,08 \times (10/21) = 4,8 \text{ кг}$$

$$\text{пептон} \quad G_2 = G_{ф} \times (C_2/C_{\Sigma}) = 10,08 \times (4/21) = 1,92 \text{ кг}$$

$$\text{дріжджовий екстракт} \quad G_3 = G_{ф} \times (C_3/C_{\Sigma}) = 10,08 \times (5/21) = 2,4 \text{ кг}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \quad G_4 = G_{ф} \times (C_4/C_{\Sigma}) = 10,08 \times (1/21) = 0,5 \text{ кг}$$

$$\text{CaCO}_3 \quad G_5 = G_{ф} \times (C_5/C_{\Sigma}) = 10,08 \times (1/21) = 0,5 \text{ кг}$$

Далі здійснюють розрахунок кількості води для приготування ПС для виробничого біосинтезу.

По-перше ми розраховуємо кількість води, яка йде на приготування та стерилізацію розчину крохмалю (*композиція А*) у автоклаві.

$$V_B = 28,8 - 4,8 = 24 \text{ л.}$$

Для спрощення розрахунків ми приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто  $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$ .

В подальшому розрахуємо кількість води яка необхідна для приготування у реакторах-змішувачах та подальшій стерилізації у автоклаві розчину пептону та дріжджового екстракту (*композиція Б*).

Об'єм поживного середовища яке йде на стерилізацію відповідно становить 10 л.

$$V_B = 14,3 - 4,3 = 10 \text{ л.}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

$$\text{пептон } V_{2B} = V_B (C_2/C_\Sigma) = 10 \times (4/21) = 1,9 \text{ л}$$

$$\text{дріжджовий екстракт } V_{3B} = V_B (C_3/C_\Sigma) = 10 \times (5/21) = 2,4 \text{ л}$$

Далі розраховуємо кількість води яка потрібна для приготування та стерилізації розчину солі (*композиція В*) у ферментері гострою парою а також з урахуванням утворення конденсату.

Об'єм ПС, яке необхідно простерилізувати становить 409 л, розраховуємо кількість конденсату, що утворюється:

$$V_{фк} = 391 \times 0,1 = 39 \text{ л}$$

Кількість води потрібної для розбавлення компоненту поживного середовища становить:  $V_{вф} = 391 - 0,5 - 39 = 351,5 \text{ л}$ .

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто  $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$ .

Наступне розрахуємо необхідну кількість води для приготування у колбах та подальшій стерилізації у автоклаві розчину  $\text{CaCO}_3$  (*композиція Г*). Об'єм поживного середовища, яке йде далі на стерилізацію становить 2 л.

$$V_B = 2 - 0,5 = 1,5 \text{ л.}$$

Для спрощення розрахунків ми приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто  $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$ .

Формування композиції:

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 436 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 480 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	10	4,8	А	28,8
Вода		24		
Пептон	4	1,9	Б	14,3
Дріжджовий екстракт	5	2,4		
Вода		10	В	391
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1	0,5		
Конденсат		39		
Вода		351,5	Г	2
СаСО <sub>3</sub>	1	0,5		
Вода		1,5		
<b>Разом:</b>		<b>436</b>		<b>436</b>

**Примітка:** Приготування композиції А та композиції Б здійснюється у реакторах-змішувачах та стерилізація в автоклаві. Композицію В розчинаємо у колбі, але стерилізуємо у ферментері, попередньо додавши необхідну кількість води та врахувавши конденсат. Композиція Г готується і стерилізується у колбі в автоклаві. Композиція А потребує попереднього заварення та подальшого перемішування до гомогенізації розчину.

### 6.2.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у посівному апараті (об'єм 100 л)

Об'єм готового ПС та посівного матеріалу у посівному апараті (100 л) з урахуванням наступних втрат, а саме: в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря = 10 %, при культивуванні:

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті відповідно становитимуть наступне:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пм}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{44}{1 - 0,1} = 49 \text{ л}$$

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

Кількість поживного середовища в посівному апараті складатиме:

$$V_{\text{псп}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{впа}}} = \frac{49}{1 + 0,1} = 44,5 \text{ л}$$

де  $X_{\text{впа}}$  – доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарату:

$$V_{\text{пмп}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пс}} = 49 - 44,5 = 4,5 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення посівного апарату  $K_{зпа} = 0,5$ , його приблизний геометричний об'єм ферментера становитиме

$$V_{гпа} = \frac{V_{па}}{K_{зпа}} = \frac{49}{0,5} = 98 \text{ л}$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища разом з посівним матеріалом  $V_{псп}$  складатимуть наступне:

$$G_{па} = V_{псп} \times C_{\Sigma} = 49 \times 21 = 1,03 \text{ кг в тому числі:}$$

$$\text{крохмаль} \quad G_1 = G_{па} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 1,03 \times (10/21) = 0,5 \text{ кг}$$

$$\text{пептон} \quad G_2 = G_{па} \times (C_2/C_{\Sigma}) = 1,03 \times (4/21) = 0,196 \text{ кг}$$

$$\text{дріжджовий екстракт} \quad G_3 = G_{па} \times (C_3/C_{\Sigma}) = 1,03 \times (5/21) = 0,245 \text{ кг}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \quad G_4 = G_{па} \times (C_4/C_{\Sigma}) = 1,03 \times (1/21) = 0,05 \text{ кг}$$

$$\text{CaCO}_3 \quad G_5 = G_{па} \times (C_5/C_{\Sigma}) = 1,03 \times (1/21) = 0,05 \text{ кг}$$

Далі здійснюють розрахунок кількості води для приготування ПС для культивування в посівному апараті.

Спочатку розраховуємо кількість води, яка йде на приготування та стерилізацію розчину крохмалю (*композиція А*) у автоклаві.

$$V_b = 2 - 0,5 = 1,5 \text{ л.}$$

Для спрощення розрахунків ми приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто  $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$ .

В подальшому розраховуємо кількість води яка необхідна для приготування у реакторах-змішувачах та подальшій стерилізації у автоклаві розчину пептону та дріжджового екстракту (*композиція Б*).

Об'єм поживного середовища яке йде на стерилізацію відповідно становить 1 л.

$$V_b = 1,445 - 0,445 = 1 \text{ л.}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

$$\text{пептон} \quad V_{2в} = V_b (C_2/C_{\Sigma}) = 1 \times (4/21) = 0,2 \text{ л}$$

$$\text{дріжджовий екстракт} \quad V_{3в} = V_b (C_3/C_{\Sigma}) = 1 \times (5/21) = 0,24 \text{ л}$$

Далі розраховуємо кількість води яка потрібна для приготування та

стерилізації розчину солі (*композиція В*) у ферментері гострою парою а також з урахуванням утворення конденсату.

Об'єм ПС, яке необхідно простерилізувати становить 41,8 л, розраховуємо кількість утвореного конденсату:

$$V_{\text{фк}} = 40,9 \times 0,1 = 4,1 \text{ л}$$

Кількість води потрібної для розбавлення компоненту поживного середовища становить:  $V_{\text{вф}} = 40,9 - 0,05 - 4,1 = 36,75 \text{ л}$ .

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1 кг.

Наступне розраховуємо необхідну кількість води для приготування у колбах та подальшій стерилізації у автоклаві розчину CaCO<sub>3</sub> (*композиція Г*). Об'єм поживного середовища, яке йде далі на стерилізацію становить 2 л.

$$V_{\text{в}} = 0,2 - 0,05 = 0,15 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків ми приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1 кг.

Формування композиції:

*Таблиця 6.2.*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 44,5 л поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 49 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	10	0,5	А	2
Вода		1,5		
Пептон	4	0,2	Б	1,445
Дріжджовий екстракт	5	0,245		
Вода		1		
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1	0,05	В	40,9
Конденсат		4,1		
Вода		36,75		
СаСО <sub>3</sub>	1	0,05	Г	0,2
Вода		0,15		
<b>Разом:</b>		<b>44,5</b>		<b>44,5</b>

**Примітка:** Приготування композиції А, Б та композиції Г здійснюється у лабораторному посуді та стерилізується в автоклаві. Композицію В розчинаємо у колбі, але стерилізуємо в посівному апараті, попередньо додавши необхідну кількість води та врахувавши конденсат. Композиція А потребує попереднього заварення та подальшого перемішування до гомогенізації розчину.

### 6.2.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі (об'ємом 10 л)

Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі (10 л) з урахуванням наступних втрат, а саме: в результаті краплинності через колектор відпрацьованого повітря = 10 %, при культивуванні:

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті відповідно становитимуть наступне:

$$V_{\text{ін}} = \frac{V_{\text{пм}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{4,5}{1 - 0,1} = 5 \text{ л}$$

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

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{псі}} = \frac{V_{\text{ін}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{5}{1 + 0,1} = 4,5 \text{ л}$$

де  $X_{\text{ін}}$  – доза посівного матеріалу для посівного апарату.

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву інокулятора:

$$V_{\text{пмі}} = V_{\text{ін}} - V_{\text{псі}} = 5 - 4,5 = 0,5 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення посівного апарату  $K_{\text{зпа}} = 0,5$ , його приблизний геометричний об'єм ферментера становитиме

$$V_{\text{гін}} = \frac{V_{\text{ін}}}{K_{\text{зін}}} = \frac{5}{0,5} = 10 \text{ л}$$

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища зазначимо, що загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища  $V_{\text{псі}}$  становитимуть наступне:

$G_{\text{ін}} = V_{\text{псі}} \times C_{\Sigma} = 5 \times 21 = 105 \text{ г}$ , в тому числі:

крохмаль  $G_1 = G_{\text{ін}} \times (C_1/C_{\Sigma}) = 105 \times (10/21) = 5 \text{ кг}$

пептон  $G_2 = G_{\text{ін}} \times (C_2/C_{\Sigma}) = 105 \times (4/21) = 2 \text{ кг}$

дріжджовий екстракт  $G_3 = G_{\text{ін}} \times (C_3/C_{\Sigma}) = 105 \times (5/21) = 2,5 \text{ кг}$

$\text{KH}_2\text{PO}_4$   $G_4 = G_{\text{ін}} \times (C_4/C_{\Sigma}) = 105 \times (1/21) = 5 \text{ г}$

$\text{CaCO}_3$   $G_5 = G_{\text{ін}} \times (C_5/C_{\Sigma}) = 105 \times (1/21) = 5 \text{ г}$

Розраховуємо кількість води необхідної для приготування поживного середовища для культивування в інокуляторі.

На початку розрахуємо кількість води, яка йде на приготування та стерилізацію розчину крохмалю (*композиція А*) у автоклаві.

$$V_{\text{в}} = 0,25 - 0,05 = 0,2 \text{ л.}$$

Для спрощення розрахунків ми приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто  $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$ .

В подальшому розрахуємо кількість води яка необхідна для приготування у реакторах-змішувачах та подальшій стерилізації у автоклаві розчину пептону та дріжджового екстракту (*композиція Б*).

Об'єм поживного середовища яке йде на стерилізацію відповідно становить  $0,1 \text{ л}$ .

$$V_{\text{в}} = 0,15 - 0,045 = 0,105 \text{ л.}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

$$\text{пептон } V_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2/C_{\Sigma}) = 0,105 \times (4/21) = 0,02 \text{ л}$$

$$\text{дріжджовий екстракт } V_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3/C_{\Sigma}) = 0,105 \times (5/21) = 0,025 \text{ л}$$

Далі розраховуємо кількість води яка потрібна для приготування в інокуляторі та стерилізації в автоклаві розчину солі (*композиція В*).

$$V_{\text{вф}} = 4,08 - 0,005 = 4,075 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто  $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$ .

Наступне розрахуємо необхідну кількість води для приготування у колбах та подальшій стерилізації у автоклаві розчину  $\text{CaCO}_3$  (*композиція Г*). Об'єм поживного середовища, яке йде далі на стерилізацію становить  $2 \text{ л}$ .

$$V_{\text{в}} = 0,02 - 0,005 = 0,015 \text{ л.}$$

Для спрощення розрахунків ми приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто  $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$ .

Формування композиції:

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4,5 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 5 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	10	0,05	А	0,25
Вода		0,2		
Пептон	4	0,02	Б	0,15
Дріжджовий екстракт	5	0,025		
Вода		0,105		
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1	0,005	В	4,08
Вода		4,075		
СаСО <sub>3</sub>	1	0,005	Г	0,02
Вода		0,015		
<b>Разом:</b>		<b>4,5</b>		<b>4,5</b>

**Примітка:** Приготування композиції А, Б та композиції Г здійснюється у лабораторному посуді та стерилізується в автоклаві. Композицію В розчинаємо у колбі, але стерилізуємо в інокуляторі в автоклаві, попередньо додавши необхідну кількість води. Композиція А потребує попереднього заварення та подальшого перемішування до гомогенізації розчину.

#### 6.2.4 Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для отримання культуральної рідини на качалочних колбах

Об'єм готового ПС та посівного матеріалу (0,5 л) в колбах на качалці з врахуванням втрат (1 %) складає:

$$V_k = V_{\text{пм}} / (1 - E_{\text{кол}}) = 0,5 / (1 - 0,01) = 0,51 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища для вирощування самого інокуляту в колбах на качалці становити:

$$V_{\text{пск}} = V_k / (1 + X_{\text{кол}}) = 0,51 / (1 + 0,1) = 0,46 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу відповідно становить:

$$V_{\text{пмк}} = V_k - V_{\text{пск}} = 0,51 - 0,46 = 0,05 = 50 \text{ мл.}$$

Об'єм поживного середовища для отримання культуральної рідини відповідно становить 0,46 л.

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища разом з посівним матеріалом  $V_{\text{пск}}$  складатимуть:

$$G_k = V_{\text{пск}} \times C_{\Sigma} = 0,51 \times 21 = 10,7 \text{ г, у тому числі:}$$

$$\text{крохмаль} \quad G_1 = G_k \times (C_1 / C_{\Sigma}) = 10,7 \times (10 / 21) = 5 \text{ г}$$

пептон	$G_2 = G_k \times (C_2/C_\Sigma) = 10,7 \times (4/21) = 2 \text{ г}$
дріжджовий екстракт	$G_3 = G_k \times (C_3/C_\Sigma) = 10,7 \times (5/21) = 2,5 \text{ г}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$G_4 = G_k \times (C_4/C_\Sigma) = 10,7 \times (1/21) = 0,5 \text{ г}$
$\text{CaCO}_3$	$G_5 = G_k \times (C_5/C_\Sigma) = 10,7 \times (1/21) = 0,5 \text{ г}$

Розраховуємо кількість необхідної води для подальшого приготування поживного середовища для культивування в колбах на качалках.

Стерилізація компонентів у композиціях буде проводитись в автоклаві, отже  $K_{\text{кон}} = 0$ . Для спрощення розрахунків ми приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто  $1 \text{ мл} = 1 \text{ г}$ .

Кількість води для композиції А:  $V_b = 25 - 5 = 20 \text{ мл}$

Кількість води для композиції Б:  $V_b = 25 - 4,5 = 20,5 \text{ мл}$ , далі розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

пептон  $V_{2b} = V_b (C_2/C_\Sigma) = 20,5 \times (4/21) = 3,9 \text{ мл}$

дріжджовий екстракт  $V_{3b} = V_b (C_3/C_\Sigma) = 20,5 \times (5/21) = 4,8 \text{ мл}$

Для композиції В:  $V_b = 390 - 0,5 = 389,5 \text{ мл}$

Для композиції Г:  $V_b = 20 - 0,5 = 19,5 \text{ мл}$

Формування композиції:

Таблиця 6.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 460 мл поживного середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 510 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Крохмаль	10	5	А	25
Вода		20		
Пептон	4	2	Б	25
Дріжджовий екстракт	5	2,5		
Вода		20,5		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	0,5	В	390
Вода		389,5		
$\text{CaCO}_3$	1	0,5	Г	20
Вода		19,5		
<b>Разом:</b>		<b>460</b>		<b>460</b>

**Примітка:** всі композиції готуються у лабораторних колбах та стерилізуються в автоклаві. Композиція А потребує попереднього заварення та подальшого перемішування до гомогенізації розчину.

### 6.3. Розрахунок напівпродуктів та баластних речовин в культуральній рідині після виробничого біосинтезу

Кількість абсолютно сухих речовин в поживному середовищі для виробничого біосинтезу  $G_{\text{загф}} = 10,8$  кг.

Кількість абсолютно сухих речовин в посівному матеріалі з урахуванням втрат під час вирощування в інокуляторі геометричним об'ємом 100 л  $E_{\text{ін}} = 0,1$  (частка)  $G_{\text{загп}} = 1,03$  кг.

$$G_{\text{загп}} = G_{\text{заг}} (1 - E_{\text{п}}) = 0,93 \text{ кг}$$

Загальна кількість абсолютно сухих речовин у середовищі для виробничого біосинтезу становить:

$$G_{\text{срф}} = G_{\text{загф}} + G_{\text{загп}} = 10,8 + 0,93 = 11,73 \text{ кг}$$

Кількість втрат абсолютно сухих речовин у культуральній рідині в процесі виробничого біосинтезу з врахуванням коефіцієнта втрат  $E_{\text{бс}} = 0,52$  (частка).

$$G_{\text{втб}} = G_{\text{срф}} \times E_{\text{бс}} = 11,73 \times 0,52 = 6 \text{ кг}$$

Кількість абсолютно сухих речовин в КР, що йде на подальшу переробку, становить:

$$G_{\text{сркр}} = G_{\text{срф}} - G_{\text{втб}} = 11,73 - 6 = 5,73 \text{ кг}$$

Кількість КР після виробничого біосинтезу, кг:

$G_{\text{кр}} = V_{\text{кр}} \times \rho_{\text{кр}} = 0,432 \times 1020 = 440$  кг, враховуючи, що  $\rho_{\text{кр}}$  – це середня густина культуральної рідини ( $\rho_{\text{кр}} = 1020 \dots 1050$  кг/м<sup>3</sup>).

Визначаємо кількість абсолютно сухої біомаси (АСБ) в КР:

$$G_{\text{асб}} = V_{\text{кр}} \times X_{\text{кр}} = 0,432 \times 1 = 0,432 \text{ кг або } 432 \text{ г}$$

Визначаємо кількість абсолютно сухого ферменту (АСФ) в КР:

$$G_{\text{асфз}} = V_{\text{кр}} \times P_{\text{кр}} = 0,432 \times 0,057 = 0,02462 \text{ кг або } 24,62 \text{ г}$$

Кількість абсолютно сухих баластних речовин в КР відповідно становить:

$$G_{\text{брв}} = G_{\text{сркр}} - G_{\text{асб}} - G_{\text{асф}} = 5,73 - 0,432 - 0,02462 = 5,27 \text{ кг}$$

Кількість води, що міститься в КР, складе наступне:

$$G_{\text{води}} = G_{\text{кр}} - G_{\text{асб}} - G_{\text{асф}} - G_{\text{брв}} = 440 - 0,432 - 0,02462 - 5,27 = 434,3 \text{ кг}$$

## 6.4 Стадія ТП. Виділення, очищення та фасування готової продукції

### 6.4.1 Відділення біомаси центрифугуванням

Об'єм суспензії культуральної рідини (КР), котра йде на подальшу переробку становить:

$$V_{\text{сус}} = V_{\text{кр}} = 0,432 \text{ м}^3 \text{ або } 432 \text{ л}$$

Відсотковий вміст абсолютно сухої біомаси (АСБ) в культуральній рідині складає:

$$CP_{\text{АСБ}} = G_{\text{загп}} / 10 = 0,93 / 10 = 0,093 \text{ мас. \%}$$

Приймаємо, що густина біомаси відповідно становить  $\rho_{\text{АСБ}} = 1200 \text{ кг/м}^3$ .  
Тоді, маса АСБ у культуральній рідині складатиме:

$$G_{\text{АСБ}} = V_{\text{сус}} \cdot \rho_{\text{АСБ}} \cdot CP_{\text{АСБ}} / 100 = 0,432 \cdot 1200 \cdot 0,093 / 100 = 0,48 \text{ кг}$$

Вологовміст клітинної маси становить від 65 до 85 %, приймаємо  $W_{\text{кліт.}} = 0,85$  (частка). Відсоток вологої біомаси в культуральній рідині становить:

$$CP_{\text{вб}} = CP_{\text{АСБ}} / (1 - W_{\text{кліт.}}) = 0,093 / (1 - 0,85) = 0,62 \text{ мас. \%}$$

Прийmemo те, що густина осаду становить  $\rho_{\text{ос}} = 1050 \text{ кг/м}^3$ . Маса вологого осаду в об'ємі культуральної рідини відповідно складатиме:

$$G_{\text{ос}} = V_{\text{сус}} \cdot CP_{\text{вб}} \cdot \rho_{\text{ос}} / 1000 = 0,432 \cdot 0,62 \cdot 1050 / 1000 = 0,281 \text{ кг}$$

Відомо, що осад культуральної рідини (КР) містить діапазон – 10..15 % міжклітинної вологи. Приймаємо  $W_{\text{мв}} = 0,15$  (частка).

Загальна кількість вологого осаду, який відділяють із КР становитиме:

$$G_{\text{осв}} = G_{\text{ос}} / (1 - W_{\text{мв}}) = 0,281 / (1 - 0,1) = 0,312 \text{ кг}$$

Маса вологого осаду, який отримують під час центрифугування 1 м<sup>3</sup> культуральної рідини складає:

$$m_0 = G_{\text{осв}} / V_{\text{сус}} = 0,312 / 0,432 = 0,72 \text{ кг/м}^3$$

Об'єм вологого осаду в суспензії становить:

$$V_{\text{осв}} = G_{\text{осв}} \cdot 1000 / \rho_{\text{ос}} = 0,312 \cdot 1000 / 1050 = 0,3 \text{ л}$$

Втрати вологого осаду при центрифугуванні складатиме:

$$V_{\text{втц}} = V_{\text{осв}} \cdot E_{\text{ц}} = 0,3 \cdot 0,06 = 0,018 \text{ л,}$$

де  $E_{\text{ц}} = 0,06$  – коефіцієнт втрат при центрифугуванні (частка)

Об'єм отриманого фугату, з урахуванням втрат при центрифугуванні, становить:

$$V_{\text{фгм}} = V_{\text{сус}} - V_{\text{осв}} - V_{\text{втц}} = 432 - 0,3 - 0,018 = 431,7 \text{ л}$$

Маса АСФ у фугаті з урахуванням втрат при центрифугуванні  $E_{\text{ц}} = 0,06$  (частка) складає:

$$G_{\text{фц}} = G_{\text{асфз}} \cdot (1 - E_{\text{ц}}) = 24,62 \cdot (1 - 0,06) = 23,14 \text{ г}$$

Вміст АСФ у фугаті становить:

$$CP_{\text{АСФ}} = G_{\text{фц}} \cdot 100 / V_{\text{сусп}} = 23,14 \cdot 100 / 431,7 = 5,36 \text{ мас. \%}$$

#### 6.4.2 Концентрування супернатанту методом упарювання

Приймаємо ступінь концентрування  $K_{\text{уп}} = 2,4$ . Тоді об'єм концентрату ферменту, з урахуванням коефіцієнта втрат при випарюванні  $E_{\text{уп}} = 0,03$  (частка), складатиме наступне:

$$V_{\text{уп}} = V_{\text{фгм}} \cdot (1 - E_{\text{уп}}) / K_{\text{уп}} = 431,7 \cdot (1 - 0,03) / 2,4 = 175 \text{ л}$$

Втрата об'єму концентрату під час процесу упарювання становить:

$$V_{\text{втуп}} = V_{\text{фгм}} \cdot E_{\text{уп}} = 431,7 \cdot 0,03 = 13 \text{ л}$$

Маса АСФ, відповідно, у концентраті з урахуванням втрат при упарюванні  $E_{\text{уп}} = 0,03$  (частка) складає:

$$G_{\text{уп}} = G_{\text{фц}} \cdot (1 - E_{\text{уп}}) = 23,14 \cdot (1 - 0,03) = 22,45 \text{ г}$$

Вміст АСФ у концентраті становить:

$$CP_{\text{уп}} = G_{\text{уп}} \cdot 100 / V_{\text{уп}} = 22,45 \cdot 100 / 175 = 12,8 \text{ мас. \%}$$

Об'єм пермеату після стадії концентрування становить:

$$V_{\text{пер}} = V_{\text{фгм}} - V_{\text{уп}} - V_{\text{втуп}} = 431,7 - 175 - 13 = 243,7 \text{ л}$$

#### 6.4.3 Осадження ферменту та відділення осаду центрифугуванням

Об'єм концентрату, котрий надходить на стадію осадження органічним розчинником і подальше центрифугування становить  $V_{\text{кон}} = 175$  л. Вміст ферменту у концентраті  $G_{\text{уп}} = 22,45$  г. Об'єм спирту етилового 75%-го для осадження  $V_{\text{ет}} = 700$  л (об'ємне співвідношення ферментного розчину до розчинника – 1:4).

Загальний об'єм реакційної суміші складає:

$$V_{\text{рс}} = V_{\text{сус}} = V_{\text{кон}} + V_{\text{ет}} = 175 + 700 = 875 \text{ л.}$$

Маса осаду після процесу осадження та подальшого центрифугування утвореної суспензії, з урахуванням втрат, ( $E_{oc} = 0,06$ ) становитиме:

$$G_{oc} = G_{уп} \cdot (1 - E_{ф}) = 22,45 \cdot (1 - 0,06) = 21 \text{ г або } 0,021 \text{ кг}$$

Втрати об'єму суспензії (водно-спиртової сумішші) при подальшому центрифугуванні складають ( $E_{ц} = 0,06$ ):

$$V_{втф} = V_{сус} \cdot E_{сф} = 875 \cdot 0,06 = 52,5 \text{ л}$$

Об'єм отриманого фільтрату (водно-спиртова суміш), яка надходить після центрифугування, на регенерацію, відповідно, становитиме з урахуванням втрат:

$$V_{фгц} = V_{сус} - V_{ос} - V_{втф} = 875 - 0,021 - 52,5 = 822,48 \text{ л}$$

#### 6.4.4 Сушіння осаду в сублімаційній сушарці

Так як необхідно білок перевести назад в розчинену форму (врахуємо те, що ЦГТ-аза, як і більшість ферментів водорозчинні), тоді до осаду необхідно додати невелику кількість води, у співвідношенні осад:вода = 1:2.

Якщо ми отримуємо 21 г осаду, то води, приблизно, додаємо 50 мл і в результаті ми отримаємо:  $V_{ос} = 51 \text{ мл}$ , враховуючи те, що густина води  $\rho_{води} = 1 \text{ г/мл}$  і, при цьому, осад змішається з водою в однорідну суспензію.

Маса вологого осаду, що йде на сушіння, при його густині  $\rho_{уп} = 1050 \text{ кг/м}^3$ :

$$G_{осв} = V_{ос} \cdot \rho_{уп} / 1000 = 0,051 \cdot 1050 / 1000 = 0,054 \text{ кг або } 54 \text{ г}$$

Маса висушеного препарату з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні  $E_{сш} = 0,1$  (частка) сухої речовини, що виходить з сушарки:

$$G_{сш} = G_{ос} \cdot (1 - E_{сш}) = 21 \cdot (1 - 0,1) = 18,9 \text{ г}$$

Маса води, що підлягає видаленню з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні:

$$E_{сш} = 0,1 \text{ (частка)}$$

$$W_{сш} = G_{осв} \cdot (1 - E_{сш}) - G_{сш} = 54 \cdot (1 - 0,1) - 18,9 = 29,7 \text{ г}$$

#### 6.4.5 Подрібнення ферментного препарату

Маса препарату з урахуванням коефіцієнта втрат  $E_{под} = 0,03$  (частка):

$$G_{под} = G_{сш} \cdot (1 - E_{под}) = 18,9 \cdot (1 - 0,03) = 18,3 \text{ г}$$

Механічні втрати порошку під час подрібнення становлять:

$$G_{втп} = (G_{сш} - G_{под}) = 18,9 - 18,33 = 0,57 \text{ г}$$

#### 6.4.6 Розрахунок активності ферменту по стадіях виділення

1. Активність ферменту в культуральній рідині:

$$A_{кр} = 3,75 \text{ од/мл}$$

2. Активність ферменту у фільтраті з урахуванням коефіцієнта втрат при центрифугуванні  $E_{ц} = 0,06$  (частка):

$$A_{ц} = A_{кр} - (A_{кр} \cdot E_{ц}) = 3,75 - (3,75 \cdot 0,06) = 3,525 \text{ од/мл}$$

3. Активність ферменту у концентраті з урахуванням коефіцієнта втрат при випарюванні  $E_{уп} = 0,03$  (частка):

$$A_{уп} = A_{ц} \cdot K_{уп} - (A_{ц} \cdot E_{уп} \cdot K_{уп}) = 3,525 \cdot 2,4 - (3,525 \cdot 0,03 \cdot 2,4) = 8,2 \text{ од/мл}$$

4. Активність ферменту в осаді при осадженні та центрифугуванні концентрату, з урахуванням коефіцієнта втрат при цих процесах  $E_{ос} = 0,06$  (частка):

$$A_{ос} = A_{уп} - (A_{уп} \cdot E_{ос}) = 8,2 - (8,2 \cdot 0,06) = 7,7 \text{ од/мл}$$

5. Активність ферменту з урахуванням коефіцієнта втрат при сушці  $E_{сш} = 0,1$  (частка):

$$A_{сш} = A_{ос} - (A_{ос} \cdot E_{сш}) \cdot (\rho_{гп} / \rho_{кон}) = 7,7 - (7,7 \cdot 0,1) \cdot (1200 / 1100) = 6,86 \text{ од/г}$$

де густина висушеного ферменту,  $\text{кг/м}^3$  (1100...1300), приймаємо  $\rho_{гп} = 1200 \text{ кг/м}^3$ .

6. Активність висушеного препарату з урахуванням коефіцієнта втрат при подрібненні  $E_{под} = 0,03$  (частка):

$$A_{под} = A_{сш} - (A_{сш} \cdot E_{под}) = 6,86 - (6,86 \cdot 0,03) = 6,65 \text{ од/г}$$

7. Активність подрібненого препарату, з урахуванням коефіцієнта втрат при пакуванні і фасуванні готового продукту  $E_{пак} = 0,02$  (частка):

$$A_{пак} = A_{под} - (A_{под} \cdot E_{пак}) = 6,65 - (6,65 \cdot 0,02) = 6,5 \text{ од/г}$$

Після стадій сушіння та подрібнення цільового продукту - ми отримуємо готовий висушений і подрібнений ферментний порошок ЦГТ-ази для застосування у харчовій промисловості, який не потребує додавання наповнювача. В подальшому даний ферментний порошок може бути використаний як біокатализатор при ферментативному трансглікозилюванні

вуглеводів, зокрема севіозиду, з метою покращення його смакових та фізичних властивостей.

#### **6.4.7 Розрахунок стадій ПМВ: пакування, маркування, відвантаження**

Ферментний препарат (порошкоподібний) розфасовують у крафтові пакети «дой пак» з металізацією по 4,5 г ( $N_{\text{п}}$ ) і подальшим запаюванням пакета імпульсивним запайщиком, а потім фасують у гофровані коробки. Коефіцієнт втрат при фасуванні  $E_{\text{уп}} = 0,02$  (частка).

Кількість ферментного порошку для фасування, з урахуванням втрат, складає:

$$G_{\text{уп}} = (G_{\text{под}} + G_{\text{нап}}) \cdot (1 - E_{\text{уп}}) = (18,3 + 0) \cdot (1 - 0,02) = 18 \text{ г}$$

Кількість пакетів при фасуванні за один цикл складає:

$$N_{\text{пк}} = G_{\text{уп}} / N_{\text{п}} = 18 / 4,5 = 4 \text{ крафт-пакети}$$

Механічні втрати порошку при фасуванні становлять:

$$G_{\text{втф}} = (G_{\text{под}} + G_{\text{нап}}) - G_{\text{уп}} = (18,3 + 0) - 18 = 0,3 \text{ г}$$

Похибка продуктового розрахунку становить:

$$\Delta = (G_{\text{уп}} - G_{\text{цк}}) \cdot 100 / G_{\text{уп}} = (18 - 17,23) \cdot 100 / 17,23 = + 4,47 \%$$

Отримане значення знаходиться в межах менше заданого діапазону точності  $\pm 10 \%$ . Отже, можна зробити висновок про те, що продуктивний розрахунок зроблено вірно.

**6.5 Розрахунок матеріального балансу на один виробничий цикл  
одержання готового ферментного порошку ЦГТ-ази**

Таблиця 6.5

**МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ОДИН ВИРОБНИЧИЙ ЦИКЛ**

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм <sup>3</sup>	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм <sup>3</sup>
1	2	3	4	5
1.	<b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл, г)</b>			
1.1.	Крохмаль	5	Нестерильне ПС	460
1.2.	Пептон	2		
1.3.	Дріжджовий екстракт	2,5		
1.4.	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	0,5		
1.5.	СаСО <sub>3</sub>	0,5		
1.6.	Вода	449,5		
	Всього:	460		460
2.	<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (л)</b>			
2.1.	Нестерильне ПС	0,46	Стерильне ПС	0,46
	Всього:	<b>0,46</b>	Всього:	<b>0,46</b>
3.	<b>ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (л)</b>			
3.1.	Стерильне ПС	0,46	Посівний матеріал	0,5049
3.2.	Посівний матеріал з колби	0,05		
3.3.	Втрати (частка)	0,01		0,0051
	Всього:	<b>0,51</b>	Всього:	<b>0,51</b>
4	<b>ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 10 л</b>			
4.1	Крохмаль	0,05	Нестерильне ПС	4,5
4.2	Пептон	0,02		
4.3	Дріжджовий екстракт	0,025		
4.4	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	0,005		
4.5	СаСО <sub>3</sub>	0,005		
4.6	Вода	4,4		
	Всього:	<b>4,5</b>	Всього:	<b>4,5</b>
5	<b>СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 10 л</b>			
5.1.	Нестерильне ПС	4,5	Стерильне ПС	4,5
5.2.	Конденсат		(втрат немає)	
	Всього	<b>4,5</b>	Всього:	<b>4,5</b>

6	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ ОБ'ЄМОМ 10 л			
6.1	Стерильне ПС	4,5	Посівний матеріал	4,5
6.2	Посівний матеріал з колб на качалках	0,5		
6.3	Втрати (частка)	0,1		0,5
	Всього	<b>5</b>	Всього:	<b>5</b>
7	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТА ОБ'ЄМОМ 100 л			
7.1	Крохмаль	0,5	Нестерильне ПС	40,4
7.2	Пептон	0,2		
7.3	Дріжджовий екстракт	0,245		
7.4	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	0,05		
7.5	СаСО <sub>3</sub>	0,05		
7.6	Вода	39,36		
	Всього:	<b>40,4</b>	Всього:	<b>40,4</b>
8	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТА ОБ'ЄМОМ 100 л			
8.1	Нестерильне ПС	40,4	Стерильне ПС	44,5
8.2	Розбавлення конденсатом 10%	4,1		
	Всього	<b>44,5</b>	Всього:	<b>44,5</b>
9	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ У ПОСІВНОМУ АПАРАТІ ОБ'ЄМОМ 100 л			
9.1	Стерильне поживне середовище	44,5	Посівний матеріал	44
9.2	Посівний матеріал з інокулятора	4,5		
9.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	5
	Всього:	<b>49</b>	Всього:	<b>49</b>
10	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА ОБ'ЄМОМ 1000 л			
10.1	Крохмаль	4,8	Нестерильне ПС	397
10.2	Пептон	1,9		
10.3	Дріжджовий екстракт	2,4		
10.4	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	0,5		
10.5	СаСО <sub>3</sub>	0,5		
10.6	Вода	386,9		
	Всього:	<b>397</b>	Всього:	<b>397</b>

11	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА ОБ'ЄМОМ 1000 л			
11.1	Нестерильне ПС	397	Стерильне ПС	436
11.2	Розбавлення конденсатом 10%	39		
	Всього	<b>436</b>	Всього:	<b>436</b>
12	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ У ФЕРМЕНТЕРІ 1000 л			
12.1	Стерильне поживне середовище	436	Культуральна рідина	432
12.2	Посівний матеріал з посівного апарата	44		
12.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	48
	Всього:	<b>480</b>	Всього	<b>480</b>
13	ЦЕНТРИФУГУВАННЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ			
13.1	КР на центрифугування, л	432	Вологий осад	0,3
13.2			Фугат	431,7
13.3	Втрати (частка)	0,06	Втрати	0,018
	Всього:	<b>432</b>	Всього:	<b>432</b>
14	КОНЦЕНТРУВАННЯ СУПЕРНАТАНТУ МЕТОДОМ УПАРЮВАННЯ			
14.1	Супернатант	431,7	Концентрат	175
14.2			Пермеат	243,7
14.3	Втрати (частка)	0,03	Втрати	13
	Всього:	<b>431,7</b>	Всього:	<b>431,7</b>
15	ОСАДЖЕННЯ ФЕРМЕНТУ ТА ВІДДІЛЕННЯ ОСАДУ ЦЕНТРИФУГУВАННЯМ			
15.1	Водно-спиртова суміш (концентрат + розчинник) л	875	Вологий осад (в нерозчинній формі), кг	0,021
15.2			Фільтрат	822,48
15.3	Втрати (частка)	0,06	Втрати	52,5
	Всього:	<b>875</b>	Всього:	<b>875</b>
16	СУШІННЯ ОСАДУ В СУБЛІМАЦІЙНІЙ СУШАРЦІ			
16.1	Вологий осад (переведений в розчинену форму водою), г	54	Сухий фермент, г	18,9
16.2			Видалена волога	29,7
16.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати, г	5,4
	Всього:	<b>54</b>	Всього:	<b>54</b>
17	ПОДРІБНЕННЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ			
17.1	Сухий ферментний порошок, г	18,9	Подрібнений ферментний порошок, г	18,3
17.2	Втрати (частка)	0,03	Втрати, г	0,57
	Всього:	<b>18,9</b>	Всього:	<b>18,9</b>

ФАСУВАННЯ, УПАКУВАННЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ				
18.1	Готовий подрібнений ферментний порошок, г	18,3	Упакований продукт, г	18
18.2	Крафт-пакети (4,4 г)			4
18.3	Втрати (частка)	0,02	Втрати, г	0,3
	Всього:	<b>18,3</b>	Всього:	<b>18,3</b>

$$\Delta = (G_{\text{уп}} - G_{\text{цк}}) \cdot 100 / G_{\text{уп}} = (18 - 17,23) \cdot 100 / 17,23 = + 4,47 \%$$

### 6.6 Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання

Приблизний геометричний об'єм ферментера, який ми використовуємо для проведення виробничого культивування, при  $K_{\text{зап}} = 0,5$  становить:

Уточнений розрахунок проводиться на основі продуктового розрахунку та матеріального балансу з метою уточнення коефіцієнтів заповнення ємнісного обладнання.

#### Розрахунок кількості ферментеру для виробничого біосинтезу

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{зап}} = 480 / 0,5 = 960 \text{ л}$$

Зважаючи на стандартні об'єми ємнісного обладнання ми обираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер:

$$V_{\text{нф}} = 1 \text{ м}^3$$

Кількість виробничих ферментерів при даному  $K_{\text{зап}}$  складає, од:

$$N_{\text{фр}} = V_{\text{гф}} / V_{\text{нф}} = 0,960 / 1 = 0,96 - \text{приймаємо } 1$$

Далі уточнюємо коефіцієнт заповнення самого ферментера:

$$K_{\text{зап}} = V_{\text{ф}} / (V_{\text{нф}} \times N_{\text{фр}}) = 480 / (1000 \times 1) = 0,48$$

Так, як коефіцієнт заповнення знаходиться у заданих межах (0,45-0,65), то приймаємо до установки  $N_{\text{фр}} + 1$  запасний.

#### Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів

Приблизний геометричний об'єм посівного апарата при заданому  $K_{\text{зап}} = 0,5$  відповідно становитиме:

$$V_{\text{гпа}} = V_{\text{па}} / K_{\text{зап}} = 49 / 0,5 = 98 \text{ л.}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом посівного апарата:

$$V_{\text{нпа}} = 100 \text{ л}$$

Кількість посівних апаратів при даному  $K_{\text{зап}}$  становить, од:

$$N_{\text{па}} = V_{\text{гпа}}/V_{\text{ппа}} = 98/100 = 0,98 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення посівного апарата:

$$K_{\text{зпа}} = V_{\text{па}}/(V_{\text{ппа}} \times N_{\text{па}}) = 49/(100 \times 1) = 0,49$$

Так, як коефіцієнт заповнення знаходиться у заданих межах (0,45-0,65), то приймаємо до установки  $N_{\text{па}} + 1$  запасний.

#### Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів

Приблизний геометричний об'єм інокулятора при заданому  $K_{\text{зап}} = 0,5$  відповідно становитиме:

$$V_{\text{гін}} = V_{\text{ін}}/K_{\text{з}} = 5/0,5 = 10 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом інокулятор:

$$V_{\text{нін}} = 10 \text{ л}$$

Кількість інокуляторів при даному  $K_{\text{з}}$  становить, од:

$$N_{\text{ін}} = V_{\text{гін}}/V_{\text{нін}} = 10/10 = 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення інокулятора:

$$K_{\text{зін}} = V_{\text{ін}}/(V_{\text{нін}} \times N_{\text{ін}}) = 5/(10 \times 1) = 0,5$$

Так, як коефіцієнт заповнення знаходиться у заданих межах (0,45-0,65), то приймаємо до установки  $N_{\text{ін}} + 1$  запасний.

#### Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

Для здійснення засіву інокулятора об'ємом 10 л, посівний матеріал, а саме: 0,51 л отримують вирощуючи продуцент у колбах на качалці. Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому  $K_{\text{колб}} = 0,2$ :

$$V_{\text{гколб}} = V_{\text{колб}}/K_{\text{колб}} = 0,51/0,2 = 2,25 \text{ л.}$$

Об'єм 1 качалочної колби  $V_{\text{нколб}} = 0,750 \text{ л.}$

Знаходимо кількість качалочних колб при заданому  $K_{\text{колб}} = 0,2$ :

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{гколб}}/V_{\text{нколб}} = 2,25/0,75 = 3,4 = 4 \text{ качалочні колби.}$$

#### Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1000 л

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції А при  $K_{\text{з}} = 0,8$  становить:

$$V_{\text{АГ}} = V_{\text{А}}/K_3 = 28,8/0,8 = 36 \text{ л.}$$

Реактор-змішувач виготовляють на замовлення на  $V_{\text{нр}} = 36$  л.

Кількість реакторів-змішувачів при даному  $K_3$  становить, од:

$$N_{\text{р}} = V_{\text{АГ}}/V_{\text{нр}} = 36/36 = 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора-змішувача:

$$K_3 = V_{\text{А}}/(V_{\text{нр}} \times N_{\text{р}}) = 28,8/(36 \times 1) = 0,8.$$

Коефіцієнт заповнення знаходиться у заданих межах (0,7-0,8).

Отже, прийmemo до установки кількість реакторів змішувачів для композиції А -1 реактор-змішувач + 1 запасний.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції В при  $K_3 = 0,75$  (враховуючи можливе піноутворення при перемішуванні) становить:

$$V_{\text{АГ}} = V_{\text{Б}}/K_3 = 14,3/0,75 = 19 \text{ л.}$$

Реактор-змішувач виготовляють на замовлення на  $V_{\text{нр}} = 20$  л.

Кількість реакторів-змішувачів при даному  $K_3$  становить, од:

$$N_{\text{р}} = V_{\text{АГ}}/V_{\text{нр}} = 19/20 = 0,95 = 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора-змішувача:

$$K_3 = V_{\text{Б}}/(V_{\text{нр}} \times N_{\text{р}}) = 14,3/(20 \times 1) = 0,71.$$

Коефіцієнт заповнення знаходиться у заданих межах (0,7-0,8).

Отже, прийmemo до установки кількість реакторів змішувачів для композиції В -1 реактор-змішувач + 1 запасний.

Композицію В розчинаємо у колбі, але стерилізуємо у ферментері, попередньо додавши необхідну кількість води та врахувавши конденсат.

Композиція Г готуються в лабораторному посуді та стерилізуються в автоклаві, а тому розрахунок ємнісної апаратури для них не проводиться.

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів та збірників для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 100 л

Композицію В розчинаємо у колбі, але стерилізуємо в посівному апараті, попередньо додавши необхідну кількість води та врахувавши конденсат.

Композиції А, Б, Г готуються в лабораторному посуді та стерилізуються в автоклаві, а тому розрахунок ємнісної апаратури для них не проводиться.

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів та збірників для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Композиції А, Б, Г готуємо в лабораторному посуді і стерилізуємо у автоклаві. Композицію В розчинаємо у колбі, але стерилізуємо в інокуляторі в автоклаві, попередньо додавши необхідну кількість води.

Отже розрахунок ємнісної апаратури для них не проводиться.

**6.7 Уточнюючий розрахунок обладнання для стадій виділення і очищення цільового продукту**

Розрахунок збірника для культуральної рідини після процесу біосинтезу

Обираємо геометричний об'єм збірника для культуральної рідини (КР) після процесу біосинтезу. Враховуючи коефіцієнт збірника  $K_{зб} = 0,72$ , тоді приблизний геометричний об'єм апарата буде:

$$V_{збг} = V_{кр}/K_{зб} = 0,432/0,72 = 0,6 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник:  $V_{збг} = 600 \text{ л}$

Оскільки номінальний та приблизний об'єм збірника співпадають уточнення коефіцієнта заповнення обладнання - не проводимо.

Підбираємо геометричний об'єм вакуум-випарної установки (тонкоплівковий випарник)

Приблизний геометричний об'єм ВВУ при заданому  $K_{вву} = 0,5$ :

$$V_{вву} = V_{сн}/K_{вву} = 431,7/0,5 = 865 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за об'ємом апарат:  $V_{гек} = 900 \text{ л}$ .

Кількість установок при заданому  $K_{вву}$  становитиме:

$$N_p = V_{вву}/V_{г} = 865/900 = 0,96. \text{ Приймаємо } - 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення апарата:

$$K_{зр} = V_{сн}/(V_{г} \times N_p) = 431,7/(900 \times 1) = 0,48$$

Розрахунок осаджувального реактора для процесу осадження цільового продукту органічним розчинником

Коефіцієнт заповнення реактора має лежати в межах від 0,7 до 0,8, тоді обираємо  $K_{po} = 0,7$ . Отже приблизний геометричний об'єм реактора становитиме:

$$V_{po} = V_{сyc}/K_{po} = 875/0,7 = 1,25 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник:  $V_{збг} = 1250 \text{ л}$

Оскільки номінальний та приблизний об'єми реактора для осадження співпадають уточнення коефіцієнта заповнення обладнання - не робимо.

Розрахунок збірника для спирту етилового

Враховуємо коефіцієнт збірника  $K_{зб} = 0,8$  і приблизний геометричний об'єм апарата становитиме:

$$V_{збг} = V_{ет}/K_{зб} = 700/0,8 = 0,875 \text{ м}^3 \text{ або } 875 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник:  $V_{збг} = 900 \text{ л}$

Кількість збірників при заданому  $K_{зб}$  становитиме:

$$N_{зб} = V_{згн}/V_{ггг} = 875/900 = 0,97. \text{ Приймаємо } - 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення збірника:

$$K_{ет} = V_{ггг}/(V_{ггг} \times N_p) = 700/(900 \times 1) = 0,78$$

Розрахунок сублимаційної сушильної установки

Прийемо час сушіння  $\tau_{суш} = 10$  год Маса вологого осаду, що йде на сушіння, при його густині  $\rho_{уп} = 1050 \text{ кг/м}^3$ :

$$G_{осв} = V_{ос} \cdot \rho_{уп} / 1000 = 0,051 \cdot 1050 / 1000 = 0,054 \text{ кг або } 54 \text{ г}$$

Маса висушеного препарату з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні  $E_{сш} = 0,1$  (частка) сухої речовини, що виходить з сушарки:

$$G_{сш} = G_{ос} \cdot (1 - E_{сш}) = 21 \cdot (1 - 0,1) = 18,9 \text{ г}$$

Маса води, що підлягає видаленню з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні  $E_{сш} = 0,1$  (частка):

$$W_{сш} = G_{осв} \cdot (1 - E_{сш}) - G_{сш} = 54 \cdot (1 - 0,1) - 18,9 = 29,7 \text{ г}$$

$$W = W_{сш} / \tau_{суш} = 29,7/10 = 2,97 \text{ г/год або } 0,00297 \text{ кг/год}$$

Прийемо температуру на вході, за рахунок створення вакууму  $t_{1в} = - 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; на виході  $t_{2в} = 35 \text{ }^\circ\text{C}$ ; температуру висушеного матеріалу, яка не повинна

перевищувати  $t_{1M} = 30^{\circ}\text{C}$ . Визначимо середню питому продуктивність сушарки за вологою, що випаровується:

$$G_{\text{сер}} = 0,05 \cdot [(t_{1B} + t_{2B})/2 - t_M] = 0,05 \cdot [(-20 + 35)/2 - 30] = 1,125 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{год})$$

Орієнтовно об'єм камери сублімаційної сушарки  $V_{\text{суш}}$  отримаємо:

$$V_{\text{суш}} = W / G_{\text{сер}} = 0,00297 / 1,125 = 0,00264 \text{ м}^3 \text{ або } 2,64 \text{ л}$$

## РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яка зображена на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

### Специфікація обладнання виробництва ферменту ЦГТ-ази

*Raenibacillus ehimensis* IB-739

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
СМ-1	СІР-мийка	1	СІР-мийка виготовляється на замовлення. Складається з двох резервуарів об'ємами по 3000 л: реактор-змішувач для миючого розчину, ємність для відпрацьованого мийного розчину (з корозійностійкої нержавіючої сталі, яке виконує завдання підготовки, нагріву і циркуляції миючих розчинів всередині технологічного обладнання і трубопроводів, без необхідності їх розбору, з метою автоматизованого видалення забруднень). Оснащена дозатором та двома насосами для СІР мийки, витримуючи температуру близько 180 °С, які виготовлені з нержавіючої сталі, що дає нам можливість витримати агресивні миючі засоби, котрі зустрічаються в процесах очищення. СІР. Насоси мають електро-полірування, щоб забезпечити відсутність приклеювання залишків до внутрішньої поверхні фільтру для відпрацьованого робочого розчину. Нагрів здійснюється через подачу глухої пари в сорочку. Матеріал труб та резервуарів - нержавіюча сталь марки SUS316L. Виробник «BIORUS», Китай <sup>1</sup> .
ПЗ-2	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник АІИ 020.000-01 Фірма: ООО «НПЦ Вектор-Кондвент» Повітрязабірник, котрий обладнаний металеву сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф-3	Фільтр попередній (грубої очистки)	1	Тип ФЯР – комірчасті, загальна запиленість якого не більше 5 мг/м <sup>3</sup> Фільтруючий матеріал – поліестер, швидкість фільтрування – 2 м/с. Ефективність 45 – 80 %. Виробник: «General filter» (Італія) <sup>2</sup> .
К-4	Компресор	1	Продуктивність – 400-480 л/хв. Максимальний тиск – 12 бар. Виробник: ООО "Далгакиран Компрессор Украина" <sup>3</sup> .

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>		
<b>Змн.</b>	<b>Лист</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>			
Розроб.		Бондарчук В.І.			<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Консульт.					Д	111	169
Керівник		Скороцька О. І.			<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.							
Зав. каф.		Пирог Т.П.					
					<b>РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>		

T-5	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Systemair PGK. Робочий тиск 1,6 МПа. Виробник: «Systemair» (Швеція) <sup>4</sup> .
P-6	Ресивер	1	Ресивер Р 900.800.01, робочий тиск становить 10 атм, температура нагріву до +100 °С. Виробник: «Пневмо-комплект», (Україна) <sup>5</sup> .
T-7	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при максимальній температурі води 100 °С. Виробник: «Systemair» (Швеція) <sup>4</sup> .
Ф-8	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр моделі F9. Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно, з алюмінієвими розділювачами, Е = 95%. Швидкість фільтрування – 0,025 м/с Виробник: «General filter» (Італія) <sup>2</sup> .
M-9,10,11	Мірник для піногасника	3	Мірники об'ємом 1 л, 2 л і 6 л виготовляються на замовлення. Матеріал термостійке скло для фарм виробництв у металевій обрешітці. Виробник: ТОВ «ENERGY SAVING SOLUTIONS» (Україна) <sup>6</sup> .
P3-12,14	Реактор-змішувач	2	Реактори-змішувачі об'ємом 20 л (діаметр 0,3 м, висота 0,45 м) і 36 л (діаметр 0,35 м, висота 0,55 м), оснащені перемішувальним пристроєм (40-440 об/хв), сорочкою та пробовідбірниками; сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>7</sup> .
D-13,15,35	Об'ємно-ваговий дозатор	3	Ваговий дискретний дозатор-витратомір для сипучих продуктів компанії «Техноваги» призначений для дозування сипучих продуктів згідно з їхньою масою. Продуктивність становить 5 тонн на годину. Точність зважування — 0,1%. Виробник: «Техноваги» (Україна) <sup>8</sup> .
Ф-17,18,20, 21,23,24	Фільтр індивідуальної очистки	6	Фільтр (P)-BE. Фільтруючий матеріал – боросилікат, Е = 99,999%. Виробник: «General filter» (Італія) <sup>2</sup> .
Фр-16	Ферментер	1	Класичний лабораторний ферментер фірми Bioengineering, об'ємом 10 л, що стерилізується в автоклаві. Діаметр 0,25 м, висота 0,35 м. Виготовлений з термостійкого скла для фарм виробництв у металевій обрешітці. Обладнаний сорочкою для подачі глухої пари, лопатевою, швидкість перемішування: 180 об/хв. Країна виробник: Швейцарія <sup>9</sup> .
Фр-19	Ферментер	1	Пілотний ферментер типу-р фірми Bioengineering, об'ємом 100 л Діаметр 0,5 м, висота 0,7 м. Виготовлений з н/ж сталі марки 316 L. Оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою: 180 об/хв. Країна виробник: Швейцарія <sup>9</sup> .
Фр-22	Ферментер	1	Ферментер пілотний типу-р фірми Bioengineering, об'ємом 1000 л. Діаметр 1 м, висота 1,35 м Виготовлений з н/ж сталі марки 316 L. Оснащений сорочкою та лопатевою мішалкою, швидкість перемішування: 180 об/хв. Країна виробник: Швейцарія <sup>9</sup> .

Н-25	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний Rotho MS0 фірми «Ватерпасс». Продуктивність - від 80 до 5000 л / год. Тиск - до 15 бар. Діаметр шланга - 34 мм. Країна виробник - Україна <sup>10</sup> .
З-26 З-30	Збірник розчину	2	Збірники об'ємом по 600 л з мішалкою (180 об/хв) Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Діаметр 0,6 м, висота 0,81 м. Оснащені сорочкою. Один оснащений пробовідбірником. Виробник: ТОВ «ENERGY SAVING SOLUTIONS» Країна виробник - Україна <sup>6</sup> .
Н-27 Н-29 Н-31	Насос відцентровий	3	Насос відцентровий JPC фірми «Ватерпасс». Продуктивність - 2 м <sup>3</sup> /год. Тиск - до 7 бар. Діаметр з'єднань - 50 мм. В'язкість - до 1000 кПа. Температура - до + 150 °С. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Країна виробник - Україна <sup>10</sup> .
Ц-28 Ц-39	Центрифуга зі шнековим вивантаженням осаду	2	Центрифуга осаджувальна горизонтальна зі шнековим вивантаженням осаду типу ОГШ-202К-05 фірми «Terma machine» із вибухозахищеним електроустаткуванням. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Максимальна частота частотам обертання 6000 об/хв. Фактор розділення: 4000. Довжина - 1,5 м, ширина - 0,86 м, висота - 0,6 м. Продуктивність по суспензії становить 5 м <sup>3</sup> /год. Країна виробник - Україна <sup>11</sup> .
ВВУ-32	Роторно-плівковий вакуум випарний апарат	1	Вертикальний роторно-плівковий вакуум випарний апарат РПВ-100-3 фірми «Сіріус». Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Має 3 модулі. Продуктивність-750 л/год по випаруваній волозі. Насичена пара з тиском Р=0,1-1,0 МПа (або електричний обігрів). Кількість обертів ротора: 80-200 об/хв. Потужність установки: 0,35-0,75 кВт. Висока теплонапряжність (до 300*105 Вт/м <sup>2</sup> ). Робочий об'єм – 1000 л. Країна виробник - Україна <sup>12</sup> .
Н-33	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий JPC фірми «Ватерпасс». Продуктивність - 1 м <sup>3</sup> /год. Тиск - до 7 бар. Діаметр з'єднань - 50 мм. В'язкість - до 1000 кПа. Температура - до + 150 °С. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Країна виробник - Україна <sup>10</sup> .
Ро-34	Реактор осаджувальний	1	Вертикальний реактор-осаджувач фірми «ЮВС». З плоскою кришкою, еліптичним дном, сорочкою, теплоізоляцією, захисним кожухом, із вибухозахисним виконанням Геометричний об'єм - 1,25 м <sup>3</sup> , висота - 1,7 м; діаметр - 1м. Робочий тиск - атмосферний, до 6 атм. Мішалка трьохрівнева 3 лопатева з потоком вверх. Кількість обертів - 150 об/хв. Наявна миюча головка від СІР мийки. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Країна виробник - Україна <sup>13</sup> .

З-36	Збірник для етанолу	1	Збірник об'ємом 900 л з мішалкою (100 об/хв). Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Діаметр 0,8 м, висота 1 м. Оснащений сорочкою та вибухозахисним кожухом. Виробник: ТОВ «ENERGY SAVING SOLUTIONS» Країна виробник - Україна <sup>6</sup> .
Н-37 Н-38	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий JPC фірми «Ватерпасс». Продуктивність - 3 м <sup>3</sup> /год. Тиск - до 7 бар. Діаметр з'єднань - 50 мм. В'язкість - до 1000 кПа. Температура - до + 150 °С. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Країна виробник - Україна <sup>10</sup> .
СС-40	Сублимаційна сушарка	1	Міні пілотна ліофільна сушарка LP03 призначена для фарм та харчової промисловості фірми «Biotechno group». Матеріал камери ліофільної сушки: нержавіюча сталь SUS304. Температурний інтервал полиць в ліофільній сушарці від -45 °С до + 75 °С. Точність регулювання температури: ± 1°С. Продуктивність конденсора 3 л/добу. Країна виробник - Росія <sup>14</sup> .
ВМ-41	Вібраційний млин	1	Вібраційний млин Retsch CryoMill фірми «Химтест». Швидкість до 30 Гц. Принцип подрібнення (криогенне): удар, тертя. Кінцева тонкість - 5 мкм. Час подрібнення - 10-12 хв. Максимальна маса завантаження (корисна) - 20 г. Матеріал розмольної гарнітури: нержавіюча сталь AISI 316L або загартована сталь. Споживча потужність - 100-240 В. Країна виробник - Україна <sup>15</sup> .
ПС-42	Пакувальний стіл готової продукції	1	Стіл виготовлений з харчової нержавіючої сталі, марки AISI 304 фірми «Konsort» Як правило, використовується на підприємствах заготовки, переробки, сортування харчової продукції. Габарити і додаткові деталі (імпульсний запайщик) під замовлення. Габаритні розміри: довжина - 1,2 м, ширина - 0,7 м, висота - 1,1 м. Країна виробник - Україна <sup>16</sup> .

**Примітка:** пошук та підбір обладнання проводився з використанням наступних електронних джерел:

- <http://bio-rus.ru/oborudovanie/mobilnyie-sip-mojki-i-sip-stanczii/mobilnaya-sip-mojka-biorus-1501.html> («BIORUS», СІР-мийка);
- <https://www.generalfilter.com/en/products/> («General filter», фільтри для повітря);
- <https://dalgakiran.ua/store/product/Odnostupenchatyie> (ООО «Далгакиран компресор Україна», компресор);
- <https://www.systemair.com/ru/CIS/> («Systemair»);
- <http://pnevmo-c.com.ua> («Пневмо-комплект»);
- <https://naftochim.com.ua/p6383545-merniki-etalonnye.html> (ТОВ «ENERGY SAVING SOLUTIONS», мірник еалонний);
- <http://promvit.com.ua/> («Промвіт», емінісне обладнання);
- <https://www.vostok.dp.ua/ukr/catalog/scale/doza/product.html?id=4117> («Техноваги», об'ємно-ваговий дозатор)
- <http://bioengineering.su/oborudovanie/fermenteryi-promyishlennyye/> (Bioengineering, ферментери);

10. [https://vaterpass.com.ua/catalog/peristalticheskie\\_nasosyi](https://vaterpass.com.ua/catalog/peristalticheskie_nasosyi) («Ватерпасс», насоси).
11. <http://terrapumps.com.ua/centrifugi/centrifugi-ogsh/> («Terra machine», центрифуги);
12. <https://kb-sirius.com/rotor.shtml> («Сіріус», роторно-плівковий випарник);
13. <http://www.uvsprom.ru/group/reaktor-himicheskij/item/795-reaktor-osaditel> («ЮВС», реактор-осаджувальний);
14. <https://biotechno.ru/catalog/cushilki/mini-pilotnaya-liofilnaya-sushilka-lp03/> («Biotechno group», міні пілотна ліофільна сушарка);
15. [https://chemtest.com.ua/ua/vibracionnaja\\_melnitsa\\_cryomill\\_ua](https://chemtest.com.ua/ua/vibracionnaja_melnitsa_cryomill_ua) («Химтест», вібраційни млин);
16. [https://sms-skladtehnika.com/uk/goods/stol-iz-nerzhavejushhej-pishhevoj-stali/?cat\\_id=112](https://sms-skladtehnika.com/uk/goods/stol-iz-nerzhavejushhej-pishhevoj-stali/?cat_id=112) («Konsort», пакувальний стіл з нержавіючої харчової сталі).

## РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

### ФЕРМЕНТУ ЦГТ-ази

Технологічна схема виробництва ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази *Raenibacillus ehimensis* IB-739 включає в себе такі допоміжні роботи, як: санітарну підготовку виробництва, підготовку аераційного повітря для культивування м/о, підготовку і стерилізацію силіконового піногасника, підготовку реагента для осадження (органічний розчинник) та приготування і подальшу стерилізацію поживних середовищ. А також сам технологічний процес, який складається з підготовки посівного матеріалу, виробничого біосинтезу ферменту, подальшого зберігання культуральної рідини, відділення біомаси, концентрування цільового продукту, процес осадження ферменту органічним розчинником, подальше відділення осаду та його розчинення, сушіння ферменту, подрібнення ферментного порошку. Завершальними стадіями виробництва є пакування, маркування та відвантаження готового продукту, а також знешкодження відходів (твердих, рідких та газоподібних).

Технологічну схему наведено у графічній частині проекту.

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

#### **ДР 1.1 Підготовка мийно-дезінфікувальних засобів**

*ДР 1.1.1 Приготування робочого розчину «Кальцинована сода» для СІР-мийки*

Відповідно до підрозділу 2.1. для миття обладнання використовуємо миючий розчин кальцинованої соди, об'єм якого становить 2746 л. Для приготування робочого розчину даного засобу у збірник об'ємом 3000 л мобільної СІР-мийки, з нержавіючої сталі, (СМ-1) вносять, за допомогою об'ємно-вагового дозатора, 27,5 кг кальцинованої соди та додають 2718,5 л води питної. Обирають режим приготування на панелі управління, задаючи концентрацію робочого розчину – 1% та температуру нагріву – 75+/-5°C. Після чого, відповідно, миючий

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ</b>		
<b>Змн.</b>	<b>Лист</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>			
Розроб.		Бондарчук В.І.			<b>РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ФЕРМЕНТУ ЦГТ-АЗИ</b>		
Консульт.							
Керівник		Скороцька О. І.					
Н. Контр.							
Зав. каф.		Пирог Т.П.					
					<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
					Д	116	169
					<b>Кафедра БТМ</b>		

засіб автоматично готується у баку модулю СІР-мийки (до ДР 1.3.1).

*ДР 1.1.2 Приготування мийно-дезінфікуючого розчину «Біоконтакт» 0,3 %*

Готуємо робочий розчин у відрі об'єм якого складає 20 л. Для приготування 16,6 л даного мийно-дезінфікуючого засобу необхідно за допомогою мірного циліндра відміряти 50 мл концентрату та розвести його у 16,5 л підігрітої води питної до температури 35-45°C, ретельно перемішати до повного розведення. Даний робочий розчин використовується на одне генеральне прибирання (ДР 1.2.2.). Під час наступного робочий розчин готують аналогічно.

### ***ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень***

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

Процес щоденного прибирання приміщень відбувається вологим способом за використання води питної для миття підлоги, протирання кафельних поверхонь та дверей, з розрахунку на 1 м<sup>2</sup> - 100 мл води питної. Відпрацьована водна направляється на стадію знешкодження рідких відходів (до ЗВ 16.2).

Відпрацьована вода направляється далі на стадію знешкодження відходів.

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

Раз на місяць чи на вимогу мікробіолога проводять генеральне прибирання вологим способом. Для обробки підлоги, усіх кафельних поверхонь, вікон та зовнішнього миття обладнання, використовують 0,3% робочий розчин препарату «Біоконтакт» (від ДР 1.1.2.). Для знезараження повітря після генерального прибирання вмикають бактерицидні лампи. Відпрацьований розчин (до ЗВ 16.2).

Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження відходів.

### ***ДР 1.3 Підготовка технологічного обладнання***

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

Для миття обладнання та комунікацій використовують робочий розчин кальцинованої соди (від ДР. 1.1.1) підігрітої до температури 75°C. СІР-мийку під'єднують до розпилювальної головки, котра вмонтована в обладнання через

гнучкий шланг, та після закінчення приготування мийного розчину встановлюють режим миття.

Відповідне обладнання з'єднують трубопроводом з мобільною СІР-мийкою. Далі під'єднують саму розпилювальну форсунку, після закривають, відповідно, всю запірну арматуру, окрім подачі мийного засобу. Робочий розчин подають, за допомогою насоса СІР - мийки (СМ-1), на миття обладнання у відповідності з виставленим режимом миття: 15 хв промивання, 30 хв саме миття розчином, 15 хв ополіскування. Мийний розчин весь час циркулюється, і далі повторно використовується для миття наступного обладнання. Вже після декількох циклів миття, відпрацьовані мийні робочі розчини та вода передаються на знешкодження рідких відходів (до ЗВ 16.2).

#### *ДР 1.3.2 Технічний огляд*

Після миття обладнання здійснюють його візуальний технічний огляд. При виявленні можливих неущільнень в комунікаціях на запірній апаратурі, чи на обладнанні, здійснюють підтягування різьбових з'єднань.

#### *ДР 1.3.3 Перевірка на герметичність*

Даний процес передбачає подачу аераційного повітря, при цьому закривши усю запірну апаратуру, що призводить до набору надлишкового тиску, а саме: 0,1-0,2 МПа. Перекривають сам вентиль подачі повітря, і після фіксують показання манометра на кришці самого апарата та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Апарат вважається герметичним, якщо падіння тиску не перевищує, відповідно, 0,01 Мпа. В протилежному випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою сучасного методу галогенових течієшукачів. Він передбачає внесення в апарат невеликої кількості саме легкої галогенвмісної речовини - тетрахлорметану. Знову закривають усю запірну арматуру, далі апарат нагрівають до температури близько 80 °С, при цьому, збільшуючи тиск до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини - проникають через самі неущільнення і виявляються у разі наближення до них щупа галоїдного течієшукача БГТШ-5, котрий дозволяє нам фіксувати галогенопохідні алканів. У разі виявлення можливих неущільнень відбувається, відповідно, їх ліквідація, після проводять повторну перевірку.

Відпрацьоване повітря надходить на стадію знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 16.3).

#### *ДР 1.3.4 Стерилізація обладнання*

Для стерилізації апарата у саму сорочку подають глуху пару і проводять його нагрівання до температури 80-90°C. Необхідно відкрити усю запірну арматуру на всіх відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях, при цьому подають гостру пару безпосередньо в сам апарат – через нижній спуск, попередньо відкривши вентиль самого виходу відпрацьованого повітря для видалення всього повітря з апарату. Після досягнення температури стерилізації близько 125-131°C, ретельно закривають всю запірну арматуру, окрім парової, і витримують близько 1 години. Заключний етап - процес охолодження. Після витримування необхідно закрити запірну арматуру подачі пари, подати стерильне повітря, а в сорочку - холодну воду. Процес охолодження зупиняється при досягненні температури 30-40°C і надлишкового тиску  $P = 0,003-0,005$  МПа. Відпрацьоване повітря далі надходить на стадію знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 16.3).

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

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

Атмосферне повітря, на висоті 10 м, забирають через відповідний повітрозбірник (ПЗ-2), який розташовується як правило на висоті 2-3 метри від поверхні даху.

#### *ДР 2.2. Очищення повітря у фільтрі грубої очистки*

Пил, механічні домішки та інші крупні часточки бруду затримуються на фільтрі грубої очистки (Ф-3). Ступінь очищення становить 75 %.

#### *ДР 2.3. Компресування повітря*

Компресування повітря відбувається за допомогою компресора (К-4) при тиску 0,35 МПа та за температури 120-150°C.

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

З метою зменшення контамінації стиснене повітря різко «переохолоджують» в теплообміннику-охолоджувачі (Т-5) до температури

20°C і подають на ресивер (Р-6), де волога зріджується і таким чином її кінцевий відсоток становить 60%.

#### *ДР 2.5. Нагрівання повітря*

Здійснюють нагрівання охолодженого повітря до 30°C за допомогою повітронагрівача (Т-7). Даний процес проводять з метою запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів.

#### *ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі*

Подальше очищення повітря від мікроорганізмів здійснюється в тонкому фільтрі (Ф-8). Ступінь очищення якого збільшується до 95-98 %.

#### *ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Заключним етапом отримання аераційного повітря - використання індивідуальних фільтрів, їх ступінь очищення становить 99,99 %. Дані фільтри (Ф-17,20,23) встановлюють перед ферментерами (Фр 16, 19) та безпосередньо перед виробничим ферментером (Фр 22), та на виході відпрацьованого повітря (Ф-18,21,24).

### ***ДР 3 Приготування та стерилізація піногасника***

#### *ДР 3.1. Приготування та стерилізація піногасника «XIAMETER® AFE-1510 Antifoam Emulsion» у збірнику об'ємом 1 л*

У мірник (М-9) об'ємом 1 л, для піногасіння необхідно залити 50 мл емульсії відповідно, подачу здійснювати крапельним методом по мірі утворення піни (до ТП 6.5). Перед застосуванням піногасника невід'ємним процесом є його стерилізація в автоклаві за температури 131 °С, тиску 0,2 Мпа та тривалістю 40 хв.

#### *ДР 3.2. Приготування та стерилізація піногасника «XIAMETER® AFE-1510 Antifoam Emulsion» у збірнику об'ємом 2 л*

У мірник (М-10) об'ємом 2 л, для піногасіння потрібно залити 0,49 л емульсії відповідно, подачу здійснювати крапельним методом по мірі утворення піни (до ТП 6.6). Перед застосуванням піногасника невід'ємним процесом є його стерилізація в автоклаві за температури 131 °С, тиску 0,2 Мпа та тривалістю 40 хв.

*ДР 3.3. Приготування та стерилізація піногасника «XIAMETER® AFE-1510 Antifoam Emulsion» у збірнику об'ємом 6,5 л*

У мірник (М-11) об'ємом 6 л, для піногасіння потрібно залити 4,8 л емульсії відповідно, подачу здійснювати крапельним методом по мірі утворення піни (до ТП 7.1). Перед застосуванням піногасника невід'ємним процесом є його стерилізація в автоклаві за температури 131 °С, тиску 0,2 Мпа та тривалістю 40 хв.

#### **ДР 4. Підготовка реагенту для осадження ЦГТ-ази**

##### *ДР 4.1. Приготування 75-% розчину спирту етилового*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-35) подають 547 л 96-% розчину спирту етилового у збірник (З-36) об'ємом 900 л, та воду питну у кількості 153 л, щоб загальний об'єм становив 700 л. При цьому у сорочку апарата подають через трубопроводи розчин NaCl охолоджений, з метою попередження екзотермічної реакції. Розчин в апараті перемішують протягом 10 хвилин при швидкості 120 об/год і далі він надходить (до ТП 11.1).

#### **ДР 5 Підготовка та стерилізація поживних середовищ**

##### **ДР 5.1 Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках**

На першій стадії необхідно приготувати 460 мл поживного середовища, але враховуючи посівний матеріал розрахунок компонентів поживного середовища будемо розраховувати на робочий об'єм середовища - 510 мл. Формування композицій наведено в *табл. 8.1*.

*Табл.8.1*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 460 мл поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 510 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Крохмаль	10	5	А	25
Вода		20		
Пептон	4	2	Б	25
Дріжджовий екстракт	5	2,5		
Вода		20,5		

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	0,5	В	390
Вода		389,5		
CaCO <sub>3</sub>	1	0,5	Г	20
Вода		19,5		
<b>Разом:</b>		<b>460</b>		<b>460</b>

*ДР 5.1.1 Приготування та стерилізація композиції А*

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності 5 г крохмалю і вносять у термостійку плоскодонну колбу на 50 мл. Додають 20 мл води дистильованої кімнатної температури, суспендують і за постійного перемішування нагрівають на водяній бані за температури 80 °С протягом 15 хв (до гомогенізації). Після заварювання колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°С продовж 30 хв за тиску 0,05 МПа. Надходить (до ТП 6.4).

*ДР 5.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності наважки: 2 г пептону та 2,5 г дріжджового екстракту. Наважки переносять у термостійку плоскодонну колбу об'ємом 50 мл і додають 20,5 мл води дистильованої. За постійного перемішування нагрівають на водяній бані за температури 40 °С з метою кращого розчинення компонентів. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 112°С упродовж 30 хв за тиску 0,05 МПа. Надходить (до ТП 6.4).

*ДР 5.1.3 Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних, попередньо відтарованих, вагах зважують 0,5 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, вносять у колбу об'ємом 1 л. Додають 389,5 мл води дистильованої і ретельно перемішують до повного розчинення солі. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 °С впродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа. Надходить (до ТП 6.4).

*ДР 5.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г*

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності 0,5 г CaCO<sub>3</sub>, переносять у колбу на 50 мл. Додають 19,5 мл води дистильованої і ретельно перемішують до однорідної суспензії. Колбу закривають ватно-

марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 °С протягом 40 хв за тиску 0,15 МПа. Надходить (до ТП 6.4).

**ДР 5.2 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 10 л**

Для вирощування інокуляту на другій стадії необхідно 4,5 л поживного середовища. Також враховуючи посівний матеріал (10%) розрахунок компонентів поживного середовища розраховуватимемо на робочий об'єм середовища - 5 л.

Формування композицій наведено в *табл. 8.2*

*Табл. 8.2*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4,5 л поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 5 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	10	0,05	А	0,25
Вода		0,2		
Пептон	4	0,02	Б	0,150
Дріжджовий екстракт	5	0,025		
Вода		0,105		
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1	0,005	В	4,08
Вода		4,075		
СаСО <sub>3</sub>	1	0,005	Г	0,02
Вода		0,015		
<b>Разом:</b>		<b>4,5</b>		<b>4,5</b>

*ДР 5.2.1 Приготування та стерилізація композиції А*

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності наважку крохмалю 50 г і вносять у термостійку плоскодонну колбу на 500 мл наважку даного компоненту і додають 200 мл води питної кімнатної температури. Суспендують і за постійного перемішування нагрівають на водяній бані за температури 80 °С протягом 15 хв (до гомогенізації). Після заварювання колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°С продовж 30 хв за тиску 0,05 МПа. Надходить (до ТП 6.5).

*ДР 5.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності наважки: 20 г пептону та 25 г дріжджового екстракту і переносять у термостійку

плоскодонну коблбу об'ємом 300 мл Додають 105 мл води питної. За постійного перемішування нагрівають на водяній бані за температури 40 °С з метою кращого розчинення компонентів. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 112°С упродовж 30 хв за тиску 0,05 МПа. Надходить (до ТП 6.5).

#### *ДР 5.2.3 Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних, попередньо відтарованих, вагах зважують 5 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Наважку вносять у колбу об'ємом 150 мл і додають 75 мл води питної. Ретельно перемішують до повного розчинення солі. Вміст колби переносимо у ферментер (Фр-16) об'ємом 10 л і паралельно при постійному перемішуванні 50 – 100 об/хв подають в апарат, по трубопроводу за допомогою лічильника, решту води питної для даної композиції - 4 л. Стерилізують інокулятор в автоклаві при 131 °С впродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа. Надходить (до ТП 6.5).

#### *ДР 5.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г*

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності 5 г  $\text{CaCO}_3$ . Наважку переносять у колбу на 50 мл і додають 15 мл води питної, ретельно перемішують до однорідної суспензії. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 °С протягом 40 хв за тиску 0,15 МПа. Надходить (до ТП 6.5).

### ***ДР 5.3 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 100 л***

Для вирощування інокуляту на другій стадії необхідно 44,5 л поживного середовища. Зазначимо, що 10% припадає на конденсат, що утворюється під час стерилізації середовища у ферментері. Також враховуючи посівний матеріал (10%) розрахунок компонентів поживного середовища розраховуватимемо на робочий об'єм середовища - 49 л.

Формування композицій наведено в *табл. 8.3*.

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 44,5 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для робочого об'єму 49 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	10	0,5	А	2
Вода		1,5		
Пептон	4	0,2	Б	1,445
Дріжджовий екстракт	5	0,245		
Вода		1	В	40,9
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1	0,05		
Конденсат		4,1		
Вода		36,75	Г	0,2
СаСО <sub>3</sub>	1	0,05		
Вода		0,15		
<b>Разом:</b>		<b>44,5</b>		<b>44,5</b>

*ДР 5.3.1 Приготування та стерилізація композиції А*

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності наважку крохмалю 500 г і вносять у термостійку плоскодонну колбу на 4 л. Додають 1,5 л води питної кімнатної температури. Суспендують і за постійного перемішування нагрівають на водяній бані за температури 80 °С протягом 15 хв (до гомогенізації). Після заварювання колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°С продовж 30 хв за тиску 0,05 МПа. Надходить (до ТП 6.6).

*ДР 5.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності наважки: 200 г пептону та 245 г дріжджового екстракту. Наважки переносять у термостійку плоскодонну колбу об'ємом 3 л і додають 1 л води питної. За постійного перемішування нагрівають на водяній бані за температури 40 °С з метою кращого розчинення компонентів. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 112°С упродовж 30 хв за тиску 0,05 МПа. Надходить (до ТП 6.6).

*ДР 5.3.3 Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних, попередньо відтарованих, вагах зважують 50 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>. Наважку вносять у колбу об'ємом 750 мл і додають 250 мл води питної. Ретельно

перемішують до повного розчинення солі. Вміст колби переносимо у ферментер (Фр-19) об'ємом 100 л і паралельно при постійному перемішуванні 50 – 100 об/хв подають в апарат, по трубопроводу за допомогою лічильника, решту води питної - 36,5 л для даної композиції, попередньо врахувавши і віднявши конденсат (4,1 л). Стерилізація композиції відбувається у ферментері подачею гострої пари при 131 °С впродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа. Надходить (до ТП 6.6).

#### *ДР 5.3.4 Приготування та стерилізація композиції Г*

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності 50 г CaCO<sub>3</sub>. Наважку переносять у колбу на 500 мл і додають 150 мл води питної, ретельно перемішують до однорідної суспензії. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 °С протягом 40 хв за тиску 0,15 МПа. Надходить (до ТП 6.6).

#### *ДР 5.4 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 1000 л (1м<sup>3</sup>)*

Для проведення культивування у ферментері (Фр-22) об'ємом 1000 л (1м<sup>3</sup>) необхідно приготувати 436 л поживного середовища. Зазначимо, що 10% припадає на конденсат, що утворюється під час стерилізації середовища у посівному апараті. Також враховуючи посівний матеріал (10%) розрахунок компонентів поживного середовища будемо розраховувати на робочий об'єм середовища - 480 л.

Формування композицій наведено в *табл. 8.4*.

*Табл. 8.4*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 436 л поживного середовища**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для робочого об'єму 480 л середовища, кг (л)</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, л</b>
Крохмаль	10	4,8	А	28,8
Вода		24		
Пептон	4	1,9	Б	14,3
Дріжджовий екстракт	5	2,4		
Вода		10		

КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1	0,5	В	391
Конденсат		39		
Вода		351,5		
СаСО <sub>3</sub>	1	0,5	Г	2
Вода		1,5		
<b>Разом:</b>		<b>436</b>		<b>436</b>

*ДР 5.4.1 Приготування та стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-13) зважують у реактор-змішувач (РЗ-12), об'ємом 36 л, 4,8 кг крохмалю. Додають в апарат, по трубопроводу за допомогою лічильника 24 л води питної, кімнатної температури. Суспендують і за постійного перемішування, подаючи у сорочку глуху пару, нагрівають за температури 80 °С протягом 15 хв. Перемішування здійснюють до утворення однорідної суспензії (до гомогенізації) за допомогою лопатевої мішалки, якою обладнаний реактор. Стерилізують реактор (РЗ-12) в автоклаві. Температура стерилізації – 112° С, тиск – 0,1 МПа, тривалість – 30 хв. Надходить (до ТП 7.1).

*ДР 5.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-14) зважують у реактор-змішувач (РЗ-14), об'ємом 20 л, 1,9 кг пептону, 2,4 кг дріжджового екстракту. Додають в апарат, по трубопроводу за допомогою лічильника 10 л води питної. При постійному перемішуванні, за допомогою лопатевої мішалки якою обладнаний реактор, по трубопроводах подають у сорочку глуху пару і нагрівають апарат до температури 40 °С для кращого розчинення компонентів. Стерилізують реактор (РЗ-14) в автоклаві. Температура стерилізації – 112° С, тиск – 0,1 МПа, протягом 30 хв. Надходить (до ТП 7.1).

*ДР 5.4.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності, зважують 500 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>. Наважку вносять у колбу об'ємом 4 л і додають 1,5 л води питної. Ретельно перемішують до повного розчинення солі. Вміст колби переносимо у ферментер (Фр-22) об'ємом 1000 л і паралельно при постійному перемішуванні 50 – 100 об/хв подають в апарат по трубопроводу, за допомогою лічильника (індукційний витратомір), решту води питної - 350 л для даної композиції,

попередньо врахувавши і віднявши конденсат (39 л). Ферментер (ФР-22), з композицією розчину солі, стерилізують подачею гострої пари, температура стерилізації – 131°C, тиск 0,2 МПа, 40 хвилин. Надходить (до ТП 7.1).

#### *ДР 5.4.4 Приготування та стерилізація композиції Г*

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності 500 г подрібненого CaCO<sub>3</sub>. Наважку переносять в колбу об'ємом 4 л і додають 1,5 л води питної, ретельно перемішують (до гомогенізації). Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури – 131° С тиску – 0,2 МПа, впродовж 40 хвилин. Надходить (до ТП 7.1).

### **ТП 6 Підготовка посівного матеріалу**

#### **ТП 6.1 Підтримання колекційної культури**

Колекційну культуру *Raenibacillus ehimensis* IB-739 брали із колекції лабораторії прикладної мікробіології Інституту біології УНЦ РАН у ліофілізованому стані [7]. Зберігаються у герметично запаяних ампулах за температури не вище +2-4 °С, терміном придатності від 3 до 5 років. Завжди при роботі з колекційною культурою дотримуються асептичних умов. Дана схема ведення зводить до мінімуму кількість пасажів еталонної культури, проведених від моменту відновлення ліофілізованого матеріалу до цільового використання. Такий підхід дозволяє знизити ймовірність небажаних мутацій, що призводять до втрати еталонних властивостей штаму або випадкового забруднення. А також зберігає продуктивність штаму [57].

#### **ТП 6.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах**

Для отримання робочої культури, необхідно колекційну культуру, що зберігається в ліофілізованому стані, а точніше в ампулі відновити (розкрити в асептичних умовах). Далі до ампули внести необхідний поживний бульйон для регідратації, або фізіологічний розчин. Вміст ампули перемішують, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із крохмально-пептонним агаризованим середовищем К-1 і вирощують при температурі 37-39 °С протягом 48 годин.

### **ТП 6.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах**

Ізольовані колонії (від ТП 6.2) пересівають петлею у пробірки зі скошеним крохмально-пептонним агаризованим середовищем К-1 (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 48 год при температурі 37-39 °С.

### **ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалках**

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л, з 390 мл композиції В (від ДР 5.1.3) в асептичних умовах вносять 25 мл композиції А (від ДР 5.1.1), 25 мл композиції Б (від ДР 5.1.2) та 20 мл композиції Г (від ДР 5.1.4). Ретельно перемішують і розливають по 115 мл у чотири качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *P.ehimensis* ІВ-739, вирощеною на крохмально-пептонному агаризованому середовищі К-1, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою вносять одержану суспензію у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки. Вирощують культуру при 180 об/хв упродовж 36 годин при 37-39 °С і рН = 7,0-7,2.

По закінченню процесу проводять мікробіологічний аналіз культуральної рідини кожної колби та визначення концентрацій біомаси, джерела вуглецю і азоту. Після його проведення посівний матеріал з колб вносять в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

### **ТП 6.5 Вирощування культури у ферментері на 10 л**

У попередньо простерилізований ферментер (Фр-16) об'ємом 10 л, з 4,08 л композиції В (від ДР 5.2.3), в асептичних умовах за допомогою факела у патрубках вносять 250 мл композиції А (від ДР 5.2.1), 150 мл композиції Б (від ДР 5.2.2) та 20 мл композиції Г (від ДР 5.2.4) і посівний матеріал *P.ehimensis* ІВ-739 (через засівну колбу від ТП 6.4).

На початку культивування вмикають мішалку, барботер. Вирощування бактерій в інокуляторі триває 36 години при рН = 7,0-7,2 за температури 37-39°C, відповідним ступенем аерації, перемішування 180 об/хв. Подається стерильне аераційне повітря. Надлишковий тиск становить 0,02 МПа. Крапельним методом по мірі утворення піни подаємо піногасник (від ДР 3.1). Кожні 12 години здійснюємо мікробіологічний контроль, та визначення концентрацій біомаси, джерела вуглецю і азоту. Відпрацьоване повітря (до ЗВ 16.3).

### ***ТП 6.6 Вирощування культури у ферментері на 100 л***

У ферментер (Фр-19) об'ємом 100 л, з 40,9 л композиції В (від ДР 5.3.3) в асептичних умовах за допомогою факела у патрубках вносимо 2 л композиції А (від ДР 5.3.1.), 1,445 л композиції Б (від ДР 5.3.2) та 200 мл композиції Г (від ДР 5.3.4). За допомогою труби перетиснення вносимо 5 л посівного матеріалу (від ТП 5.5).

На початку культивування вмикають мішалку, барботер. Оптимальна температура для культивування складає 37-39 °С, відповідним ступенем аерації, перемішування 180 об/хв, подається стерильне аераційне повітря. Тривалість процесу складає 36 годин при рН = 7,0-7,2. Надлишковий тиск становить 0,02 МПа. Крапельним методом по мірі утворення піни подаємо піногасник (від ДР 3.2) Через кожні 12 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, та визначення концентрацій біомаси, джерела вуглецю і азоту. Відпрацьоване повітря (до ЗВ 16.3).

## **ТП 7. Виробничий біосинтез**

### ***ТП 7.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 1000 л***

У ферментер (Фр-22) об'ємом 1000 л з попередньо простерилізованою композицією В (від ДР 5.4.3) в асептичних умовах самоплином надходить 28,8 л композиції А (від ДР 5.4.1.) з реактора-змішувача (РЗ-12) та 14,3 л композиції Б (від ДР 5.4.2), з реактора-змішувача (РЗ-14), а з колби, в асептичних умовах за допомогою факела, в окремий патрубок вносимо 2 л композиції Г (від ДР 5.4.4). Також через трубу перетиснення з посівного апарата об'ємом 100 л подають 44 л посівного матеріалу (від ТП 6.6).

На початку культивування вмикають мішалку і барботер. Далі культивування здійснюється при температурі 37-39 °С, відповідним ступенем аерації, перемішування 180 об/хв, подається стерильне аераційне повітря. Тривалість процесу складає 72 години при рН = 7,0-7,2. Надлишковий тиск становить 0,02 МПа. Крапельним методом по мірі утворення піни подаємо піногасник (від ДР 3.3). Через кожні 24 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення активності циклодекстрин-глюканотрансферази, концентрацій біомаси, джерела вуглецю і азоту (С, N).

Культивування припиняється, коли орієнтовна активність ферменту буде складати 3,75 од/мл. Відпрацьоване повітря (до ЗВ 16.3).

## **ТП 8 Зберігання культуральної рідини**

### *ТП.8.1 Зберігання культуральної рідини у збірнику*

Культуральну рідину (432 л), отриману після стадії ферментації, за допомогою перистальтичного насоса (Н-25) перекачують у збірник об'ємом 600 л (З-26). Температура КР підтримується в апараті на рівні 10°С подачею води технічної в сорочку апарата.

## **ТП 9 Відділення біомаси**

### *ТП.9.1 Центрифугування культуральної рідини*

Зі збірника для зберігання культуральної рідини (З-26) за допомогою відцентрового насоса (Н-27) культуральна рідина (432 л) надходить на осаджувальну горизонтальну центрифугу зі шнековим вивантаженням осаду типу ОГШ-202К-05 (Ц-28). Час центрифугування становить 15 хв при частоті обертання 6000 об/хв. Супернатант культуральної рідини (431,7 л) за допомогою відцентрового насосу (Н-29) надходить у збірник об'ємом 600 л (З-30) для зберігання, а осад (0,3 л) – на стадію знешкодження твердих відходів (до ЗВ 16.1).

## **ТП 10 Концентрування цільового продукту**

### *ТП.10.1 Упарювання супернатанту*

Супернатант (фільтрат) у кількості 431,7 л зі збірника об'ємом 600 л (З-30), за допомогою відцентрового насосу (Н-31) надходить на випарювання у роторно-плівковий вакуум випарний апарат (ВВУ-32). Концентрування

здійснюють у 2,4 рази упродовж 35 хв (продуктивність випарної установки 750 л/год) при температурі 35°C і тиску 0,1 МПа. Утворений конденсат йде на регенерацію і пара повторно використовується. Утворена вторинна пара від продукту йде на стадію знешкодження газоподібних відходів (до ЗВ 16.3).

### **ТП 11 Очищення ферменту**

*ТП 11.1 Осадження ЦГТ-ази 75-% охолодженим розчином етилового спирту*

Упарений продукт (концентрат) у кількості 175 л перекачується насосом (Н-33) у реактор-осаджувач (Ро-34) об'ємом 1,25 м<sup>3</sup>. Концентрат охолоджують до 1-2°C розчином NaCl охолодженим, який подають у сорочку апарата через трубопроводи. Після додають охолоджений 75-% розчин спирту етилового 700 л (від ДР. 4.1) за допомогою відцентрового насосу (Н-37). Вмикають мішалку з частотою 150 об/хв і здійснюються осадження протягом 1 год.

### **ТП 12 Відділення утвореного ферментного осаду**

*ТП 12.1 Центрифугування утвореної суспензії*

Із реактора-осаджувача (Ро-34) за допомогою відцентрового насосу (Н-38) утворена суспензія (875 л) надходить на осаджувальну горизонтальну центрифугу зі шнековим вивантаженням осаду типу ОГШ-202К-05 (Ц-39) з метою відділення утвореного ферментного осаду. Час центрифугування становить 30 хв при частоті обертання 6000 об/хв. Надосадова рідина надходить на стадію очищення у ректифікаційні колони та повторно використовується. Утворений ферментний осад (21 г) вивантажується через шнек у ручну переносну термостійку ємність і додають воду, для його розчинення у відношенні осад:вода = 1:2 (50 мл води питної).

### **ТП 13 Отримання сухого ферменту ЦГТ-ази**

*ТП 13.1 Сублімаційне висушування*

Переведений у розчинену форму фермент (об'єм з водою становить 51 мл), в ручній термостійкій ємності, переносять у камеру ліофільної сушки та піддають ліофільному висушуванню. Сушіння здійснюється при товщині слою 1 см, температура заморожування мінус 60-50°C, температура холодоносія мінус

70-80°C в перші 1,5 год сушки, потім протягом наступних 1,5 год відбувається підвищення температури до мінус 20-30°C і остаточне висушування здійснюється протягом 3-4 год за температури теплоносія плюс 30°C. Вологість готового продукту становитиме 9%. Кількість висушеного продукту буде 18,9 г.

#### **ТП 14 Подрібнення ферментного препарату**

##### *ТП 14.1 Подрібнення сухого ферментного порошку на вібраційному млині*

Після сушіння сухий ферментний порошок у ручній переносній термостійкій посудині переносять на вібраційний млин (ВМ-41). Час подрібнення - 10-12 хв. Кінцевий продукт розміром - 5 мкм. Кількість подрібненого порошку становитиме 18,3 г

#### **ПМВ 15 Пакування, маркування, відвантаження**

##### *ПМВ 15.1 Пакування, маркування, відвантаження*

Після подрібнення з вібраційного млина (ВМ-41) готовий продукт вручну вивантажується у ручну переносну ємність та направляється на стадію фасування готового продукту. Зважування здійснюється за допомогою лабораторних електронних вагів на пакувальному столі готової продукції (ПС-42) і вручну фасується у 4 крафтові пакети дой-пак по 4,5 г (при цьому врахували втрати при пакуванні і маркуванні готового продукту, тоді ми отримаємо 18 г запакованого продукту). Пакети запаюються за допомогою ручного імпульсивного запайщика, маркуються за допомогою етикеток-самоклейок зі складу та направляються на склад готової продукції. Залишки пакувального матеріалу надходять на подальшу стадію знешкодження твердих відходів (до ЗВ 16.1).

#### **ЗВ 16 Знешкодження відходів**

##### *ЗВ 16.1 Знешкодження твердих відходів*

Один з варіантів нешкодження біомаси продуцента (від ТП 9.1) може бути її направлення, як один з компонентів добрива для рослин (біошрот). Пакувальні матеріали від миючих засобів, а також залишки пакувального матеріалу (від ПМВ 15.1) готового продукту постачаються на переробку в компанію ЗВПП «Регіон 2001» [58].

### *ЗВ 16.2. Знешкодження рідких відходів*

Знешкодження відпрацьованого миючого розчину кальцинованої соди та відпрацьованої води від СІР-мийки після миття обладнання (від ДР 1.3.1), відпрацьованої води після щоденного прибирання (від ДР 1.2.1) та відпрацьованого миючого розчину Біоконтакт після генерального прибирання (від ДР 1.2.2) здійснюється на анаеробній установці АВР-реакторі, після чого очищені стічні води йдуть на зрошування полів.

### *ЗВ 16.3. Знешкодження газоподібних відходів*

Знешкодження відпрацьованого повітря (від ДР 1.3.3, ДР 1.3.4, ТП 6.5, ТП 6.6, ТП 7.1) та утвореної вторинної пари (від ТП 10.1) здійснюється за допомогою системи біологічного очищення газових потоків - біоскрубера.

## РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЦГТ-ази

Упродовж процесу культивування періодично (кожні 24 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю (мікроскопіювання зразків та висів на щільні поживні середовища), визначення показників росту і синтезу, а також вмісту джерела вуглецю (крохмаль) і азоту (амінний азот).

### 9.1 Мікробіологічний контроль

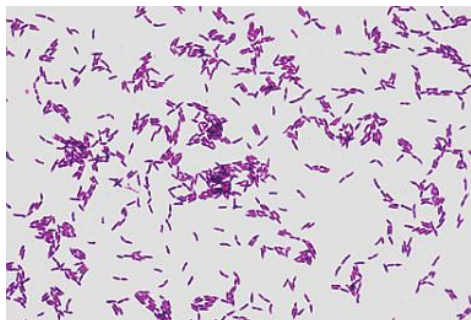
Для визначення чистоти культури використовують одночасно два способи: мікроскопіювання та висів на поживні середовища.

*Хід визначення.* Через тривалість отримання результатів методом висіву на щільні поживні середовища чистоту культури здебільшого контролюють мікроскопіюванням. Для цього готують препарат фіксованих забарвлених клітин і розглядають його з імерсією: за допомогою стерильної бактеріологічної петлі чи піпетки наносять на знежирене предметне скло краплю суспензії мікроорганізму. Матеріал рівномірно тонким шаром розподіляють на площі 1–2 см<sup>2</sup>. Підсушують та фіксують. Після фіксації на мазок наносять 2–3 краплі метиленового синього на 2–3 хв. Потім препарат висушують на повітрі і промокають фільтрувальним папером та мікроскопіюють з імерсією [46].

Штам *Paenibacillus ehimensis* IB-739 являє собою палички, які мають довжину 1,7-5,0 мкм, а ширину 0,4-0,6 мкм (рис. 9.1). У випадку виявлення мікробіоти з іншими морфолого-культуральними ознаками обов'язково здійснюють висів на поживні середовища.

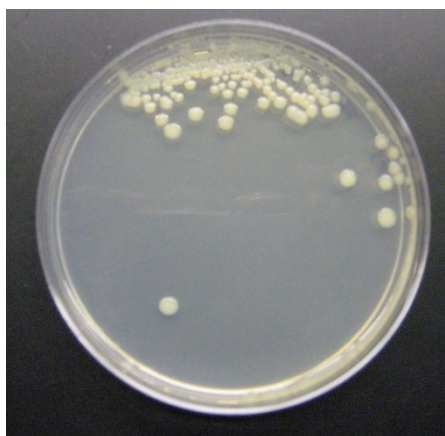
За оптимальної температури 37-39°C після 48 годин інкубації утворюють еліпсоїдні спори, що набухають. Капсули немає [15].

					НУХТ БТЕК 04.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарчук В.І.			<b>РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЦГТ-ази</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.						Д	135	169
Керівник		Скороцька О. І.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Пирог Т.П.						



*Рис.9.1 Paenibacillus ehimensis* під мікроскопом (збільшення  $\times 90$ )

Крім цього, чистоту культур мікроорганізмів обов'язково перевіряють висівом на поживні середовища. Культуральну рідину розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) або картопляно-глюкозним агаром (КГА) – для виявлення дріжджів і грибів. Критерієм чистоти є відсутність колоній інших мікроорганізмів, та однорідність виростилих колоній штаму *P.ehimensis* ІВ-739 [59]. Колонії мають круглу форму білого чи кремового кольору.



*Рис 9.2 Колонії Paenibacillus ehimensis* на МПА

## **9.2 Визначення показників росту та синтезу**

### **9.2.1 Отримання супернатанту**

Попередньо відбирають культуральну рідину у кількості 50 мл з ферментера і переносять у 5 центрифужних пробірок по 10 мл. Процедура включає в себе отримання проби центрифугування з отриманням супернатанту при 6000 об/хв протягом 30 хв. Даний супернатант використовують в подальших дослідженнях і визначеннях активності ЦГТ-ази, концентрації джерела вуглецю і азоту [7].

## 9.2.2 Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначаємо за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком. Для цього у пробірки вносимо 9 мл дистильованої води і 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтуємо, переливаємо у кювету об'ємом 1 мл і вимірюємо оптичну густина на ФЕК. Приріст клітинної біомаси реєструють фотометричним методом, заснованим на здатності бактеріальної суспензії поглинати або розсіювати світло пропорційно кількості бактерій, за оптичною щільності культуральної рідини при довжині хвилі 630 нм на спектрофотометрі СФ-46 ("ЛОМО", Росія) [7].

## 9.2.3 Визначення активності циклодекстрин-глюканотрансферази

Активність позаклітинної циклодекстрин-глюканотрансферази розчинів і препаратів (в КР та готовій субстанції) вимірюють спектрофотометричним методом з фенолфталеїновим реагентом. Даний метод вигідно відрізняється від ВЕРХ аналога високою чутливістю, швидкістю і можливістю проведення вимірів у великих серіях дослідів.

*Суть методу.* Метод заснований на вимірюванні величини екстинції - світлопоглинання (довжина хвилі 553 нм) лужного розчину з індикатором, після внесення в нього реакційної суміші, що містить циклодекстрини, які утворюють в лужному зафарбованому розчині безбарвний комплекс з фенолфталеїном.

За одиницю активності ферменту приймають кількість ферменту, який каталізує утворення 1 мкМ циклодекстрину протягом 1 хв при 40 °С.

*Хід визначення.* Ферментну реакцію проводять, використовуючи в якості субстрату розчинений картопляний крохмаль 3% в 0,1 М ацетатному буфері (рН = 5,7±0,03), доведений 10%-вою оцтовою кислотою. Порцію 900 мкл субстрату вносять в пробірки епіндорф і підігрівають 5-10 хв в термостаті до 40°C. Реакцію ініціюють введенням в дану пробірку 450 мкл супернатанту, отриманого нами раніше (див. пункт 9.2.1.). Розбавляють в 0,1 М ацетатному буфері (рН = 5,7), що містить 10 мМ CaCl<sub>2</sub> та перемішуємо. Суміш інкубують в термостаті протягом 60 хв при 40 °С. Після відбираємо 500 мкл продукту реакції

і вносимо у пластмасові пробірки на 5 мл, що вже містять 3 мл фенолфталеїнового реагенту, приготованого на основі 0,1 М калій-карбонатного буфера (рН 11,0). Перемішуємо і переносимо у кювету на 1 мл і вимірюють оптичну щільність отриманої суміші при 553 нм. Як контроль на противазі стоїть кювета із реакційною сумішю, що не піддавалась інкубуванню в термостаті.

Активність ферменту розраховують за формулою експоненційного росту, що зв'язує величину падіння оптичної щільності, щодо контролю та ступеня розведення ферменту:

$$E = [0.69058 \cdot e^{(\Delta D_{553}/0.32721)} - 0.68915]N/60,$$

Де  $E$  - активність тестованого препарату культуральної рідини, од/мл;  $\Delta D_{553}$  - різниця оптичної щільності розчину фенолфталеїну після внесення порцій реакційної суміші і контрольного розчину;  $N$  - ступінь розведення супернатанта культуральної рідини або ферментного препарату, використовуваного для визначення активності, при якому різниця оптичної щільності перебуває в рекомендованому робочому діапазоні  $0,07 \leq D_{553} \leq 0,28$ .

Описаний метод придатний для роботи в порівняно широкому діапазоні специфічної активності ЦГТази і не вимагає точного підбору ступеня розбавлення аналізованих розчинів [60].

#### **9.2.4 Концентрація джерела вуглецю**

Джерелом вуглецю в середовищі культивування є крохмаль (лінійний полісахарид, що складається із залишків  $\alpha$ -D-глюкози). Для його визначення використовують біосенсор, на основі друкованих електродів (рис. 9.3), модифікованих ферментами (імобілізовані на електроді).

*Суть методу.* Визначення крохмалю здійснюється з застосуванням біферментного рецепторного елемента, який включає в себе глюкозооксидазу (GOD) і амілазу (GA). Спочатку за допомогою амілази крохмаль розкладається до глюкози, яка в свою чергу піддається дії глюкозооксидази. Внаслідок дії даного ферменту глюкоза окиснюється з утворенням пероксиду водню та D-глюконолактону. Глюконолактон спонтанно гідролізується до глюконової

кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон. Це, у свою чергу, спричинює зміну провідності, яку можна реєструвати за допомогою потенціометричного перетворювача. Проходження ферментної реакції на поверхні електрода призводить до зміни потенціалу на самому електроді, що реєструється пристроєм як інформаційний сигнал [61].

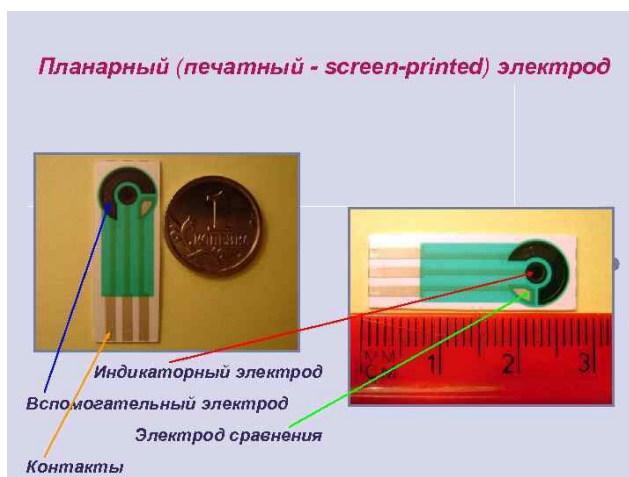


Рис 9.3 Друкований електрод

*Техніка вимірювання.* Сигнал реєструють, використовуючи графітові друковані електроди, на поверхні яких розташований рецепторний елемент. Вимірювання проводять в кюветі об'ємом 4 мл в натрій-калієвому фосфатному буфері з рН 6,8 при перемішуванні магнітною мішалкою зі швидкістю 200 об/хв. Введення проби (супернатанту, який ми отримали раніше - див. пункт 9.2.1) здійснювали автоматичними мікропіпетками - 50 мкл (0,5 мл). Робочий потенціал для електродів задавали по емпіричним даним циклічної вольтамперометрії з використанням потенціостата EmStat. Для електродів які містять глюкозооксидазу і амілазу він склав +0,25 В.

Вихідні дані оброблял на комп'ютері з використання програми PS Trace. Аналітичним сигналом (відповіддю біосенсора) була амплітуда зміни вихідного сигналу при додаванні супернатанту культуральної рідини, яка містить крохмаль [62] (рис 9.4).

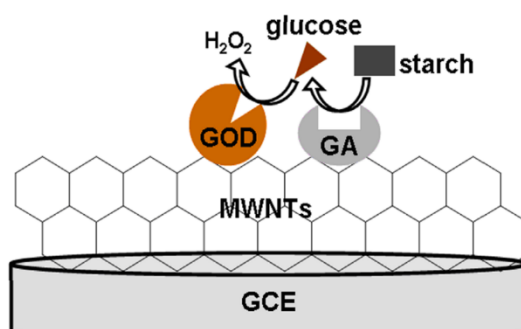


Рис 9.4 Принцип роботи біосенсора

### 9.2.5 Концентрація джерела азоту

В середовищі джерелом азоту слугує дріжджовий екстракт і пептон. Тобто в ми маємо справу з **амінним азотом** – це азот, що входить до вільних аміногруп ( $-\text{NH}_2$ ), пептидів і амінокислот та інших продуктів гідролізу білка.

Визначення азоту вільних аміногруп в амінокислотах, пептидах, білків та інших з вмістом азоту 1,5 - 5,0 мг в 1 мл випробуваного розчину проводять методом формольного титрування (метод Сьоренсена).

*Суть методу:* полягає у здатності формальдегіду зв'язувати вільні аміногрупи з утворенням метиленових похідних амінокислот (утворення основ Шифа) і алкалометричним титрування еквівалентної кількості карбоксильних груп.



Рис. 9.5 Утворення метиленових похідних

Аміногрупи при цьому втрачають основні властивості, а вільні карбоксильні групи відтитровують розчином лугу:



Рис. 9.6 Алкалометричне титрування карбоксильних груп розчином лугу

*Техніка визначення:* У склянку ємністю 50 мл внести 17 мл дистильованої води і 3 мл випробуваного зразка (нашого супернатанту, який ми отримали раніше див. пункт 9.2.1.). Занурити в отриману суміш електроди рН - метри. При постійному перемішуванні титрувати рН суміші 0,1 М розчином їдкого натру до рН 7,0. Додати в отриманий розчин 2 мл формальдегіду розчину 35% і при постійному перемішуванні титрувати 0,1 М розчином їдкого натру до рН 9,2, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо-рожевого забарвлення (індикатор - фенолфталеїну розчин 1%). Визначити (зафіксувати) кількість мл 0,1 М їдкого натру, який пішов на титрування.

Повторити випробування ще раз. Одночасно провести контрольне випробування, додавши замість 3 мл досліджуваного супенатанту 3 мл дистильованої води для перевірки реактивів. Визначити (зафіксувати) кількість мл 0,1 М їдкого натру, який пішов на титрування.

Розраховуємо вміст амінного азоту в досліджуваному розчині в двох паралельних визначеннях ( $X_1$  і  $X_2$ ) за формулою:

$$X\% = \frac{(V - V_1) \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100}{3}$$

$V$  - кількість розчину натрій гідроксиду 0,1 М, взятого на титрування досліджуваного розчину (мл);

$V_1$  - кількість розчину натрій гідроксиду 0,1 М, взятого на титрування контрольної проби (мл);

$K$  - уточнюючий коефіцієнт до титру розчину натрій гідроксиду (0,1 М);

1,4 - кількість азоту, що відповідає 1 мл 0,1 Н розчину їдкого натру, мг

3 - кількість дослідного зразка, взятого на аналіз, мл.

Допускається розбіжність між результатами паралельних визначень не більше  $\pm 3\%$

Розраховуємо середнє арифметичне значення результатів, отриманих при проведенні двох паралельних визначень амінного азоту в досліджуваних зразках, за формулою:

$$X_{\text{ср.}} \% = \frac{X_1 - X_2}{2}$$

Середнє арифметичне значення, отримане з двох паралельних досліджень вмісту амінного азоту в досліджуваних зразках є остаточним результатом [63].

### **9.3 Визначення вологості висушеного ферментного порошку**

Після стадій висушування та подрібнення отримують готовий ферментний порошок, який необхідно перевірити на вологість. Для вимірювання вологості готового порошку використовують високотехнологічний тестовий прилад: щуповий вологомір сипучих матеріалів - WALCOM ТК-100, який заснований на кондуктометричному принципі. Прилад дозволяє виміряти вміст води швидко і точно.

*Методика проведення:* металеві електроди занурюють в досліджувану речовину, або певний сухий сипкий продукт, після чого розраховується співвідношення між відсотковим вмістом води та електричним опором.

Діапазон вимірювання становить: відносна вологість - 0-80 %, точність приладу:  $\pm 0,5$  % [64]. Кількість СР (сухих речовин) в готовому продукті становить 91%, а відносної вологості 9%.



*Рис. 9.7 Щуповий вологомір сипучих матеріалів - WALCOM ТК-100*

Карту постадійного контролю виробництва ферменту ЦГТ-ази *Paenibacillus ehimensis* IB-739 наведено у табл. 9.1.

Таблиця 9.1

**Карта постадійного контролю виробництва ферменту ЦГТ-ази *P.ehimensis* IB-739**

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
<b>ДР 1. Санітарна підготовка виробництва</b>				
<b>ДР 1.1. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів</b>				
Кх, Кт 1.1.1 Приготування миючого розчину кальцинованої соди в СІР-мийці	Концентрація розчину, температура, час приготування	Хімічний метод, датчик температури, годинник	Після приготування розчину, температура під час приготування	C = 1%, t = 75+/-5°C T = 15 хв
Кх, Кт 1.1.2 Приготування дезінфікуючого розчину «Біоконтакт»	Концентрація розчину «Біоконтакт», час приготування	Хімічний метод, термометр технічний, годинник	Об'єм визначається після приготування розчину, температура під час приготування	C = 0,3% t = 35-40°C T = 15 хв
<b>ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень</b>				
Кт 1.2.1 Щоденне прибирання	Підлога, двері, кафельні поверхні, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Відсутність пилу та бруду
Кт, Км 1.2.2 Генеральне прибирання	Підлога, вікна, двері, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд, Мікробіологічний контроль	Після прибирання	Відсутність пилу та бруду та патогенних м/о
<b>ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання</b>				
Кт, Км 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання	Обладнання, температура мийного розчину, час, чистота	Термометр технічний, годинник, візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд та змив після миття	t = 75°C, τ = 1 год, чисте обладнання, відсутність патогенних м/о

1	2	3	4	5
Кт 1.3.2 Технічний огляд	Обладнання	Візуальний огляд	Під час операції	Відсутність несправностей
Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Обладнання, температура, тиск, перепад тиску, час	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	$t = 80^{\circ}\text{C}$ , $P = 0,2 \text{ МПа}$ , $\Delta P < 0,01 \text{ МПа}$ $\tau = 30-60 \text{ хв}$
Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізація, тиск, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації	$t = 130^{\circ}\text{C}$ , $P = 0,003-0,005 \text{ МПа}$ , $\tau = 1 \text{ год}$ ,
<b>ДР 2. Підготовка аераційного повітря</b>				
Кт 2.2 Очищення повітря у фільтрі грубої очистки	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 75 \%$ , тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,35 \text{ МПа}$ , $t = 125-250^{\circ}\text{C}$
Кт 2.4. Охолодження повітря і видалення вологи	Охоложене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	$t = 20^{\circ}\text{C}$ , $W = 60 \%$
Кт 2.5. Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 30^{\circ}\text{C}$
Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	$E = 95 \%$ , тиск згідно паспорту
Кт 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	$E = 99,999 \%$ , тиск згідно паспорту

1	2	3	4	5
<b>ДР 3. Підготовка та стерилізація піногасника</b>				
Кт, Км 3.1 Підготовка і стерилізація піногасника	Об'єм піногасника <i>XIAMETER</i> <sup>®</sup> <i>AFE-1510</i> , стерильність	Мікробіологічний метод	Об'єм визначається після приготування розчину, мікробіологічний контроль	V = 50 мл, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2 Підготовка і стерилізація піногасника	Об'єм піногасника <i>XIAMETER</i> <sup>®</sup> <i>AFE-1510</i> , стерильність	Мікробіологічний метод	Об'єм визначається після приготування розчину, мікробіологічний контроль	V = 0,49 л, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3 Підготовка і стерилізація піногасника	Об'єм піногасника <i>XIAMETER</i> <sup>®</sup> <i>AFE-1510</i> , стерильність	Мікробіологічний метод	Об'єм визначається після приготування розчину, мікробіологічний контроль	V = 4,8 л, відсутність мікробіоти
<b>ДР 4. Підготовка реагенту для осадження ЦГТ-ази</b>				
Кт, Кх 4.1. Підготовка 75-% розчину етилового спирту	Концентрація розчину, температура, швидкість перемішування	Хімічний метод (автоматичний аналізатор конц. спирту); датчик температури	Після приготування розчину, температура і швидкість під час приготування	C = 75%, t = 1-2°C T = 10 хв W = 120 об/год
<b>ДР 5. Підготовка та стерилізація поживного середовища</b>				
<b>ДР 5.1. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці</b>				
Кт, Км 5.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 5.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
<b>ДР 5.2. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л</b>				
Кт, Км 5.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
<b>ДР 5.3. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л</b>				
Кт, Км 5.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 5.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.3.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
<b>ДР 5.4. Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 1000 л</b>				
Кт, Км 5.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
<b>ТП 6. Підготовка посівного матеріалу</b>				
Кт 6.1 Підтримка колекційної культури <i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739 (ліофілізована)	<b>Колекційна культура <i>P.ehimensis</i> IB-739</b> Температура, тривалість зберігання	Термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час зберігання	t = 2-4 °C, τ = 3-5 років
Кт, Км 6.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах	<b>Робоча культура <i>P.ehimensis</i> IB-739</b> Морфологічна, однорідність, температура, тривалість вирощування, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 37-39°C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти, круглі колонії білого чи кремового кольору
Кт, Км 6.3 Вирощування робочої культури на агаризованих середовищах	<b>Посівний матеріал</b> Морфологічна, однорідність, температура, тривалість вирощування, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, м/б контроль проводять після вирощування	t = 37-39°C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти, круглі колонії білого чи кремового кольору
Кт, Кх, Км 6.4 Вирощування культури в колбах на качалках	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, рН, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, визначення концентрації біомаси, джерела вуглецю і азоту	Термометр технічний, годинник, датчик рН, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, рН визначається перед культивуванням та під час культивування, м/б контроль та конц. біомаси, джерела вуглецю і азоту після вирощування	t = 37-39°C, τ = 36 год, рН = 7,0-7,2 ω = 180 об/хв с(X) = 1 г/л с(C), с(N), відсутність сторонньої мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Кх, Км 6.5 Вирощування культури у ферментері на 10 л	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, рН, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, визначення концентрації біомаси, джерела вуглецю і азоту.	Термометр технічний, годинник, датчик рН, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, ФЕК, біосенсор, на основі друкованих електродів, метод формольного титрування	Температура і швидкість обертання контр. і підтримуються автоматично весь час вирощування, рН визнач. перед культ. та під час культ., м/б контроль та визначення конц. біомаси, джерела вуглецю і азоту - кожні 24 годин	t = 37-39°C, τ = 36 год, рН = 7,0-7,2 ω = 180 об/хв Р <sub>надл.</sub> = 0,02 МПа, с(X) = 1 г/л с(C), с(N), відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.6 Вирощування культури у ферментері на 100 л	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість вирощування, рН, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, визначення концентрації біомаси, джерела вуглецю і азоту.	Термометр технічний, годинник, датчик рН, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, ФЕК, біосенсор, на основі друкованих електродів, метод формольного титрування	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, рН визначається перед культивуванням та під час культивування, мікроскопіювання та визначення конц. біомаси, джерела вуглецю і азоту - кожні 24 годин	t = 37-39°C, τ = 36 год, рН = 7,0-7,2 ω = 180 об/хв Р <sub>надл.</sub> = 0,02 МПа, с(X) = 1 г/л с(C), с(N), відсутність сторонньої мікробіоти
<b>ТП 7. Виробничий біосинтез</b>				
Кт, Кх, Км 7.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 1000 л	<b>Культуральна рідина</b> Температура, тривалість вирощування, рН, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, м/ю чистота культури, визначення концентрації біомаси, джерела вуглецю і азоту, визначення активності ферменту ЦГТ-ази <i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739	Термометр технічний, годинник, датчик рН, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, ФЕК, біосенсор, на основі друкованих електродів, метод формольного титрування, спектрофотометричний метод	Температура і швидкість обертання контр. і підтримуються автоматично весь час вирощування, рН визначається перед культивування та під час нього, мікроскоп. та визначення конц. біомаси, джерела вуглецю і азоту та акт. ферменту - кожні 24 годин	t = 37-39°C, τ = 72 год, рН = 7,0-7,2 ω = 180 об/хв Р <sub>надл.</sub> = 0,02 МПа, с(X) = 1 г/л с(C), с(N), U(ЦГТ-ази) = 3,75 од/мл, відсутність сторонньої мікробіоти

1	2	3	4	5
<b>ТП 8. Зберігання культуральної рідини</b>				
Кт.8.1 Зберігання культуральної рідини у збірнику	Температура	Датчик температури	Перед початком кожного виробничого циклу	$t = 10^{\circ}\text{C}$
<b>ТП 9. Відділення біомаси</b>				
Кт 9.1 Центрифугування культуральної рідини	Частота обертів, тривалість процесу	Тахометр, годинник	Частота обертів перевіряється безпосередньо перед і під час процесу, час під час проведення операції	$T = 15 \text{ хв},$ $W = 6\,000 \text{ об/хв}$
<b>ТП 10. Концентрування цільового продукту</b>				
Кт 10.1. Упарювання супернатанту	Тиск, температура, швидкість та час упарювання	Датчик температури, манометр, годинник	Тиск, температура, час та швидкість контролюється безпосередньо під час проходження процесу	$P = 0,1 \text{ МПа}$ $t = 35^{\circ}\text{C};$ $G = 750 \text{ л/год}$ $T = 35 \text{ хв}$
<b>ТП 11. Очищення ферменту</b>				
Кт 11.1 Осадження ЦГТ-ази 75-% охолодженим розчином етилового спирту	Температура, частота обертів мішалки	Датчик температури, тахометр	Частота обертів та температура перевіряється безпосередньо перед і під час процесу	$W = 150 \text{ об/хв}$ $t = 3-5^{\circ}\text{C};$ $T = 1 \text{ год}$
<b>ТП 12. Відділення утвореного ферментного осаду</b>				
Кт 12.1 Центрифугування утвореної суспензії	Частота обертів, тривалість процесу	Тахометр, годинник	Частота обертів перевіряється безпосередньо перед і під час процесу, час під час проведення операції	$T = 30 \text{ хв},$ $W = 6\,000 \text{ об/хв}$
<b>ТП 13. Отримання сухого ферменту ЦГТ-ази</b>				
Кт 13.1 Сублимаційне висушування	Тиск, температура	Манометр, датчик температури	Під час процесу ліофілізації	$t = -45^{\circ}\text{C}$ $P = 0,15 \text{ МПа}$

1	2	3	4	5
<b>ТП 14. Подрібнення ферментного препарату</b>				
Кт 14.1 Подрібнення сухого ферментного порошку	Час подрібнення	Годинник	Під час процесу подрібнення	T = 10-12 хв
<b>ТП 15. Пакування, маркування, відвантаження</b>				
Кт 15.1. Пакування, маркування, відвантаження	Упакований продукт, якість маркування	Візуально	Після маркування	Відповідність оригіналу

## РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ЦГТ-ази

Підвищення ефективності роботи біотехнологічних виробництв, можливо, не лише завдяки підготовці спеціалістів з біотехнології, які володіють спеціальними знаннями в області промислової мікробіології, а й шляхом оптимізації процесів виробництв, які реалізуються за допомогою систем автоматичного керування, контролю біотехнологічних параметрів процесу. Помилки можуть коштувати великих втрат часу, сировини і як наслідок, прибутку. Тому при проектуванні біотехнологічного виробництва необхідно приділити велику увагу розробці методів автоматизації [65].

При системному підході автоматизація виробництва дає кращі результати, коли досконало вивчаються властивості об'єкта автоматизації, розробляється функціональна структура як сукупність виконуваних системою функцій [66].

У даній роботі пропонується автоматизувати ділянку осадження цільового продукту, а саме ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази (ЦГТ-ази) органічним розчинником за низьких температур. Реалізація даного процесу нерозривно пов'язана з дотриманням всіх умов і параметрів технології з метою отримання якісного продукту. Отже розробка системи автоматизації передбачає на меті оптимізувати даний процес, мінімізувати технологічні помилки та отримати на виході стабільний продукт.

### 10.1 Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації

Після процесу концентрування супернатанту упарюванням на тонкоплівковому вакуум-випарному апараті концентрат за допомогою відцентрового насоса подається в осаджувальний реактор з метою проведення процесу осадження ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази (ЦГТ-ази) за допомогою органічного розчинника.

Одним із способів осадження ферментних препаратів - це за допомогою органічних розчинників. Під час змішування, наприклад, етанолу, ізопропанолу,

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.09 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Бондарчук В.І.</i>				<b>РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ЦІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ЦГТ-ази</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>	<i>Клименко О.М.</i>					<i>Д</i>	152	169
<i>Керівник</i>	<i>Скороцька О. І.</i>					<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Пирог Т.П.</i>							

ацетону, як органічних розчинників із рідиною, в даному випадку концентрату упареного фільтрату, в якому міститься цільовий фермент, то він випаде в осад.

В результаті знижується активність води, при цьому відповідно знижується і діелектрична стала середовища. Білок випадає в осад, так як руйнується його гідратна оболонка. Важливим параметром під час проведення даного процесу є необхідна концентрація розчинника, та його співвідношення відповідно до концентрату, що дозволить провести точне фракціонування білків [4]. Найкращим та найефективнішим органічним розчинником виявився 75%-вий розчин спирту етилового у співвідношенні 4:1 до осаду.

Важливим параметром даного етапу виділення цільового продукту є підтримання низьких температур, при приготуванні 75% спирту етилового та при осадженні фермента в реакторі, що забезпечить кращий процес фракціонування та унеможливить сильну екзотермічну реакцію розчинника з рідиною. Підтримку температури на рівнях  $1\pm 1^{\circ}\text{C}$  та  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  відповідно здійснюють за допомогою подачі в сорочку апарата розчину NaCl охолодженого (розсолу) з трубопроводів. Після охолодження концентрату до заданої температури і при постійному перемішуванні подають, приготований в окремому збірнику, охолоджений 75% спирт етиловий, об'ємом 700 л.

Під час процесів приготування органічного розчинника заданої концентрації та подальшого осадження цільового продукту здійснюють перемішування лопатевою мішалкою при  $100\pm 10$  об/хв протягом 30 хвилин та  $150\pm 10$  об/хв протягом 1 години відповідно [5].

Після процесу осадження утворена суспензія за допомогою відцентрового насоса переходить на стадію центрифугування. Таким чином, у результаті аналізу технологічного процесу осадження ЦГТ-ази етанолом, як органічним розчинником, було проаналізовано та зроблено висновки, що система керування технологічним процесом повинна забезпечувати здійснення наступних задач:

1. Контроль рівня рідини у збірнику для приготування 75% спирту етилового із сигналізацією відповідно по досягненню рідиною верхнього

допустимого рівня та його підтримання на заданому значенні управлінням клапанами, як виконавчими органами.

2. Контроль і регулювання температури у збірнику для приготування 75% спирту етилового шляхом зміни подачі розчину NaCl охолодженого у сорочку апарата.

3. Контроль і регулювання інтенсивності перемішування (кількість обертів мішалки за хвилину) по реєстрації даних і сигналізацією при досягненні заданого значення та можливого відхилення від нього.

4. Контроль і регулювання відповідної концентрації спирту етилового у збірнику шляхом зміни подачі 96% в апарат і зміну подачі води питної холодної в апарат через об'ємно-ваговий дозатор.

5. Контроль рівня рідини в осаджувальному реакторі із сигналізацією відповідно по досягненню рідиною верхнього допустимого рівня та його підтримання на заданому значенні управлінням клапанами, як виконавчими органами.

6. Контроль і регулювання температури в осаджувальному реакторі шляхом зміни подачі розчину NaCl охолодженого у сорочку апарата.

7. Контроль і регулювання інтенсивності перемішування (кількість обертів мішалки за хвилину) по реєстрації даних і сигналізацією при досягненні заданого значення та можливого відхилення від нього.

8. Управління відцентровим насосом перекачки розчинника зі збірника до осаджувального реактора.

9. Управління відцентровим насосом перекачки суспензії осадженого ферментного розчину з осаджувального реактора до наступної технологічної установки та відповідного процесу.

Згідно сформованих задач системи керування технологічним процесом було проаналізовано та сформовано наступні завдання на розробку системи автоматизації. Зважимо на те, що у роботі буде розглянута система автоматизація у якій центральним управляючим пристроєм є саме мікропроцесорний контролер, а спостереження за ходом виконання технологічним процесом і у разі

необхідності втручання в управління ним буде відбуватись безпосередньо за допомогою автоматизованого робочого місця (АРМ) оператора технолога з використанням спеціально розробленого людино-машинного інтерфейсу.

## Завдання на розробку системи автоматизації

№	Машина, апарат	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю
1	Збірник для приготування 75% спирту етилового	Рівень рідини в апараті	700 л	Контроль	Відображ., сигнал., реєстрація	АРМ оператора
				Управління	Підтримання на заданому значенні	Регулюючі органи по місцю
2		Температура	1±1°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Підтримання на заданому значенні, відображення, реєстрація	АРМ оператора - вплив на подачу розчину NaCl охолодженого у сорочку апарата
3		Інтенсивність перемішування	100±10 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на кількість обертів мішалки за хвилину і кнопка «Стоп» по місцю
4		Концентрація етанолу	75%	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
	Регулювання			Підтримання на заданому значенні, відображення, реєстрація	АРМ оператора - вплив на подачу 96% етанолу та води питної в апарат через об'ємно-ваговий дозатор	
5	Рівень рідини в апараті	825 л	Контроль	Відображ., сигнал., реєстрація	АРМ оператора	
			Управління	Підтримання на заданому значенні	Регулюючі органи по місцю	
6	Температура	4±1°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора	
			Регулювання	Підтримання на заданому значенні, відображення, реєстрація	АРМ оператора - вплив на подачу розчину NaCl охолодженого у сорочку апарата	
7	Інтенсивність перемішування	150±10 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора	
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на кількість обертів мішалки за хвилину і кнопка «Стоп» по місцю	

№	Машина, апарат	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю
8	Насос перекачки розчинника зі збірника до осаджувального реактора	Стан насосу	Увімкнено/вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
9	Насос відкачки суспензії з осаджувального реактора до наступної технологічної установки					

## 10.2 Опис функціональної схеми автоматизації

**Перший контур** автоматичного контролю і управління рівня рідини у збірнику для приготування 75% етилового спирту. Рівень у даному апараті має регламентоване значення 700 л і контролюється датчиком рівня (поз. 1а). Спостереження за зміною відображається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) змін в архіві даних. В залежності від значення рівня регулюється подачею рідин (спирту етилового і води питної) за допомогою регулюючого органу (поз. 1в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 1б.

**Другий контур** автоматичного контролю і управління температури у збірнику для приготування 75% етилового спирту. Температура в даному апараті має регламентоване значення 1°C і допустиме відхилення  $\pm 1$  °C. Температура у збірнику вимірюється датчиком температури (поз. 2а). У разі перевищення допустимого відхилення температури передбачається сигналізація на АРМі оператора. Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від температури відбувається управління подачею охолодженого розчину NaCl (розсол) у рубашку апарата регулюючим органом (поз. 2в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 2б. Зміни температури під час процесу відображаються і реєструються безперервно у часі на АРМі оператора.

**Третій контур** автоматичного контролю та управління швидкості перемішування рідини у збірнику для приготування 75% етилового спирту, яка приводиться в дію мотором (М1) і контролюється ж ним на заданому значенні. Швидкість обертів має регламентоване значення 100 об/хв і відхилення  $\pm 10$  об/хв. Частота обертів у збірнику (поз. 3а). Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога. Для регулювання швидкості обертів мішалки передбачається її стабілізація за рахунок впливу на частоту обертів мішалки і аварійною кнопкою «Стоп» по місцю.

У **четвертому контурі** автоматичного контролю і управління, необхідним є контроль та регулювання заданої концентрації спирту етилового у збірнику для його приготування, що має регламентоване значення 75% і вимірюється датчиком концентрації спирту (поз. 4а). Спостереження за зміною

передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) змін в архіві даних. Для регулювання концентрації спирту етилового в результаті відхилення від заданого значення передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок зміни впливу на подачу води питної та спирту етилового 96% регулюючим органом (поз. 4в), що приводиться в дію за допомогою газоперетворювача концентрації спирту етилового 4б.

**П'ятий контур** передбачає автоматичний контроль і управління рівня рідини в осаджувальному реакторі. Рівень у даному апараті має регламентоване значення 825 л і контролюється датчиком рівня (поз. 5а). Спостереження за зміною відображається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) змін в архіві даних. Враховуючи те, що в реактор раніше був перекачений упарений розчин (концентрат) з попередньої технологічної установки, тому рівень рідини в апараті буде контролюватись подачею спирту етилового. В залежності від значення рівня регулюється подачею спирту етилового 75% охолодженого, зі збірника за допомогою регулюючого органу (поз. 5в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 5б. Після завершення процесу осадження утворена суспензія надходить за допомогою відцентрового насосу до наступної технологічної установки. подача рідини до насосу здійснюється за допомогою регулюючого органу (поз. 5в'), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 5б'.

**У шостому контурі** автоматичного контролю і управління температури під час осадження ферменту в осаджувальному реакторі. Температура в даному апараті має регламентоване значення 4°C і допустиме відхилення  $\pm 1$  °C. Температура у реакторі вимірюється датчиком температури (поз. 6а). У разі перевищення допустимого відхилення температури передбачається сигналізація на АРМі оператора. Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від температури відбувається управління подачею охолодженого розчину NaCl (розсол) у рубашку апарата регулюючим органом (поз. 6в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 6б. Зміни температури під час процесу відображаються і реєструються безперервно у часі на АРМі оператора.

**Сьомий контур** передбачає автоматичний контроль і регулювання швидкості перемішування утвореної суспензії в осаджувальному реакторі, яка приводиться в дію мотором (М2) і контролюється ж ним на заданому значенні. Швидкість обертів має регламентоване значення 150 об/хв і відхилення  $\pm 10$  об/хв. Частота обертів в реакторі (поз. 7а). Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога. Для регулювання швидкості обертів мішалки передбачається її стабілізація за рахунок впливу на частоту обертів мішалки і аварійною кнопкою «Стоп» по місцю.

**Восьмий і дев'ятий контури** автоматичного контролю і управління передбачає контроль увімкненого або вимкненого стану насосів. Управління здійснюється з АРМа оператора включенням-відключенням насосу, у ручному режимі управління шляхом включення-відключення насосу на щиту перетворювачів. Аварійне відключення насосу здійснюють шляхом натискання «Пуск» на моторах М3 та М4 відповідних насосів.

Схема автоматизації ділянки процесу осадження цільового продукту органічним розчинником наведена в додатку.

Специфікація засобів автоматизації представлена в *табл. 10.2*

## Специфікація засобів автоматизації

По-зи-ція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Виробник
1	2	3	4	5	6
1а, 5а	Рівень	В агрегатах	Магнітностракційний поплавковий датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 300-4000 мм, максимальна допустима температура +70 <sup>0</sup> С, аналоговий вихід [1]	NMT	KOBOLD Messring GmbH
1б, 5б, 5б'	Рівень	На щиті	Електропневмоперетворювач з сигналом 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа. Основна похибка 0,16% [2]	Dwyer серія 2700	СВ АльтерА
1в, 2в, 4в, 5в, 5в, 6в	-	По місцю	Пневматичний привід для управління заслінками та кранами. Керуючий сигнал 20...100 кПа. Кут повороту 90°. Клас точності – 1% [3]	KUP	Kobold
2а, 6а	Температура	В агрегатах	Датчик термоперетворювач опору ТСМ, діапазон від -20 до 50 °С, з уніфікованим вихідним сигналом 4...20 мА. Матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, градувальна характеристика Pt 100. Максимальний допустимий тиск 25 бар, клас точності – 0,10, приєднання G1/2 [4]	ТСМ- 1187	ТОВ НВФ «Стандарт М»
2б, 6б	Температура	На щиті	Електропневмоперетворювач з сигналом 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа. Основна похибка 0,16% [2]	Dwyer серія 2700	СВ АльтерА
3а, 7а	Частота обертів мішалки	На щиті	Частотний перетворювач для двигунів середньої потужності. Потужність 0.75кВт 1-ф/220 В, номінальний струм 4,2 В [5]	VFD007E L21A	Delta Electronics
4а	Концентрація етанолу	В агрегаті	Вибухозахищений стаціонарний газоаналізатор. Уніфікований вихідний аналоговий сигнал 4...20 мА. Діапазон вимірювання концентрації 0...100%. Абсолютна похибка 0,11%. Максимальний робочий тиск, 1,2кПа. Діапазон температури -30 до +45. Матеріал н/ж сталь тип 316 [6]	Vector ПГЕ- 903У	ООО «АналітТепло Контроль»

1	2	3	4	5	6
46	Концентрація етанолу	На щиті	Газоперетворювач вимірювання концентрації спирту етилового. Тип аналогового входу 4...20 мА [7]	ПГО-903У-етиловий спирт	ООО «АналитТепло Контроль»
KM1, KM2, KM3, KM4	Магнітний пускач	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм 7А, потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В [8]	3RT2015-1AP01	SIEMENS
SA1, SA2	-	На щиті	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією [9]	3SB3210-2DA11	SIEMENS
SB1, SB2, SB3, SB4, SB5, SB6	-	По місцю	Двоклавішна кнопка станція «Пуск-стоп», номінальна напруга 400 В [10]	8LP2T B7113	Lovato

**Примітка:** пошук та підбір приладів здійснювався за допомогою таких електронних джерел:

1. <https://www.kobold.com/Магнитострикционный-уровнемер-NMT>
2. <https://www.svaltera.ua/Електропневмопреобразитель-Dwyer>
3. <https://www.kobold.com/Пневматический-привод-KUP>
4. <http://standart-m.com.ua/kipia/termopreobrazovateli/termopreobrazovateli-soprotivleniya/termopreobrazovateli-soprotivleniya--tspm-1187/?mova=uk/Термопреобразователь>
5. <https://chastotnik.com.ua/Delta+Electronics-r-VFD007EL21A/Частотный-перетворювач>
6. [https://www.gazoanalizators.ru/gazoanalizatory-etanola.html/ Газоанализатор](https://www.gazoanalizators.ru/gazoanalizatory-etanola.html/)
7. [https://www.gazoanalizators.ru/Vector.html/Газопреобразитель-концентрации-спирта-этилового](https://www.gazoanalizators.ru/Vector.html/)
8. [https://www.siemens-pro.ru/3rt20/3rt2015/3RT2015-1AP01.html/Магнитный-пускатель](https://www.siemens-pro.ru/3rt20/3rt2015/3RT2015-1AP01.html/)
9. [https://www.tme.eu/ua/details/3sb3210-2da11/peremikachi-panelni-standartni-22mm/siemens/Перемикач-трёхпозиционный](https://www.tme.eu/ua/details/3sb3210-2da11/peremikachi-panelni-standartni-22mm/siemens/)
10. [https://svalterakr.prom.ua/p356995547-knopki-lovato-electric.html/ Кнопки Lovato electric](https://svalterakr.prom.ua/p356995547-knopki-lovato-electric.html/)

## Список використаної літератури:

1. Дехтяренко Н.В. Виробництво ферментних препаратів в Україні // Наукові вісті НТУУ «КПІ» . –2013. – № 3. – С. 48-58
2. Кузнецова Н.Н., Николаева Е.В., Винтер В.Г. Почвенные микроорганизмы – продуценты циклодекстрин-глюканотрансфераз // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2005. – Т. 147, № 2. – С 99-107.
3. Buschmann H.J., Schollmeyer E. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review // J. Cosmet. Sci. – 2002. – № 53. – P. 185-191.
4. Грачева И. М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Элевар, 2000. – 512 с.
5. Строева С.С. Выделение продуцента альфа-специфичной циклодекстринглюканотрансферазы из природных источников и разработка технологии ферментного препарата на его основе : Автореф. дис. ... канд. техн. наук : 05.18.10 / Моск. гос. ун-т пищевых пр-в (МГУПП). – Москва, 2006. - 26 с.
6. Чхан К.В. Улучшение вкусовых характеристик гликозидов стевии (*stevia rebaudiana bertonii*) методом ферментативной биотрансформации: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. - Москва, 2019. - 25 с.
7. Мильман П.Ю., Гильванова Е.А. Конструирование питательной среды для стабильного биосинтеза циклодекстрин-глюканотрансферазы *Paenibacillus ehimensis* IB-739 // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. – 2013. – № 3. – С. 26-29.
8. Goh K.M., Mahadi N.M, Hassan O.H, et al. Molecular modeling of a predominant  $\beta$ -CGTase G1 and analysis of ionic interaction in CGTase // Biotechnology. – 2008. – N 7. – P. 418–429.
9. Tonkova A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase // Enzyme Microb. Technol. – 1998. – N 22. – P. 678–686.
10. Капрельяну Л.В. Ферменты в пищевых технологиях. – Одесса: Монография, 2009. – 468 с

- 
11. *Qingsheng Q., Zimmermann W.* Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2005. – N 66. – P. 475–485.
  12. *Феродова П. Ю.* Биотехнология получения циклодекстринов полифракционного состава на основе продуцента *Paenibacillus ehimensis* IB-739: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2012. – 23 с.
  13. *Федорова П.Ю., Гильванова Е.А., Усанов Н.Г.* Сравнение кинетических свойств различных циклодекстрин-глюканотрансфераз // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* – 2011. – Т. 13, № 5. – С. 203-206.
  14. *Пирог Т. П.* Загальна мікробіологія // Підручник. – К.: НУХТ, – 2004. – 471 с.
  15. *Kuroshima K., Sakane T., Takata R.* *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolyticus* sp. nov., New Chitinolytic Members of the Genus *Bacillus* // *International journal of Systematic Bacteriology.* – 1996. – № 1. – P. 76-80.
  16. *Рафикова Г.Ф., Кузина Е.В., Логинов О.Н.* Токсикологическая оценка микроорганизма *Paenibacillus ehimensis* IB 739 и препарата Бациспектин БМ // *Экобиотех.* – 2018. – Т 1, № 2. – P. 63-70.
  17. *Lee J., Pyun Y., Bae K.* Transfer of *Bacillus ehimensis* and *Bacillus chitinolyticus* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus ehimensis* comb. nov. and *Paenibacillus chitinolyticus* comb. nov. // *International journal of Systematic Bacteriology.* – 2004. – № 54. – P. 929-933.
  18. *Мелентьев А.И., Логинов О.Н., Бойко Т.Ф.* Уникальный природный штамм *Paenibacillus ehimensis* IB-739 // *Материалы Международной научно-практической конференции (20–23 сентября 2017 г.) / БГУ, СКФУ, САФУ.* – 2017. – № 1. – С. 58-63.
  19. *Определитель бактерий Берги.* – 9-е изд. / Пер. под. ред. *Заварзина Г.А.* – М.: Мир. – 1997. – Т. 2. – 800 с.
  20. *Определитель бактерий Берги.* – 10-е изд. / Пер. под. ред. *Заварзина Г.А.* – М.: Мир. – 2005. – Т. 2. – 580 с.

- 
21. Рід *Paenibacillus* [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://lpsn.dsmz.de/genus/paenibacillus>
22. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Прикладная энзимология. - СПб: Университет ИТМО, 2019. – 160 с.
23. Ruizhi H., Jianghua L., Shin H.D., Rachel R.C., Du G., Li L., Chen J. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications // *Biotechnology Advances*. – 2014. – N 32. – P. 415–428.
24. Fernanda M. B., Sampaio C.M, Fernanda M., Roberto A., Monteiro G., Peralta M., Matioli G. Potential use of cyclodextrin-glycosyltransferase enzyme in bread-making and the development of gluten-free breads with pinion and corn flours // *Food Sci. Nut.* – 2015. – 66, N 3. – P. 275-281
25. Всеукраїнський аграрний журнал «Агро Еліта». – 2016. – 45, № 10. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://agroprod.biz/wp-content/uploads/2016/02/AE-2016-46-site-1.pdf>
26. Заставнюк Л.І., Придивус Л.О., Вайс О.В. Роль та значення цукрових замінників на вітчизняному ринку цукру // Глобальні та національні проблеми економіки. – 2015. – № 6. – С. 158-161
27. Власенко І., Власенко В. Виробництво продуктів спеціального призначення для хворих на цукровий діабет // Товари і ринки. – 2018. – 28, № 4. – С. 47-56.
28. Технологія вирощування стевії у відкритому ґрунті [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://steviasun.eu/ua/steviyas/83-technology-of-growing-stevia.html>
29. Абелян В.А., Балаян А.М., Кочикян В.Т., Маркосян А.А. Трансглюкозилирование стевіозида ЦГТ-азами різних груп мікроорганізмів // *Биолог. Журн. Армении*. – 2004. – 1-2, № 56. – С. 3-9
30. Быкова А.С., Ващенко Е.В. Общая микробиология. – Харьков: НТУ “ХПИ”, 2016. – 181 с.

---

31. *Зав'ялов В.Л., Зоткіна Л.В., Немирович П.М., та інші* Процеси і апарати біотехнологічних виробництв // Метод. рекомендації до вивч. дисц., викон. курс. і контр. робіт для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2012. – 98 с.

32. *Шульга Н.М.* Санітарія та гігієна: навч. посіб./ Н. М. Шульга, Л. А. Млечко. – К.: ПІДО НУХТ, 2011. – 34 с.

33. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та кашпроведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001 №502

34. СІР-мийка [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://promf.com/ua/food-equipment-ua/molochne-ua/list-sip-mojka-ua/1317-sip-mojka-2.html>

35. Сода кальцинированная (натрий углекислый, карбонат натрия) гост 5100-85 [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://www.plasma.com.ua/chemistry/chemistry/sodium\\_carbonate.html](http://www.plasma.com.ua/chemistry/chemistry/sodium_carbonate.html)

36. Кислотний засіб для СІР "Бланідас-А Ацид" (Blanidas-A Acid) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://blanidas.com.ua/blanidas-a-acid-201/>

37. Аквалін [Електронний ресурс] // Режим доступу: [http://kronos-agro.com.ua/ru/Products\\_RU/RU\\_Akvaklin/RU\\_Akvaklin.php](http://kronos-agro.com.ua/ru/Products_RU/RU_Akvaklin/RU_Akvaklin.php)

38. Дезінфектант БІОКООНТАКТ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agronet.ua/obyavlenie/id25199-preparat-kormoviy-biokatalizatorniy>

39. Дезекон ОМ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyushee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev>

40. Фермисепт средство для мытья и дезинфекции [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://profipius.in.ua/p772014975-fermisept-sredstvo-dlya.html>

41. СІР-станція [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.milk-system.com/produksiia/cip-stantsiia>

42. *Карлаш Ю.В.* Основи проектування біотехнологічних виробництв:

---

Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В. Карлаш – К.: НУХТ, 2013. – 143 с.

43. *Калунянц К.А.* Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с.

44. *Малежик І.* Процеси та апарати харчових виробництв. – К.: НУХТ, 2003. – 40 с.

45. Загальна мікробіологія промислових виробництв [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://globalnauka.com>

46. *Пирог Т.П., Антонюк М.М.* Загальна мікробіологія і вірусологія: Лаб. практикум. – К.: НУХТ, 2016. – 112 с.

47. Концентрування та висушування біопрепаратів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://moyaosvita.com.ua/biologija/koncentruvannya-ta-visushuvannya-biopreparativ/>.

48. Флотація. Принцип дії [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://zolotodb.ru/articles/metallurgy/factory/11335>.

49. Центрифугування. Характеристика процесу [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://chemworld.com.ua/index.php/klinichnabiokhimiia/59-tsentrifuguvannya>.

50. Сепарування. Характеристика процесу [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://elib.lutsk-ntu.com.ua/book/mbf/mlp/2012/12-59/page15.html>.

51. *Данилов І.П., Самойленко С.І.* Апарати мікробіологічної промисловості: Навч. посіб. – Харків: НТУ «ХП», 2008. – 272 с.

52. *Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П.* Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посіб. – К.: НУХТ, 2010. – 323 с.

53. *Хрокало Л. А., Чигиринець О. Е., Васькевич А. І.* Екологічна безпека технологічних процесів у харчовій та косметичній галузях: метод. реком. – К.: КП, 2016. – 40 с.

54. *Солона О.В., Білик Д.А.* Вібраційні млини для помелу сипких матеріалів сільськогосподарського виробництва // Вібрації в техніці та технологіях. – 2013. – 70, № 2. – С. 196-199

---

55. *Букін С.Л., Букіна А.С.* Нова конструкція бігармонійного вібротина для тонкого подрібнення різноманітних матеріалів // Підготовчі процеси збагачення. – 2015. – 91, № 50. – С. 60-65

56. Сучасна Упаковка - крафт-пакет «Дой-Пак» з металізацією [Електронний ресурс] // Режим доступу: [http://www.gerelo.dp.ua/index/packet\\_doy-pack.html](http://www.gerelo.dp.ua/index/packet_doy-pack.html)

57 *Новіцька О.В.* Практикум з біотехнологій у ветеринарній медицині (частина I) – Київ: НУБіП, 2014. – 91 с.

58 Переробка сміття і відходів в Україні [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://region-2001.com.ua/services/pererobka-vtorsirovini/pererobka-smittyta-vidkhod>

59. *Пирог Т. П., Пенчук Ю. М.* Технологія мікробного синтезу лікарських засобів // Метод. рекомендації до викон. курс. роботи для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. – К.: НУХТ. – 2015. – 59 с.

60. *Усанов Н. Г., Гильванова Е. А., Елизарьев П. А., Пруцакова Е. А.* Усовершенствованный метод фотометрического определения активности циклодекстрин-глюканотрансферазы // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 1. - С. 118-124.

61. *Lang Q., Yin L., Shi J., Li L.* Co-immobilization of glucoamylase and glucose oxidase for electrochemical sequential enzyme electrode for starch biosensor and biofuel cell // Biosens Bioelectron. – 2014. – Vol. 51. – P. 158-163.

62. *Латунина Л. С., Каманин С. С., Арлянов В. А.* Ферментные биосенсоры для определения глюкозы, молочной кислоты и крахмала на основе модифицированных печатных электродов // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2017. – Т. 1. – С. 67-76.

63. *Хромова Н.Ю.* Біотехнологічна конверсія зернової сировини для отримання пробіотичних продуктів і кормових білкових добавок: дис. на здобуття наук. ступеня канд. техн. наук: спец. 03.01.06 – «Біотехнологія» (в тому числі нанобіотехнологія) / Н.Ю. Хромова. - Москва, 2019. - 167 с.

---

64. Вологомір сипучих матеріалів WALCOM ТК-100 [Електронний ресурс]  
// Режим доступу: <https://simvolt.ua/vologomr-sipuchih-materalv-walcom-tk-100.html>

65. *Корнієнко І.М.* Контроль та керування біотехнологічними процесами: посіб. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 104 с.

66. *Гончаренко Б.М., Осадчий С.І., Віхрова Л.Г. та інші* Автоматизація виробничих процесів. –Кіровоград: Видавець - Лисенко В.Ф. –2016. – 352 с.

**Перелік публікацій, за період навчання на бакалавраті**

**Стаття у матеріалах міжнародної конференції в Україні:**

1. *Бондарчук В.І.* Отримання циклодекстрин-глюканотрансферази за допомогою мікроорганізмів // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої пам'яті академіка УАН О.І. Тихонова «Застосування методів лікування і апіпрепаратів у медичній, фармацевтичній та косметичній практиці» (м. Харків, 25 березня 2020 р.). – С. 66-70.

**Тези у збірниках міжнародних та всеукраїнських конференцій:**

1. *Бондарук С.В., Бондарчук В.І., Кернер А.О.* Порівняльний аналіз вмісту вітаміну С у свіжих та термічно оброблених продуктах харчування // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Майбутній науковець – 2017» (м. Сєверодонецьк, 1 грудня 2017 р.). – С. 34-37.

2. *Бондарук С.В., Бондарчук В.І., Кернер А.О.* Дослідження ефективності методів дезинфекції поверхні рук // Матеріали 84 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (м. Київ, НУХТ, 23-24 квітня 2018 р.). – Ч.1. – С. 471.

3. *Бондарчук В., Стефанюк Б., Мисюра Т., Зав'ялов В.* Використання ефекту Марангоні для інтенсифікації процесу абсорбції в умовах культивування мікроорганізмів // Матеріали 84 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (м. Київ, НУХТ, 23-24 квітня 2018 р.). – Ч.2. – С. 182.

4. *Бондарчук В., Зварич А.* Нові напрями у створенні лікарських форм згідно з концепцією біофармації // Матеріали 84 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (м. Київ, НУХТ, 23-24 квітня 2018 р.). – Ч.2. – С. 444.

5. *Подольнчук В., Чорний В., Бондарчук В., Стефанюк Б., Зав'ялов В., Мисюра Т.* Дослідження кінетики екстрагування розчинних речовин з рослинної сировини та математичний опис процесу // Матеріали 85 Ювілейної Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (м. Київ, НУХТ, 11-12 квітня 2019 р.). – Ч.2. – С. 152.

6. *Бондарчук В.* Аналіз продуцентів для промислового біосинтезу ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази // Матеріали 86 Міжнародної

наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 2-3 квітня 2020 р.). – Ч.1. – С. 373.

7. *Бондарчук В.* Циклодекстрин-глюканотрансфераза – унікальний фермент в біотехнології // Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 2-3 квітня 2020 р.). – Ч.1. – С. 398.

#### **ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВМІСТУ ВІТАМІНУ С У СВІЖИХ ТА ТЕРМІЧНО ОБРОБЛЕНИХ ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ**

Бондарук С. В., Бондарчук В. І., Кернер А. О., БТ-П-1  
Красінько В. О., доцент, кандидат технічних наук  
*Національний університет харчових технологій*

Для нормальної життєдіяльності людини до раціону обов'язково мають входити продукти, які повністю забезпечуватимуть необхідними вітамінами організм. Одним із таких вітамінів є аскорбінова кислота.

#### *Природничі науки*

Вітаміни – це органічні біологічно активні речовини, необхідні у невеликих кількостях для забезпечення нормального перебігу біохімічних і фізіологічних процесів в організмах тварин, людини і деяких рослин.[1]

Вітамін С – аскорбінова кислота, яка є фактором захисту організму від наслідків стресу. Аскорбінова кислота посилює стійкість до інфекцій, зменшує ефект дії різних алергенів. Цей вітамін використовують для лікування і профілактики авітамінозів (цинга), гіповітамінозів, простуд, тощо. При незначному зниженні кількості аскорбінової кислоти спостерігається швидка стомлюваність, загальна слабкість, частіше виникає до вечора, помітне зниження апетиту, іноді носові кровотечі. Через те, що стінки дрібних судин (капілярів) стають більш крихкими, відзначається безпричинна поява синців, тобто вони з'являються навіть при натисканні пальцем на шкірний покрив[2,3].

Цей вітамін погано зберігається в навколишньому середовищі, швидко руйнується при підвищенні температури і під впливом ультрафіолетових променів. Саме тому важливо пам'ятати, що свіжі продукти в результаті зберігання або приготування дуже швидко втрачають вітамін С.

Вміст вітаміну С в деяких харчових продуктах (в мг на 100 г)

Гарбуз - 8

Капуста білокачанна –40

Капуста квашена– 20

Капуста цвітна - 75

Картопля лежала - 10

Картоплясвіжозібрана – 25

Накопичення вітаміну С в овочевих рослинах суттєво залежить від місця вирощування. Умови посухи і високих температур зменшують його вміст в овочах. Інколи навіть удвічі. В тепличних овочах вміст вітаміну С на третину менше, ніж із відкритого ґрунту. Після збирання врожаю починається процес втрати овочами аскорбінової кислоти [4,5].

Організм людини не може пасати вітамін С, тому необхідно постійно отримувати його екзогенно. Для отримання максимальної кількості вітаміну із продуктів потрібно обрати спосіб приготування, за яких втрата аскорбінової кислоти буде мінімальною. Вітамін С дуже чутливий до високої температури. Значна частина його руйнується у процесі термічної обробки овочів, особливо при варінні. Цікаво, що при доступі кисню під

час кулінарної обробки втрати аскорбінової кислоти перевищують вдвічі кількість цього вітаміну, який піддавався термічній обробці без доступу кисню. Крім того, в лужному середовищі вітамін С руйнується швидше, ніж у кислому. Відомий і той факт, що чим довше вариться продукт, тим більше втрати вітаміну С. Вітамін С руйнується в присутності іонів заліза і міді, тому краще використовувати посуд, який не буде вступати у реакцію із продуктами – емальоване та скляне приладдя. Дуже швидко руйнується аскорбінова кислота при контакті з аскорбіноксілазою і аскорбіназою. Це ферменти, які містять деякі рослини. Так, наприклад, сік кабачків втрачає до 90% аскорбінової кислоти, а сік капусти більше 50% вже через 20 хвилин при температурі в 30 градусів. Саме ця температура найбільш сприятлива для негативного впливу зазначених вище ферментів. Але в киплячій воді ці ферменти втрачають свою активність. Тому при варінні, в цілях збереження якомога більше вітаміну С, необхідно закладати овочі у вже киплячу воду. Непогано зберігається вітамін С при солінні і маринуванні. При заморожуванні аскорбінова кислота не руйнується, але при відтаванні втрачається більша її частина. Для цього вітаміну існує пряма залежність між його вмістом та ступенем подрібнення: чим дрібніше ми ріжемо овочі, тим активніше діє антивітамін С і швидше руйнується аскорбінова кислота [4,5,6].

### Природничі науки

**Об'єктами досліджень** були свіжі, заморожені, термічно оброблені (зварені і приготовлені на пару) зразки картоплі, гарбуза, капусти.

**Предметом досліджень** було визначення кількості вітаміну С у дослідних зразках. **Результати та обговорення.** Для перевірки зміни кількості аскорбінової кислоти було обрано чотири способи приготування, якими найчастіше користуються українці: приготування на пару, варіння, вживання свіжих овочів та використання заморожених продуктів. Для визначення кількості аскорбінової кислоти користувалися стандартним методом титрування з використанням 0,0005 М розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу [7].

**Варіння.** Для приготування використовували емальовану каструлю, щоб складові продуктів не вступали у взаємодію із металом посуду. Усі овочі додавали одразу у киплячу воду та накривали кришкою для максимального збереження вітамінів. Воду не солили, готували до повного приготування (залежить від кількості продукту та об'єму посуду).

**Приготування на пару.** Для цього способу була використана пароварка із нержавіючої сталі, даний посуд був обраний за популярністю придбання. Овочі не солили, готували до повного приготування.

Далі готові продукти охолоджували при кімнатній температурі та перевіряли вміст аскорбінової кислоти.

**Морожені продукти.** Овочі помістили у відділ морозильної камери, що призначений для зберігання фруктів та овочів. Через тиждень визначали вміст вітаміну С.

Дані щодо порівнянні вмісту вітаміну С у гарбузі, картоплі та капусті, які були замороженими та термічно оброблені наведено у таблиці.

Таблиця

Вигляд Овоч	Заморожені	Варені	На пару
Гарбуз	7,9	2,3	4,5
Капуста	21,1	1,4	13,55
Картопля	7,5	7,04	7,2

Найбільший вміст аскорбінової кислоти був у капусті, але при варінні вона втратила 90% вмісту вітаміну С. Тому можна сказати, що це підтверджує той факт, що в капусті присутні аскорбіноксілаза і аскорбіназа. У капусті яка була приготована на пару вміст вітаміну зменшився лише на 35 %. Отже, найкраще вживати свіжу капусту. Для забезпечення добової потреби організму потрібно 200 г капусти. Картопля зазнала найменших втрат вітаміну при термічній обробці: за умови приготування на пару – 4%, у процесі варіння – 6%. Але для забезпечення добової потреби вітаміну потрібно 1000 г вареної картоплі. Для гарбузу втрати вітаміну С при приготуванні на пару становлять 43%, а для звареного – 70%. Для забезпечення добової потреби потрібно 1800 г приготованого на пару або 3500 г звареного.

**Висновок:** Отже, для забезпечення організму людини вітаміном С найкраще вживати сирі овочі. Термічно оброблені овочі не зможуть забезпечити добову потребу у вітаміні С. Також варто пам'ятати, що потреба у вітаміні С збільшується у період захворювання. Список використаної літератури:

1. Левандовський Л.В., В.Г.Дрюк, О.І. Семенова та ін. Біологічна хімія. - К.: НУХТ, 2012. – 363 с.
2. Тырсин Ю.А., Кролевец А.А., Чижик А.С. Витамины и витаминоподобные вещества. – М.: ДеЛи плюс, 2012.- 203с.

3. Вісник здоров'я. «Вітамін С функції в організмі людини» / [Електронний ресурс] . – Режим доступу : <http://vashaibolit.com.ua>
4. Романовський В.Є., Сінькова Е.А., Вітаміни і вітамінотерапія. Серія "Медицина для вас". - Ростов на Дону: "Фенікс", 2000. - 320 с.
5. Гармонія овочевої краси та користі. — К: Арістей, 2005. — 192 с. / [Електронний ресурс] . – Режим доступу : [http://www.agromage.com/stat\\_id.php?id=355](http://www.agromage.com/stat_id.php?id=355)
6. Як зберегти вітамін С в овочах . / [Електронний ресурс] . – Режим доступу : <http://kakotvet.com>
7. Салюк А.І., Котинський А.В., Семенова О.І., Бублієнко Н.О. Біохімія: Лабораторний практикум для студентів технологічних спеціальностей денної форми навчання. - К.: НУХТ, 2011. – 61с.

#### 4. Дослідження ефективності методів дезінфекції поверхні рук

**Світлана Бондарук, Валерія Бондарчук, Аліна Кернер**  
*Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна*

**Вступ.** Актуальність даної теми полягає в важливості запобігання поширенню таких захворювань як дизентерія, черевний тиф та гепатит методом профілактики розвитку шкідливих бактерій на поверхні рук.

**Матеріали і методи.** Проводили дослідження ефективності найбільш популярних побутових засобів для дезінфекції: вологих антибактеріальних серветок, антисептика для рук та мила. Крім того, як метод дезінфекції поверхні рук, було використано фен для створення умов сушіння рук у громадському місці. Посів мікроорганізмів з поверхні рук до та після обробки здійснювали методом поверхневих штрихів. Для посівів використовували чашки Петрі з МПА (для визначення загального мікробного забруднення) та з середовищем Ендо (для виявлення бактерій групи кишкової палички). Якісний та кількісний склад мікробіоти визначали стандартними методами мікроскопічного дослідження.

**Результати.** На руках, які не були очищені жодним засобом, на середовищі МПА було виявлено більше 1000 колоній мікроорганізмів: більшість – кокових бактерій та одна колонія мікроміцетів.

Аналіз мікробіоти поверхні рук, які були очищені антисептичним гелем, виявив більше 100 колоній на середовищі МПА та 4 колонії на середовищі Ендо, переважна кількість колоній кокових бактерій, також було виявлено грибку колонію.

Мікробіота рук, що були очищені найтрадиційнішим методом – з використанням мила та рушника, була представлена бактеріями та мікроміцетами. Загальна кількість колоній на МПА становила 100.

Непоганий дезінфікуючий ефект спостерігали за використання вологої серветки для очищення рук. На середовищі МПА виявлено 6 колоній кокових бактерій світло-коричневого кольору та 2 колонії паличкоподібних бактерій блідо-жовтого (тілесного) кольору.

Найкращий результат був від дезінфекції рук в умовах, наближених до умов очищення рук у громадських місцях: знайдено три білі колонії кокових бактерій на середовищі МПА. На середовищі Ендо жодної колонії не виявлено.

**Висновки.** Результати досліджень свідчать про ефективне зниження загальної обнаєненості мікроорганізмами поверхні рук за використання популярних та доступних побутових дезінфікуючих засобів. Найкращим способом очищенням рук виявлено використання мила та просушуючих приладів.

## 8. Використання ефекту Марангоні для інтенсифікації процесу абсорбції в умовах культивування мікроорганізмів

Валерія Бондарчук, Богдан Стефанюк,  
Тарас Мисюра, Володимир Зав'ялов

*Національний університет харчових технологій, Київ, Україна*

**Вступ.** Конструювання апаратів з перемішувальними пристроями завжди було пов'язано з пошуком нових способів та форм забезпечення ефективної взаємодії фаз В останні роки в багатьох галузях хімічної промисловості отримав обґрунтоване застосування як основний, або супутній спосіб прискорення міжфазової взаємодії, що заснований на використанні так званого ефекту Марангоні.

**Матеріали і методи.** Лабораторна турбінна мішалка, контрольний комбінований прилад КЛ-115, самописний потенціометр, цифровий частотомір, тахометр, водяний розчин сульфату натрію  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1 моль/л (3...4 мл розчину на 1 л рідини), етанол. Непрямий метод десорбції середовища з використанням полярографічного мембранного датчика розчиненого кисню.

**Результати.** Досліди виконувались на лабораторній турбінній мішалці відкритого типу з відбивними перегородками. Оцінювання ефективності абсорбції під час комбінованої дії на робочу систему турбулентних потоків рідини, генерованих перемішувальним пристроєм та ефекту Марангоні за рахунок змінення поверхневого натягу ПАР здійснювалось за розробленою методикою з розрахунком просторово-часових характеристик процесу. У модельну рідину (воду) додавали розчин сульфату натрію для видалення розчиненого кисню і далі встановлювався певний режим перемішування, визначений частотою обертання мішалки. Такий фіксований режим забезпечував самоаерацію робочого середовища. Для встановлення дії на абсорбцію кисню ефекту Марангоні додавалась певна кількість етанолу. Реєстрація концентрації розчиненого кисню здійснювалась за допомогою датчика розчиненого кисню за побудованою S-подібною кривою насичення, що описується моделлю  $\ln[(C_p - C_1)/(C_p - C_2)] = K_v(\tau_2 - \tau_1)$ , де  $C_1$  і  $C_2$  — відповідно концентрації кисню в рідині, що відповідають моментам часу  $\tau_1$  і  $\tau_2$ . Інерційність датчика, зумовлену наявністю мембрани та перехідними процесами у вимірювальній системі, здійснювали визначенням його розбіжної характеристики. За тангенсом кута нахилу прямої  $\ln(C_p - C) = f(\tau)$ , що характеризує швидкість зміни одиничного явища сорбції кисню, визначали час релаксації процесу, оберненою величиною до якого є об'ємний коефіцієнт масопередачі  $K_v$ . Для різних гідродинамічних режимів роботи мішалки будувались відповідні графіки та розраховувався  $K_v$ . Було

встановлено, що при всіх рівних умовах роботи апарата вищі фізичні абсорбційні характеристики були для умов з перемішування робочого середовища з додаванням ПАР.

**Висновки.** Отримані результати свідчать, що швидкість міжфазової взаємодії у дослідній газорідній системі обумовлюється інтенсивністю турбулентних локальних пульсацій, генерованих перемішувальним пристроєм на границі поділу фаз та зміною поверхневого натягу бульбашок повітря, що призводить до їх руйнації та утворення нових поверхонь контакту фаз. Цей факт був підтверджений розрахованими об'ємними коефіцієнтами масопередачі.

#### **Література.**

1. Бейли Дж. Основы биохимической инженерии / Дж. Бейли, Д. Оллис. пер. с англ. в 2-х частях. // М.: Мир, 1989. — Ч 1. — 692 с.

182

### **11. Нові напрями у створенні лікарських форм згідно з концепцією біофармації.**

**Валерія Бондарчук, Анна Зварич**

*Національний університет харчових технологій, Київ, Україна*

#### **Вступ**

Серед актуальних завдань фармацевтичної хімії згідно концепції біофармації є не тільки пошук нових лікарських речовин, але й удосконалення існуючих лікарських препаратів, створення нових лікарських форм, зокрема з пролонгованим вивільненням активної речовини. Аналіз літературних даних свідчить, що на сучасному етапі важливим є пошук нових механізмів вивільнення та доставки лікарської речовини до ураженого органу, що дозволить підвищити терапевтичну ефективність та безпечність лікування.

#### **Матеріали та методи**

Об'єктом досліджень є нові лікарські форми пролонгованої дії. Проаналізовані наукові джерела за останні 20 років, що стосуються створення нових лікарських форм з урахуванням положень біофармації.

#### **Результати**

Більшість дослідників, що працюють в галузі біофармації, починаючи з її засновників G. Levy и D. Wagner, вважають, що для успіху фармакотерапії головним є вивчення складних взаємовідносин між лікарським засобом як фізико-хімічною системою та організмом людини як складною біологічною системою. Біологічна активність будь-якої лікарської речовини обумовлена її хімічною будовою і фізико-хімічними властивостями. Проте фармакологічний ефект суттєво залежить також від властивостей, що надані в результаті спрямованих технологічних процесів при виготовленні ліків. На сучасному фармацевтичному ринку більше 25 % ліків складають препарати з поліпшеною системою доставки [1]. Як правило провідні фармацевтичні фірми створюють нові лікарські засоби, що мають системи доставки безпосередньо до хворого органу. Такі препарати дозволяють створювати в хворому органі терапевтичну концентрацію лікарської речовини і рівномірно підтримувати її протягом тривалого часу. Традиційні лікарські форми поступаються місцем сучасним лікарським препаратам та системам доставки лікарських засобів, зокрема найбільш перспективними є системи на основі біодеградабельних полімерів, міцел, мікрокапсул, ліпосом, карбонових наночастинок. Активно розробляються також іммобілізовані препарати, системи з програмованим вивільненням лікарської речовини (системи з активною дифузиею, зворотнім відгуком) тощо.

## Висновок

Таким чином, біофармація перейшла на новий рівень свого розвитку – вона пропонує не тільки методологією у дослідженнях та виробництві нових лікарських препаратів, а практичні напрацювання у створенні нових лікарських форм, що дозволяє одержати інноваційні лікарські препарати з оптимальними характеристиками ефективності та безпеки.

## Література

1. Соснов А.В., Иванов Р.В., Балакин К.В., Шоболов Д.Л., Федотов Ю.А., Калмыков Ю.М. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц. *Качественная клиническая практика*. 2008. № 2. С. 4-12.

444

### 5. Дослідження кінетики екстрагування розчинних речовин з рослинної сировини та математичний опис процесу

**Валентин Подолянчук, Валентин Чорний, Валерія Бондарук, Богдан Стефанюк,  
Володимир Зав'ялов, Тарас Мисюра**  
*Національний університет харчових технологій*

**Вступ.** Основною стадією виробництва фітопрепаратів є екстрагування рослинної сировини, обумовлене загальними законами масопередачі, властивостями рослинної клітини й фізико-хімічною спорідненістю екстрагенту й речовин, що вилучаються. При цьому, конструювання екстракційної апаратури завжди було пов'язано з пошуком нових способів та форм забезпечення ефективної взаємодії фаз, але для малотонажного фармацевтичного виробництва зазвичай використовують періодичні методи екстрагування, але чіткого наукового обґрунтування вибраного способу немає. Тому нами зроблена спроба порівняти ефективність таких періодичних процесів (мацерація, перколяція, дегерування, настоювання) та виконати їх єдиний математичний опис.

**Матеріали і методи.** Лабораторний ротаційний випарювач, апарат Сокслета, перколятор, рефрактометр; теорії: масопередачі, оновлення поверхні фазової взаємодії; типові методики визначення якісних показників екстрактів. Оброблення експериментальних даних та розрахунки виконувались із застосуванням інтегрованих систем MathCAD, OriginPro 8.6.

**Результати.** Для досліджень використовувалась шипшина, липа, безсмертник і овес, які є поширеними на території України. Як екстрагент використовувалась вода. Співвідношення твердої фази та рідини становило 1:20 для всіх чотирьох видів сировини, температурний діапазон від 50 до 80 °С. Результати показали, що з підвищенням температури вміст розчинних сухих речовин в екстрагенті для плодів шипшини збільшується до 3,2 %, до 4,0 % для липи, до 4,0 % для безсмертнику та до 2,7% для вівса. Встановлено, що для усіх видів сировини після 76 °С не відбувається збільшення вмісту розчинних сухих речовин в екстрактах. Слід зазначити, що рівноважний стан настає після 100 хвилин при температурі 80 °С. При однакових умовах процесу безсмертник та квіти липи мають кращі екстракційні властивості. Мацерацію проводили при температурі 70 °С протягом двох діб. Тривалість процесу, великі втрати екстрагенту, неповне вилучення РСР, та низька якість екстрагенту відмічається як недолік методу. Перколяція виконувалась при температурі 70 °С з попереднім настоюванням в екстрагенті (4 год). При цьому, переважною була можливість максимального вилучення РСР при незначних витратах екстрагенту та часу на процес. Екстрагування в апараті Сокслета виконувалось на дистильованій воді при температурі 70° С з відбором відпрацьованої пари у вигляді конденсату в

екстрактор. Результати дослідів узагальнювались екстракційними кривими, їх аналізом та математичним описом процесу з врахуванням основних положень теорії оновлення поверхні контакту фаз, що надавало можливість глибше осмислити і проаналізувати закономірності масообміну в умовах твердофазного екстрагування.

**Висновки.** Отримані результати свідчать про більшу інтенсивність зовнішнього масообміну на користь перколятора, в якому створюються умови відносного руху фаз. Цей факт підтверджує теорію оновлення поверхні контакту фаз за рахунок створення відповідних умов конвективної дифузії. Також вирішальну роль в процесі масопередачі відіграє не загальна, а заново утворена поверхня контакту фаз. Отримана математична модель перевірена на адекватність.

**86 International scientific conference of young scientist and students**  
"Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution", April 2–3, 2020.  
Book of abstract. Part 1. NUFT, Kyiv.

### **6. Аналіз продуцентів для промислового біосинтезу ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази**

**Валерія Бондарчук**

*Національний університет харчових технологій, Київ, Україна*

**Вступ.** Циклодекстрин-глюканотрансфераза (ЦГТ-аза) – унікальний фермент мікробного походження, що каталізує реакцію міжмолекулярного трансглікозилювання, під час якої утворюються циклодекстрини (ЦД), що широко використовуються у промисловості [1].

**Матеріали і методи.** Проаналізовано та узагальнено літературні дані, щодо перспективних продуцентів ферменту ЦГТ-ази з використанням пошукових систем Google Scholar, PubMed.

**Результати та обговорення.** ЦГТ-аза – це фермент, який отримується шляхом мікробного синтезу, так як хімічний синтез ферменту є достатньо вартісним. У літературі порівняно небагато даних про продуцентів ЦГТ-ази та особливості біосинтезу цього ферменту. До теперішнього моменту ЦГТ-аза з різними властивостями виявлена у ґрунтових мікроорганізмів різних родів *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Micrococcus*, *Thermoanaerobacter* та інші. Ці продуценти ЦГТ-аз відносяться до груп мезофільних, термофільних або алкалофільних бактерій. Але є інформація, що продуцентами ЦГТ-ази можуть бути *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus varians*. Проте, так як на сьогодні представники роду *Paenibacillus* є широко відомі та найбільш вивчені бактеріальні продуценти позаклітинної ЦГТ-ази, тоді охарактеризуємо наступні: *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* DF 9R та *Paenibacillus ehimensis* IB-739. В ході порівняння продуцентів особлива увага приділялась активності ферменту, яку вони здатні синтезувати. Перші два продукували даний фермент всього з активністю 1,61 од/мл та 1,47 од/мл культуральної рідини відповідно. Також росли на досить дорогих поживних середовищах (ПС), ціна за 1 л ПС коливається в районі 21 грн/л [1]. В той час як *P. ehimensis* IB-739 продукував фермент з найвищою, серед порівнюваних організмів, активністю, а саме: 3,75 од/мл, а ціна за 1 л ПС становила всього 7,85 грн, що майже у три рази дешевше, ніж у двох попередніх продуцентів. *P. ehimensis* IB-739 також синтезує фермент ЦГТ-азу широкої специфічності, яка ініціює перетворення крохмалю до сумішей придатних для одночасного синтезу трьох ЦД [2].

**Висновки.** Таким чином більш перспективним та економічно вигідним продуцентом для промислового біосинтезу ферменту ЦГТ-ази є *P. ehimensis* IB-739, так як дані бактерії ростуть на відносно дешевому та простому ПС (крохмаль як джерело вуглецю) і синтезують фермент з досить високою ферментативною активністю.

#### Література

1. Кузнецова Н.Н., Николаева Е.В., Винтер В.Г. (2005), Почвенные микроорганизмы – продуценты циклодекстрин-глюканотрансфераз, *Ученые записки Казанского государственного университета*, 147 (2), с. 99-107.
2. Мильман П.Ю., Гильванова Е.А. (2013), Конструирование питательной среды для стабильного биосинтеза циклодекстрин-глюканотрансферазы *Paenibacillus ehimensis* IB-739, *Известия Уфимского научного центра РАН*, 3, с. 26-29.

373

**Матеріали** 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", 2–3 квітня 2020 р. – Київ: НУХТ. – Ч.1.

### 31. Циклодекстрин-глюканотрансфераза – унікальний фермент в біотехнології

**Валерія Бондарчук**

*Національний університет харчових технологій, Київ, Україна*

**Вступ.** Фермент циклодекстрин-глюканотрансфераза (ЦГТ-аза) використовують у медицині, реакціях трансглікозилюванні вуглеводів та у випічці безглютенових хлібів.

**Матеріали і методи.** Узагальнено літературні дані, щодо практичного використання ферменту ЦГТ-ази в біотехнології.

**Результати та обговорення.** На сьогодні наукові відкриття в області ензимології зробили ферментні препарати невід'ємним компонентом багатьох харчових технологій. На відміну від більшості каталізаторів неорганічної природи, ферменти володіють більш високою ефективністю і специфічністю дії. ЦГТ-аза як біокаталізатор має певні застосування, пов'язані з його каталітичними реакціями. Загалом даний фермент використовують у виробництві циклодекстринів (циклічні невідновлювальні олігосахариди), що в подальшому використовуються у фармацевтичній промисловості для покращення розчинності лікарських засобів та біодоступності. При включенні в комплекс β-циклодекстрину з валідолом усувається специфічний запах препарату, підвищується його стабільність. Зокрема фермент циклодекстрин-глюканотрансфераза також відіграє важливу роль у поліпшенні властивостей вуглеводів за допомогою реакції трансглікозилювання. Наприклад, ЦГТ-аза каталізує глікозилювання стевіозиду після чого зменшується його післясмакова гіркота та збільшується розчинність. При дії ферменту на неогесперидин утворювалась його глікозильована форма (моноглікозид неогесперидину), розчинність у воді якої стала у 1500 разів більшою, а гіркота зменшилась приблизно у 10 разів, на відміну від неглікозильованої форми [1]. Даний фермент знайшов своє використання також у випічці безглютенового хліба, який є альтернативою людей, що хворіють на целиакію (непереносимість глютену). ЦГТ-аза розкладає крохмаль борошна, отриманого з різних джерел, до циклодекстринів (ЦД) за допомогою реакції циклізації. При додаванні ферменту до борошна, яке далі використовувалось при випічці безглютенових хлібів, інтенсифікувався процес приготування тіста й поліпшення якості хліба – об'єму (збільшується) та структури (м'якший і пухкіший). Так спостерігалось збільшення об'єму безглютенових хлібів з ЦГТ-азою на 11% порівняно з контрольним зразком [2].

**Висновки.** Отже, наведені літературні дані свідчать, що ЦГТ-аза є досить перспективним ферментом, який використовують у різних сферах.

#### Література

1. Han R., Li J., Shin H.D., Chen R.R., Du G., Li L., Chen J. (2014), Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications, *Biotechnology Advances*, 32, p. 415-428.
2. Fernanda M.B., Sampaio C.M, Fernanda M., Roberto A., Monteiro G., Peralta M., Matioli G. (2015), Potential use of cyclodextrin-glycosyltransferase enzyme in bread-making and the development of gluten-free breads with pinion and corn flours, *Food Sci. Nut.*, 66 (3), p. 275-281.

398

### Отримання циклодекстрин-глюканотрансферази за допомогою мікроорганізмів

**Бондарчук В.І.**

*Кафедра біотехнології і мікробіології*

*Національний університет харчових технологій*

*miss.bondar4yk@gmail.com*

Все більше використання ферментів дозволяє підвищувати швидкість технологічних процесів, відчутно збільшувати вихід готової продукції, покращувати її якість і знижувати кількість відходів. Зокрема фермент циклодекстрин-глюканотрансфераза (ЦГТ-аза) знайшов своє використання у такому напрямку як трансглікозилювання стевіозиду, тим самим підвищуючи його розчинність і усуваючи залишкову гіркоту та післямак. Він широко використовується у технології випічки безглютенового хліба, тим самим покращуючи якості хліба – об'єм та структуру, а також пришвидшуючи сам процес приготування випічки. ЦГТ-аза – це фермент, який отримується шляхом мікробного синтезу, так як його хімічний синтез – достатньо вартісний, тому постає актуальним питання, щодо пошуку перспективного продуцента даного ферменту [4].

Вперше ЦГТ-аза був отриманий від *Bacillus macerans* у 1974 році. До теперішнього моменту ЦГТ-аза з різними властивостями виявлена у ґрунтових мікроорганізмів різних родів *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Micrococcus*, *Thermoanaerobacter* та інші. Ці продуценти ЦГТ-аз відносяться до груп мезофільних, термофільних або алкалофільних бактерій. В результаті подальших досліджень ЦГТ-аза вперше була ідентифікована у галофільних споруутворюючих бацил і термоактноміцетів [2].

**Матеріали і методи** Проаналізовано та узагальнено літературні дані, щодо перспективних продуцентів ферменту ЦГТ-ази з використанням пошукових систем Google Scholar, PubMed.

## Результати та їх обговорення

Так як найчастіше використовували бактеріальні штами роду *Bacillus*, *Paenibacillus* як джерело ферменту ЦГТ-ази, то для порівняння візьмемо: *Paenibacillus ehimensis* IB-739, *Bacillus megaterium*, а також розглянемо алкалофільного представника - *Bacillus circulans* B-65, який здатний також продукувати даний фермент. Культивування – проводиться в інтервалі температур 30 – 39°C. Це пов'язано з тим, що дана температура є оптимальною для синтезу циклодекстрин-глюканотрансферази.

66

Показник рН у двох порівнюваних мікроорганізмів коливається в діапазоні від близько нейтрального до слабо лужного – 6,0-8,0, проте також наявний і алкалофільний мікроорганізм рН якого становить 9,2.

Характеристика продуцентів та особливості їх культивування представлені у табл. 1.

Таблиця 1

### Порівняльна характеристика продуцентів ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази

Склад поживного середовища (г/л)	Особливості культивування	Активність ферменту (Е) та його молекулярна маса (ММ)	Джерело
<i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739			
Крохмаль - 10; Пептон - 5; Дріжджовий екстракт - 4; КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> - 1; СаСО <sub>3</sub> - 1.	t = 37-39°C рН = 7,0-7,2 Перемішування 180 об/хв □ = 72 год	Е=3,75 од/мл ММ=75 кДа	[3]
<i>Bacillus circulans</i> B-65			
Розчинений крохмаль - 10; Пептон - 5; Дріжджовий екстракт - 5; К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> - 1; MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O - 0,2; Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> - 10.	t = 37°C рН = 9,2 Перемішування 200 об/хв □ = 96 год	Е=0,6 од/мл ММ=70 кДа	[5]
<i>Bacillus megaterium</i>			
Картопляний екстракт - 100 мл; Кукурудзяний екстракт - 5;	t = 37°C; рН = 7,5; Перемішування 200 об/хв □ = 72 год	Е=1,61 од/мл ММ=70 кДа	[1]

При порівнянні активності ферментів найвищою серед усіх зазначених була у *Paenibacillus ehimensis* IB-739, а саме: 3,75 од/мл, що у 2,3 рази більша ніж у *Bacillus megaterium* (1,61 од/мл) та у 6,25 разів більша ніж у *Bacillus circulans* B-65 (0,6 од/мл).

Важливим показником є також тривалість культивування. Він дає змогу скоротити витрати ресурсів електроенергії і докладається менше робочої сили.

Біосинтез циклодекстрин-глюканотрансферази за допомогою *Bacillus circulans* B-65 є найдовшим, а саме: 96 год, що економічно не вигідно порівняно з 72 годинами культивування інших порівнюваних продуцентів.

Для росту культури і біосинтезу ферменту ЦГТ-ази джерелом вуглецю в основному служать крохмаль, декстрини, зернові та бобові культури. Джерелами азоту

Проаналізувавши табл. 2. можна бачити, що ціна за 1 л поживного середовища для *Paenibacillus ehimensis* IB-739 в три рази дешевша ніж у *Bacillus megaterium* і лише на 1,50 грн від *Bacillus circulans* B-65. Це вказує на те, що отримання ЦГТ-ази за допомогою *Paenibacillus ehimensis* IB-739 на поживному середовищі наступного складу табл. 2. буде доцільніше з економічної точки зору.

Враховуючи попередні критерії порівняння процентів ЦГТ-ази, для більшого обсягу аналізу варто визначити вартість 1 одиниці активності ферменту, яка наведена в табл. 3.

При розрахунках найнижчою становила *Paenibacillus ehimensis* IB-739, а саме: 0,002 грн/од, що близько в 12,7% дешевше ніж вартість одиниці активності у *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* B-65.

Таблиця 3

**Вартість 1 од. цільового продукту – циклодекстрин-глюканотрансферази**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн.	Активність ЦГТ-ази, ОА*/л	Вартість 1 од. ЦГТ-ази грн/ОА	Тривалість культивування, год
<i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739	7,85	3750	0,002	72
<i>Bacillus megaterium</i>	25,57	1610	0,0158	72
<i>Bacillus circulans</i> B-65	9,3	600	0,0155	96

Примітка: ОА\* - одиниця активності (ферменту)

Також *Paenibacillus ehimensis* IB-739 синтезує фермент циклодекстрин-глюканотрансферазу широкої специфічності, яка ініціює перетворення крохмалю до сумішей придатних для одночасного синтезу трьох ЦД на відміну від інших. Таким чином більш перспективним та економічно вигідним продуцентом для промислового біосинтезу ферменту ЦГТ-ази є *P.ehimensis* IB-739, так як синтезує фермент з досить високою ферментативною активністю (3,75 од/мл) при рості на середовищі простому за складом, основним компонентом якого є крохмаль, не потребує титрувальних агентів і при найменших витратах на процес біосинтезу з усіх порівнюваних нами продуцентів.

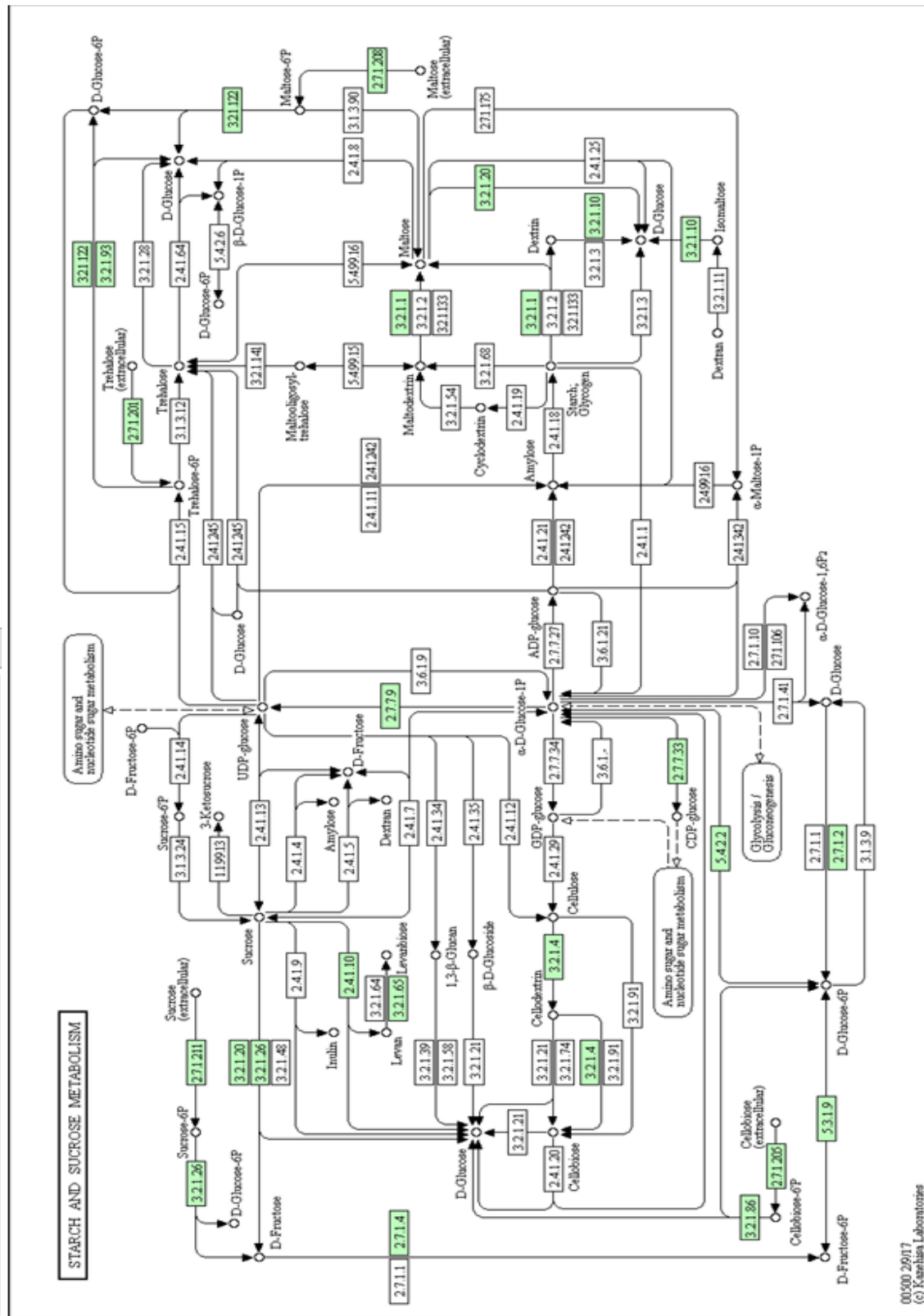
**Висновки**

Отже, здійснивши різноплановий аналіз продуцентів ферменту ЦГТ-ази за допомогою мікроорганізмів, можна стверджувати, що *P.ehimensis* IB-739 переважає інших порівнюваних нами ферментів у всіх проаналізованих показниках і є найбільш кращим промисловим продуцентом ЦГТ-ази.

Схеми з бази KEGG трансформації ростового субстрату в цільовий продукт

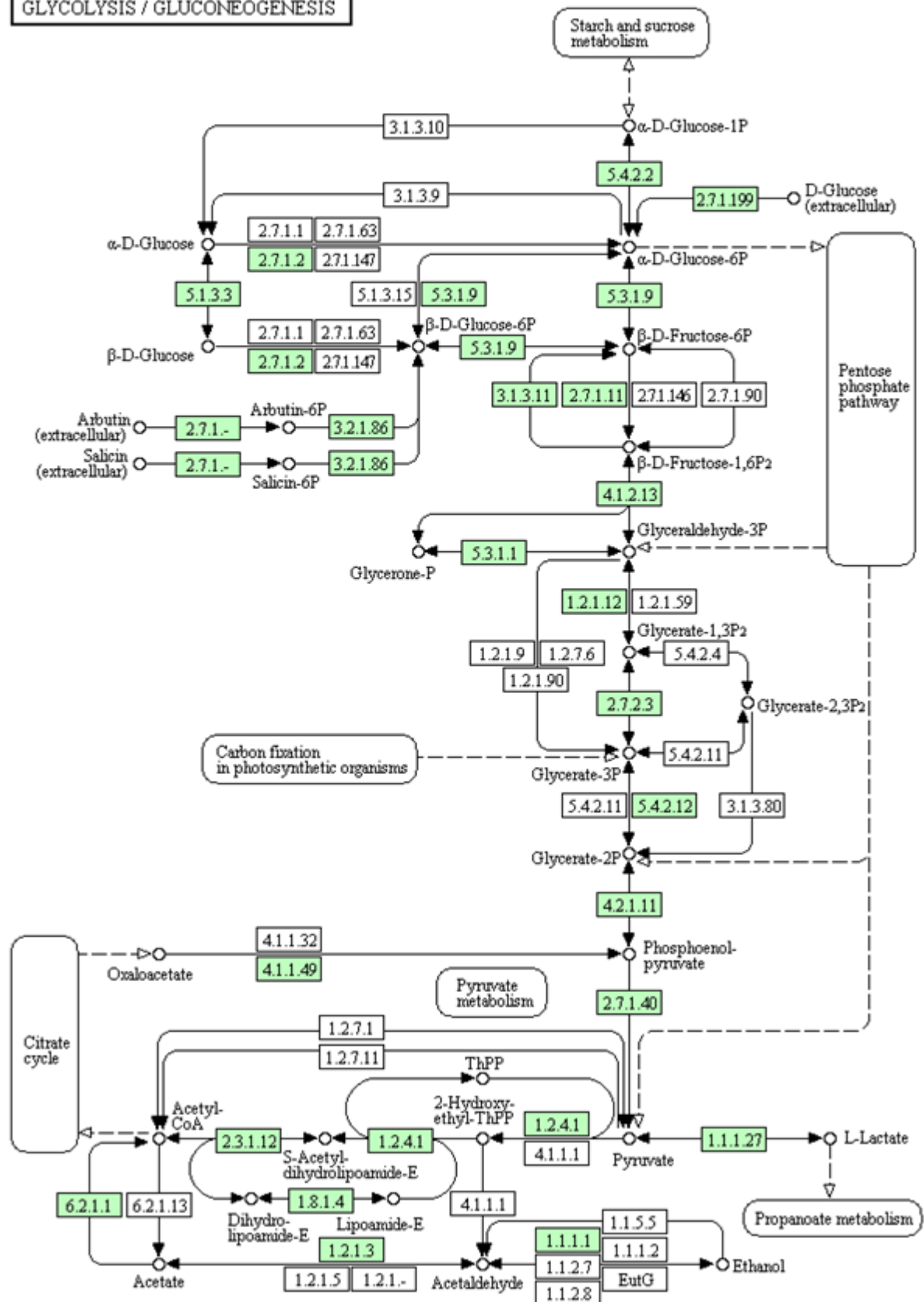
**KEGG** Starch and sucrose metabolism - *Bacillus amyloliquefaciens* CC178

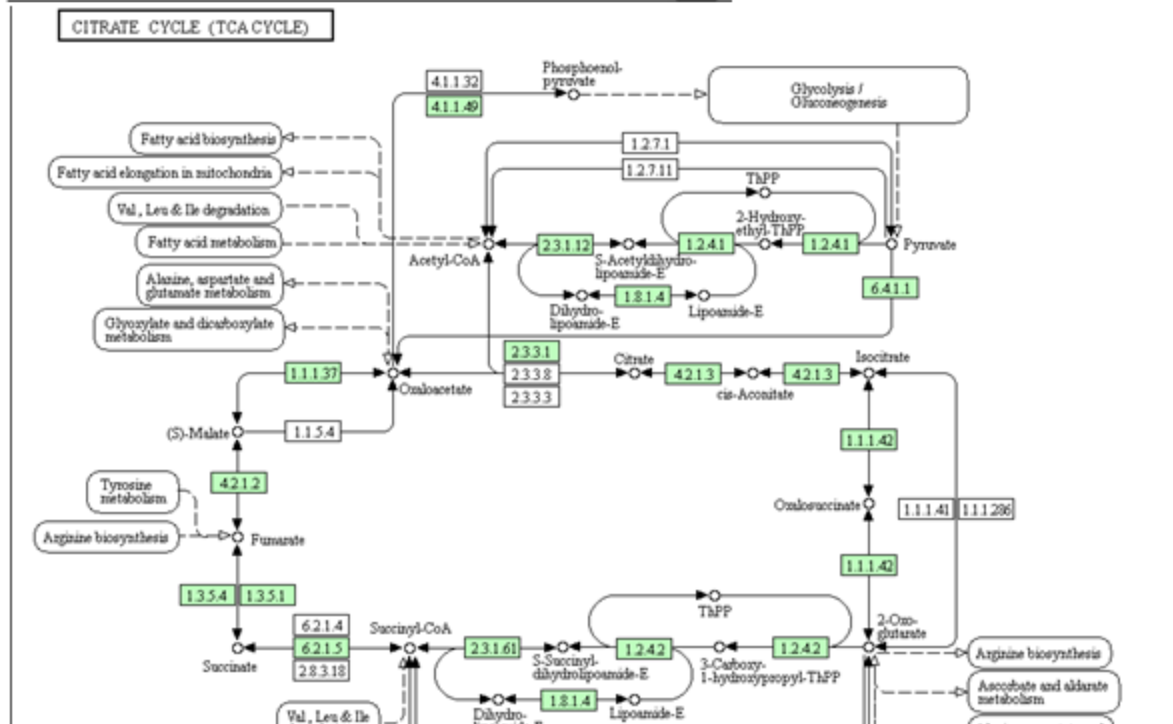
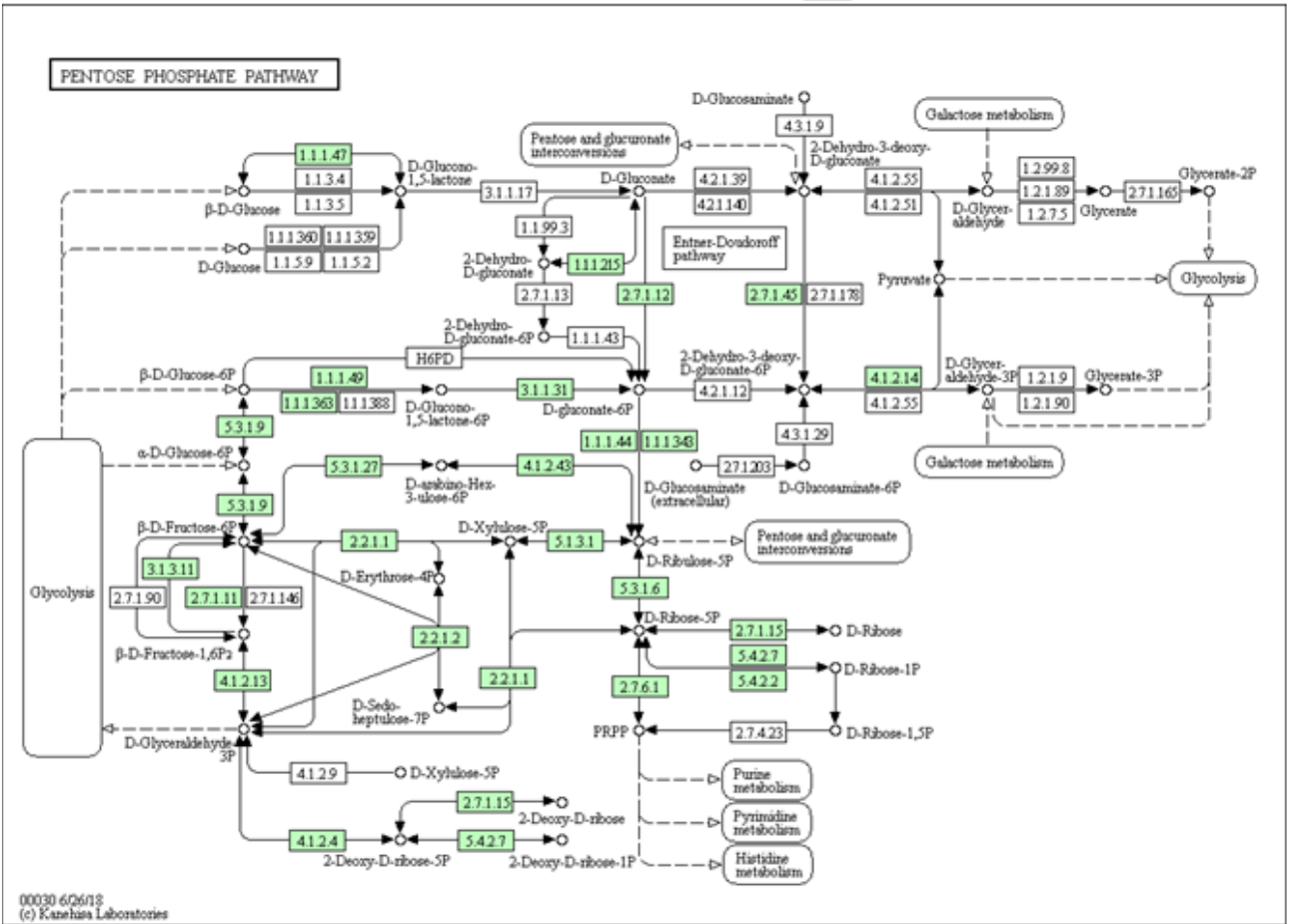
[ Pathway menu | Organism menu | Pathway entry | Download KEGML | User data mapping ]  
*Bacillus amyloliquefaciens* CC178

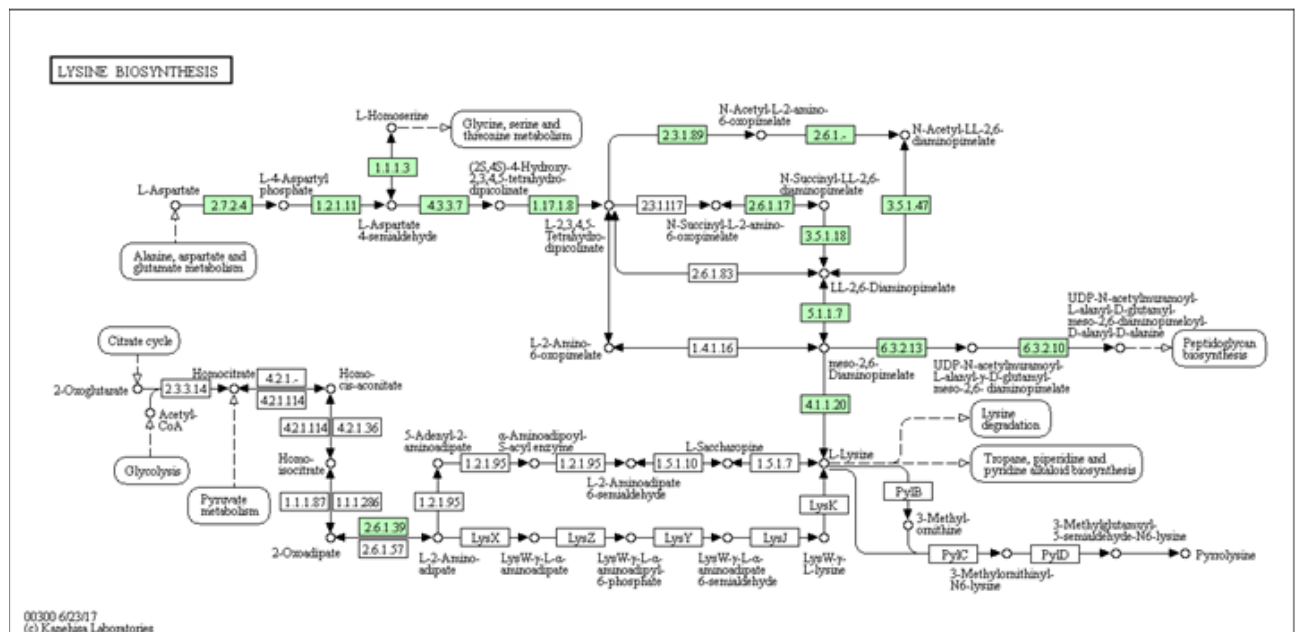
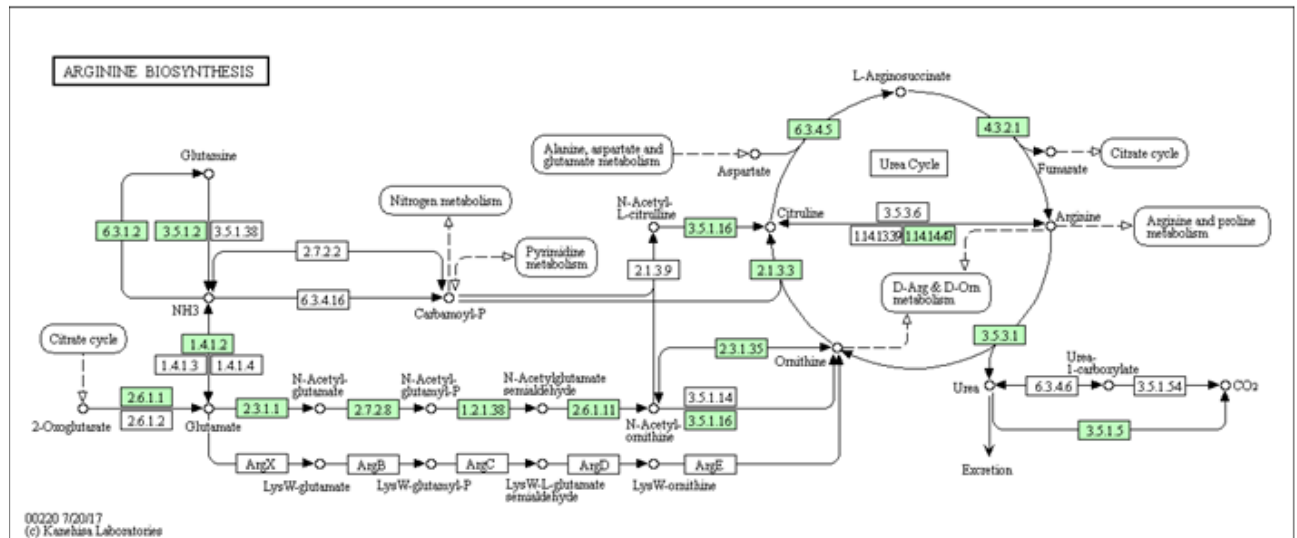


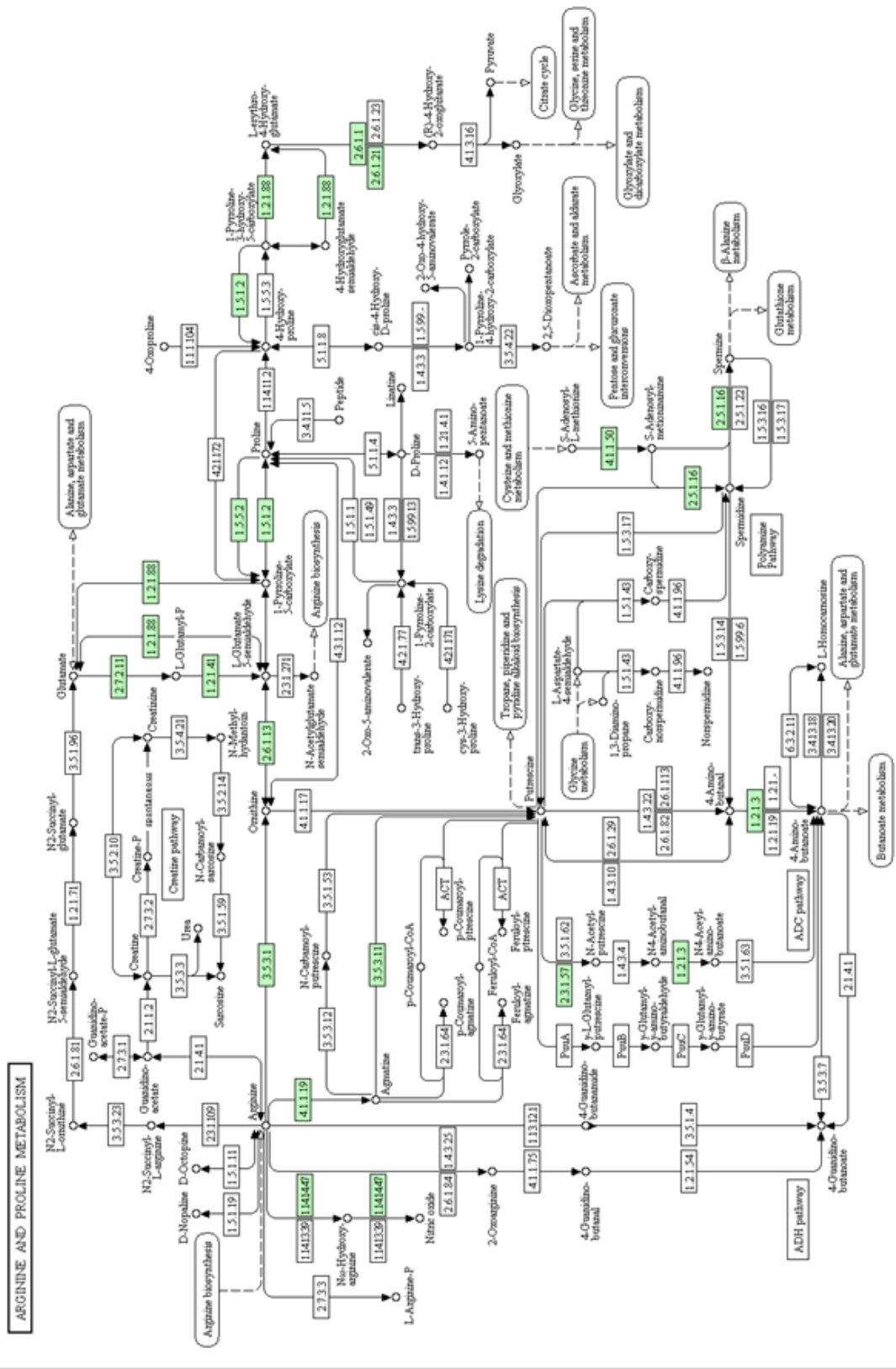
00000 29017  
 © Kazusa Laboratories

GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS

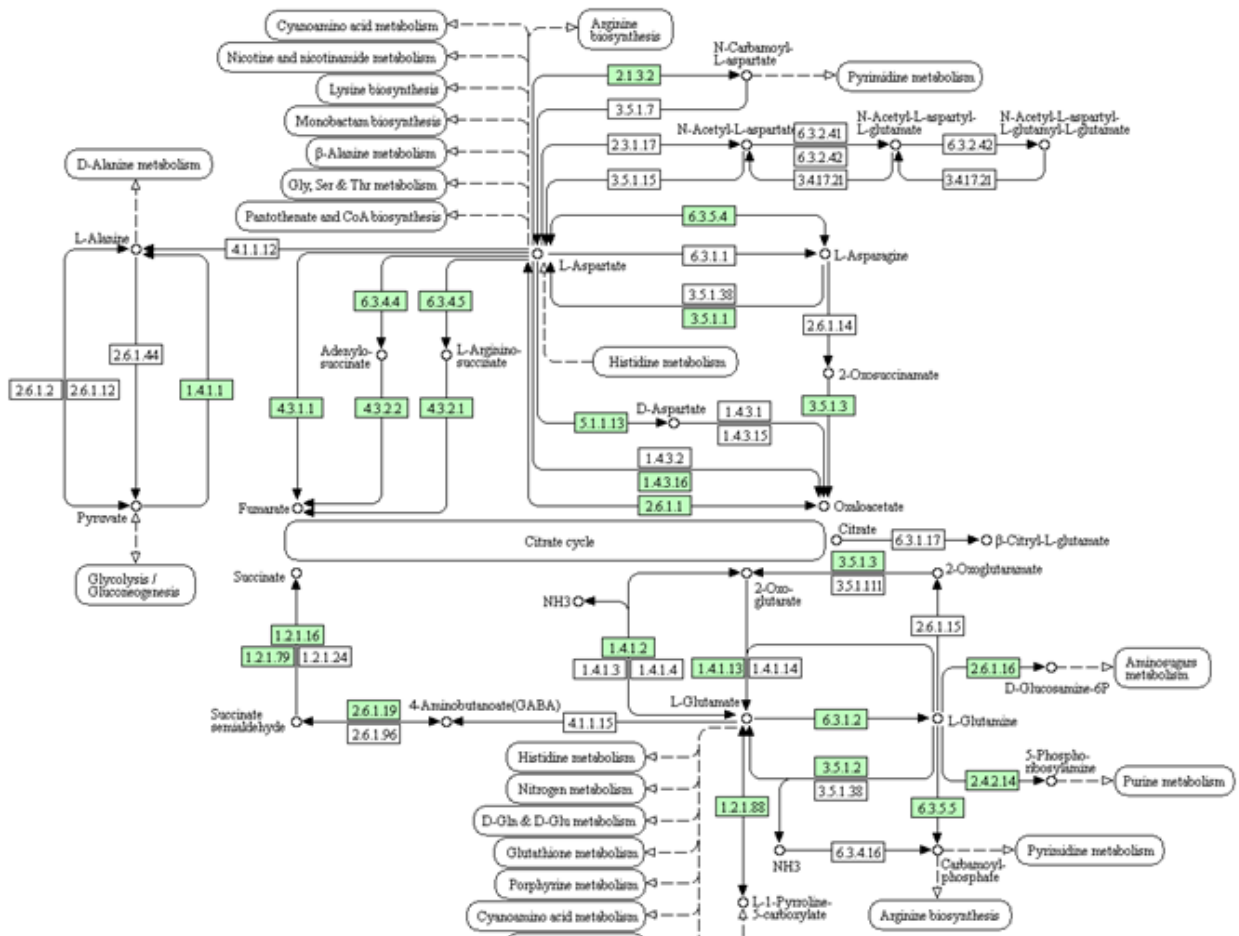


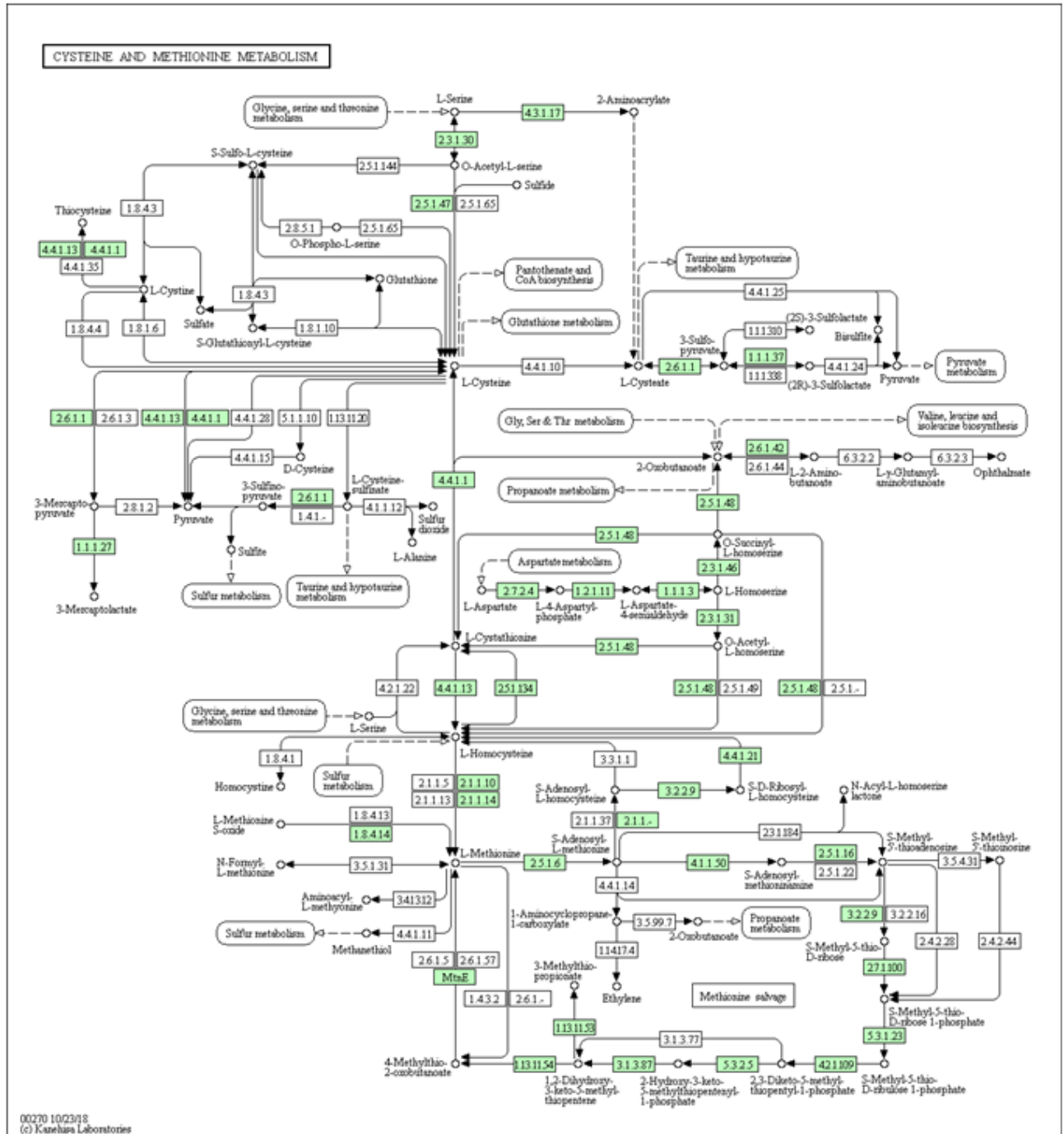






ALANINE, ASPARTATE AND GLUTAMATE METABOLISM



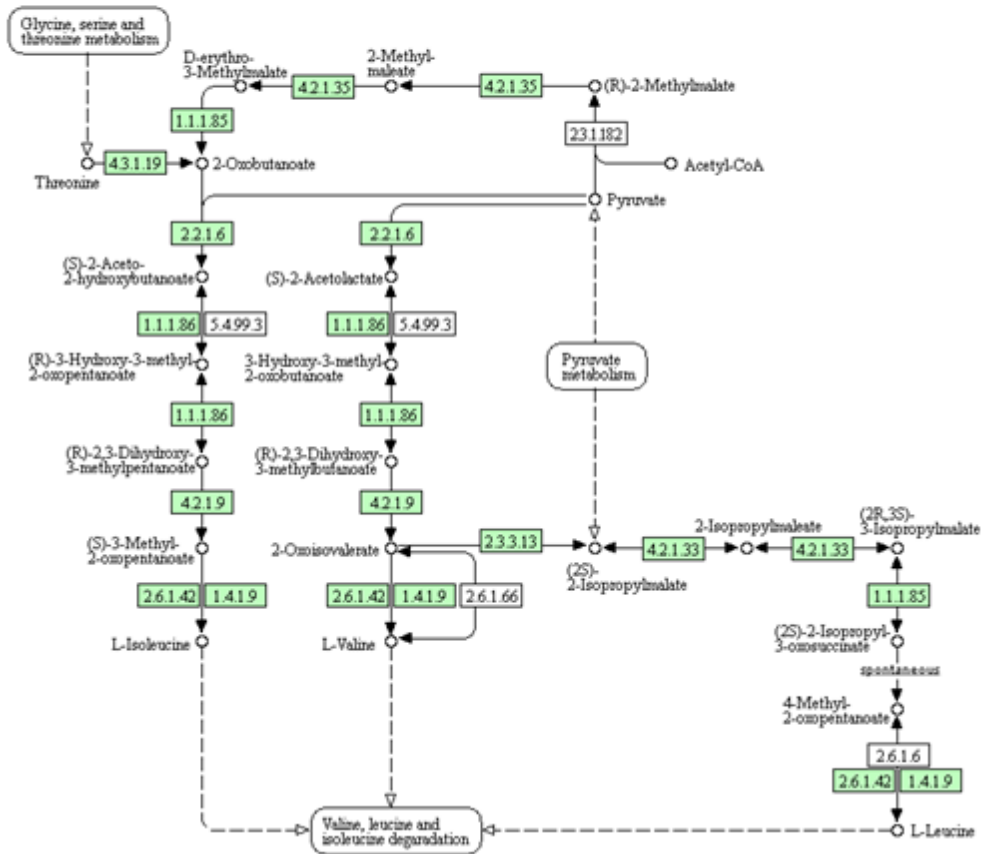


**KEGG Valine, leucine and isoleucine biosynthesis - Bacillus amyloliquefaciens CC178**

[ Pathway menu | Organism menu | Pathway entry | Download KGML | User data mapping ]

Bacillus amyloliquefaciens CC178 Go 100%

**VALINE, LEUCINE AND ISOLEUCINE BIOSYNTHESIS**

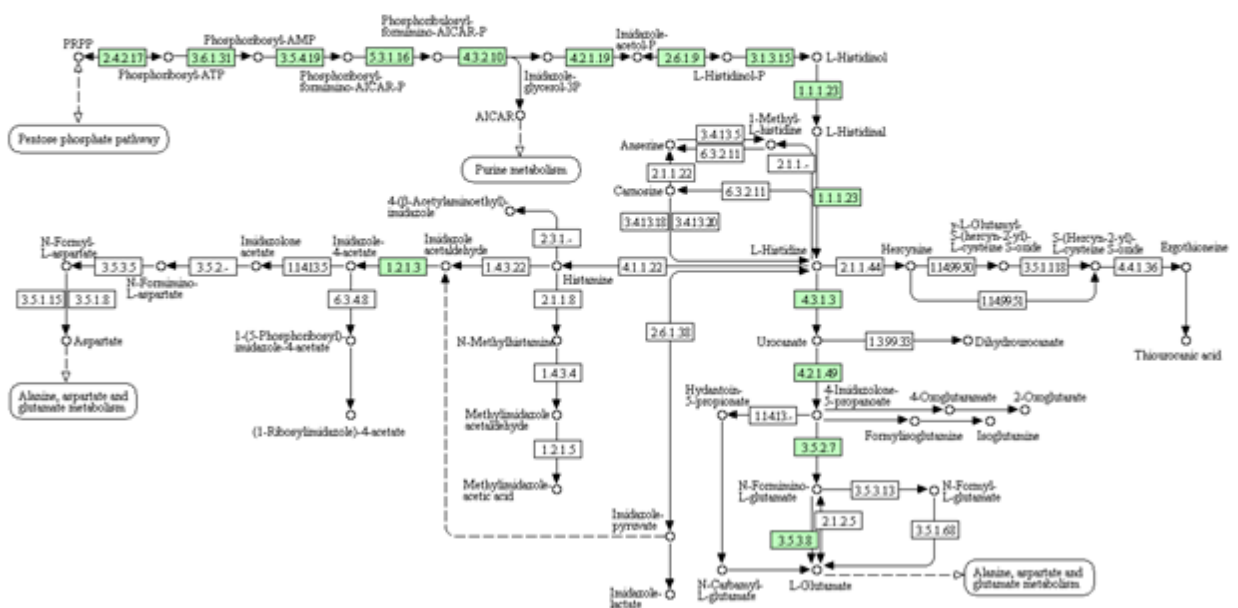


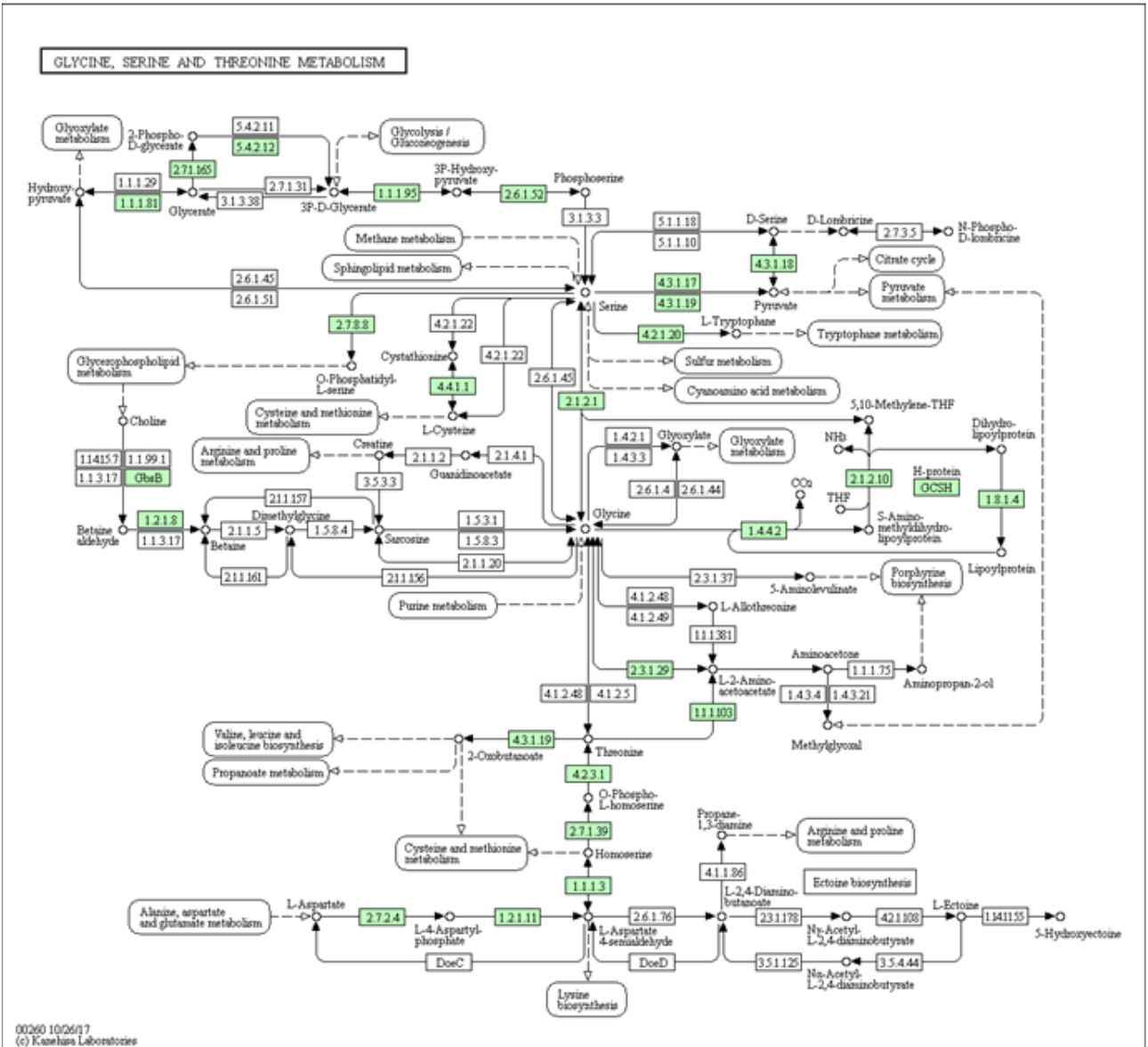
**KEGG Histidine metabolism - Bacillus amyloliquefaciens CC178**

[ Pathway menu | Organism menu | Pathway entry | Download KGML | User data mapping ]

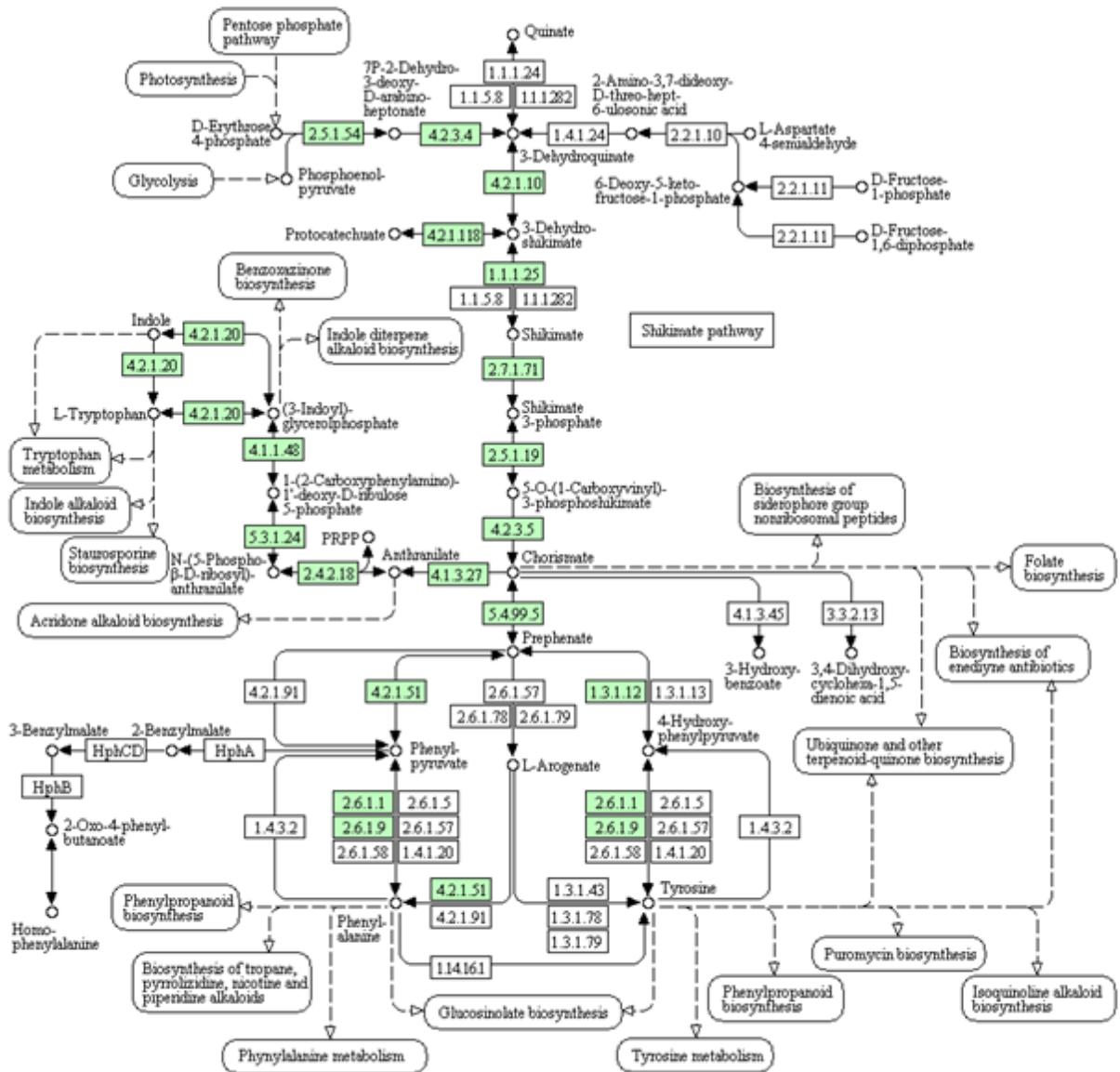
Bacillus amyloliquefaciens CC178 Go

**HISTIDINE METABOLISM**





PHENYLALANINE, TYROSINE AND TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS



**Перелік ферментів:**

1. –  $\alpha$ -амілаза (КФ.3.2.1.1);
- 2 – оліго-1,6-глюкозидаза (КФ.3.2.1.10)
3. - глюкокіназа (КФ 2.7.1.2)
4. - глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9)
5. - 6-фосфофруктокіназа I (КФ 2.7.1.11)
6. - фруктозодифосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13)
7. - тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1)
8. - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12)
9. - фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3)
10. - фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12)
11. - енолаза (КФ 4.2.1.11)
12. - піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)
13. - піруватдегідрогеназа E1 компонент  $\alpha$ -субодиниця (КФ 1.2.4.1)
14. - дигідроліпоамід ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.12)
15. - цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1)
16. - аконітат гідратаза (КФ 4.2.1.3)
17. - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42)
18. - 2-оксоглутарат дегідрогеназа E1 (КФ 1.2.4.2)
19. - 2-оксоглутарат дегідрогеназа E2 (КФ 2.3.1.61)
20. - сукциніл-КоА синтетаза  $\beta$ -субодиниця (КФ 6.2.1.5)
21. - сукцинат дегідрогеназа (КФ 1.3.5.4, КФ 1.3.5.1)
22. - фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2)
23. - малат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.37)
24. - глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9)
25. - глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.49, КФ 1.1.1.363)
26. - 6-фосфоглюконолактоназа (КФ 3.1.1.31)
27. - 6-фосфоглюконат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.44, КФ 1.1.1.343)
28. - рибозо-5-фосфат ізомераза B (КФ 5.3.1.6)
29. - рибозо-фосфат пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1)
30. - АТФ фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.17)
31. - фосфорибозил-АТФ пірофосфоригідролаза (КФ 3.6.1.31)
32. - фосфорибозил-АТФ пірофосфоригідролаза (КФ 3.5.4.19)
33. - фосфорибозилформіно-5-аміноімідазол карбоксамід риботид ізомераза (КФ 5.3.1.16)
34. - імідазолгліцерол-фосфат синтаза субодиниця HisF (КФ 4.3.2.10)
35. - імідазолгліцерол-фосфат дегідратаза (КФ 4.2.1.19)
36. - гістидинол-фосфат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9)
37. - гістидинол-фосфат (КФ 3.1.3.15)
38. - гістидинол дегідрогеназа (КФ 1.1.1.23)
39. - рибулозо-фосфат-3-епімераза (КФ 5.1.3.1)

- 
40. - транскетолаза (КФ 2.2.1.1)
  41. - трансальдолаза (КФ 2.2.1.2)
  42. - 3-деокси-7-фосфогептулонат синтаза (КФ 2.5.1.54)
  43. - 3-дегідрохінат синтаза (КФ 4.2.3.4)
  44. - 3-дегідрохінат дегідратаза I (КФ 4.2.1.10)
  45. - шикімат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.25)
  46. - шикімат кіназа (КФ 2.7.1.71)
  47. - 3-фосфошикімат-1 карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19)
  48. - хоризмат синтаза (КФ 4.2.3.5)
  49. - антранілат синтаза компонент I (КФ 4.1.3.27)
  50. - антранілат фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18)
  51. - фосфорибозилантранілат ізомераза (КФ 5.3.1.24)
  52. - індол-3-гліцерол фосфат синтаза (КФ 4.1.1.48)
  53. - триптофан синтаза  $\alpha$ -субодиниця (КФ 4.2.1.20)
  54. - хоризмат мутаза (КФ 5.4.99.5)
  55. - префенат дегідратаза (КФ 4.2.1.51)
  56. - гістидиномл-фосфат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9)
  57. - префенат дегідрогеназа (КФ 1.3.1.12)
  58. - аланін дегідрогеназа (КФ 1.4.1.1)
  59. - ацетолактат синтаза I/III мала субодиниця (КФ 2.2.1.6)
  60. - кетол-кислота редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86)
  61. - дигідрокси-кислота дегідратаза (КФ 4.2.1.9)
  62. - лейцин дегідрогеназа (КФ 1.4.1.9)
  63. - амінотрансферази амінокислот з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42)
  64. - 2-ізопропілмалат синтаза (КФ 2.3.3.13)
  65. - ізопропілмалат ізомераза мала субодиниця (КФ 4.2.1.33)
  66. - 3-ізопропілмалат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.85)
  67. - глутамат синтаза  $\beta$ -субодиниця (КФ 1.4.1.13)
  68. - глутамін синтетаза (КФ 6.3.1.2)
  69. - глутамат-5-кіназа (КФ 2.7.2.11)
  70. - глутамат-5-напівальдегід дегідрогеназа (КФ 1.2.1.41)
  71. - піролін-5-карбоксилат редуктаза (КФ 1.5.1.2)
  72. - глутамат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.1)
  73. - ацетилглутамат кіназа (КФ 2.7.2.8)
  74. - N-ацетил- $\gamma$ -глутаміл-фосфат редуктаза (КФ 1.2.1.38)
  75. - ацетилорнітин амінотрансфераза (КФ 2.6.1.11)
  76. - ацетилорнітин деацетилаза (КФ 3.5.1.16)
  77. - орнітин карбамаїлтрансфераза (КФ 2.1.3.3)
  78. - нітрик-оксид синтаза (КФ 1.14.14.47)
  79. - аспаргат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.1)
  80. - аспарагін синтаза (КФ 6.3.5.4)
  81. - аспаргат кіназа (КФ 2.7.2.4)

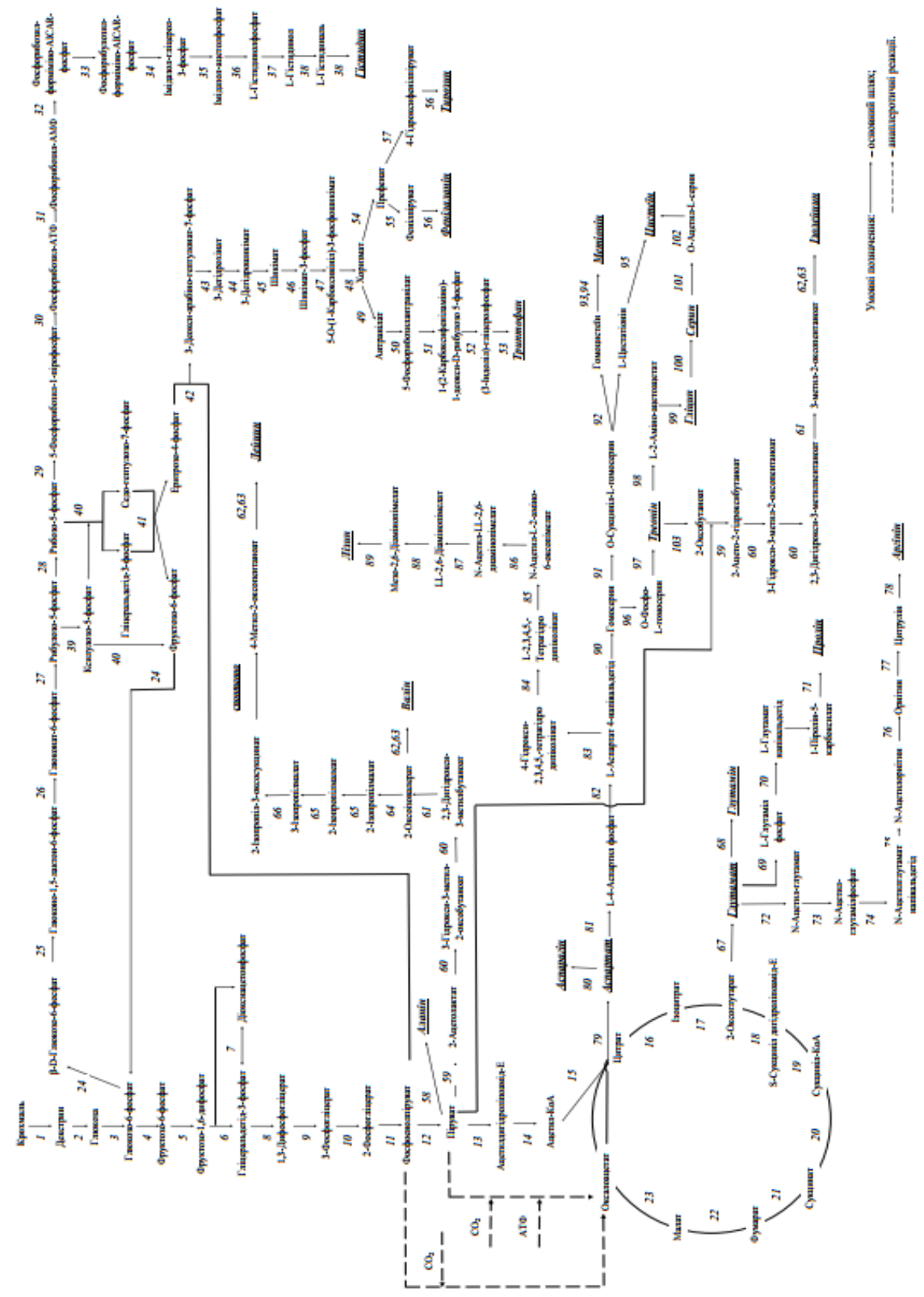
- 
82. - аспартат-напівальдегід дегідрогеназа (КФ 1.2.1.11)
  83. - 4-гідрокси-тетрагідродипіколінат синтаза (КФ 4.3.3.7)
  84. - 4-гідрокси-тетрагідродипіколінат редуктаза (КФ 1.17.1.8)
  85. - тетрагідродипіколінат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.89)
  86. - амінотрансфераза (КФ 2.6.1. -)
  87. - N-ацетилдіамінопімелат деацетилаза (КФ 3.5.1.47)
  88. - діамінопімелат епімераза (КФ 5.1.1.7)
  89. - діамінопімелат декарбоксилаза (КФ 4.1.1.20)
  90. - гомосерин дегідрогеназа (КФ 1.1.1.3)
  91. - гомосерин O-сукцинілтрансфераза (КФ 2.3.1.46)
  92. - цистатіонін  $\gamma$ -синтаза (КФ 2.5.1.48)
  93. - гомоцистеїн метилтрансфераза (КФ 2.1.1.10)
  94. - 5-метилтетрагідропероїлтриглутамат - гомоцистеїн метилтрансфераза (КФ 2.1.1.14)
  95. - цистатіонін  $\beta$ -ліаза (КФ 4.4.1.1)
  96. - гомосерин кіназа (КФ 2.7.1.39)
  97. - треонін синтаза (КФ 4.2.3.1)
  98. - треонін 3-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.103)
  99. - гліцин C-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.29)
  100. - гліцин гідрометилтрансфераза (КФ 2.1.2.1)
  101. - серин ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.30)
  102. - цистеїн синтаза (КФ 2.5.1.47)
  103. - треонін дегідратаза (КФ 4.3.1.19)

Біосинтез ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази (20 амінокислот)

мікроорганізмом *Bacillus amyloliquefaciens* CC178

на ростовому субстраті – крохмаль

Біосинтез ферменту циклодекстрин-глюканотрансферази (20 амінокислот) мікроорганізмом *Bacillus amyloliquefaciens* CC178 на ростовому субстраті – крохмаль



Умовні позначення: — основний шлях; - - - - - альтернативний шлях.

## Основні статті та періоджерела

ИЗВЕСТИЯ УФИМСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РАН. 2013. № 3. С. 26–29

БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 577.15

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ СТАБИЛЬНОГО  
БИОСИНТЕЗА ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ  
*PAENIBACILLUS EHIMENSIS* IB-739**

© П.Ю. Мильман, Е.А. Гильванова

Для устойчивого биосинтеза и увеличения активности циклодекстринглюканотрансферазы бактерий *Paenibacillus ehimensis* IB-739 проведен поиск подходящих компонентов питательной среды по составу. Обнаружено, что присутствие катионов кальция в питательной среде в концентрации 1+2 г/л ингибирует образование экстрацеллюлярных полисахаридов в процессе культивирования.

Ключевые слова: циклодекстринглюканотрансфераза, ЦГТаза, *Paenibacillus*, *Paenibacillus ehimensis*, культивирование, циклодекстрины, ЦД.

Циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТаза, КФ 2.4.1.19) – фермент, катализирующий реакции межмолекулярного трансгликозилирования, в конечном итоге приводящие к деполимеризации крахмала с образованием циклодекстринов (ЦД) – нередуцирующих макроциклических олигосахаридов, широко используемых в пищевой промышленности, фармацевтике, косметике, органическом синтезе [1]. Наиболее распространены и известны альфа-, бета- и гамма-ЦД, молекулы которых состоят из 6, 7 и 8 остатков D-глюкопиранозы, связанных альфа-1→4-D связями. Большинство ЦГТаз экстрацеллюлярны, и циклизующий фермент локализован с внешней стороны клеточной мембраны.

Известные продуценты ЦГТаз принадлежат к бактериям родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, такие как *Paenibacillus macerans*, *P. illinoisensis*,

*P. chibensis*, *P. graminis*, *P. stellifer*, *P. campinasensis*, *Bacillus agaradhaerens* [2–9]. Единичные продуценты позиционированы на уровне родов *Klebsiella* [10].

В определенных условиях бактерии рода *Paenibacillus* способны выделять в среду экстрацеллюлярные полисахариды (экзополисахариды, ЭПС), являющиеся энергетическим резервом клеток в условиях дефицита питательных веществ [11–13]. ЭПС – экзогенные продукты метаболизма микроорганизмов,

обладающие способностью образовывать гели различной плотности при малых концентрациях полисахарида. Исследуемый штамм *P. ehimensis* характеризуется способностью к образованию экзополисахаридов альгинатного типа, что в процессе культивирования приводит к формированию высоковязкой среды [13]. Хотя в процессе культивирования накопление экзополисахида не влияет существенно на уровень ферментативной активности ЦГТаза, тем не менее его присутствие создает серьезные трудности для выделения фермента из культуральной среды.

Целью настоящего исследования явилось конструирование состава питательной среды, обеспечивающей снижение вязкости экстрацеллюлярных полисахаридов в культуральной жидкости (КЖ), а также для устойчи-

вого биосинтеза и увеличения активности ЦГТаза культурой *P. ehimensis* IB-739 как конечного продукта ферментации.

**Материалы и методы.** Объектом исследований служила культура аэробных спорообразующих бактерий *Paenibacillus ehimensis* ВКМВ-2680D из коллекции лаборатории прикладной микробиологии Института биологии УНЦ РАН, также известной под номерами IB-739 и ИБ-739 [14].

МИЛЬМАН Полина Юрьевна – к.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: milman@anrb.ru  
ГИЛЬВАНОВА Елена Альбертовна – к.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: gelena@anrb.ru

Фермент нарабатывали на среде К-1, состав которой приведен в таблице. Для выделения ЦГТазы из культуральной жидкости бактериальные клетки отделяли центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин, фильтрат культуральной жидкости концентрировали методом ультрафильтрации на полых волокнах ВПУ-50 с пределом отсеивания 50 кДа.

ЦГТазную активность ферментного препарата измеряли модифицированным фенолфталеиновым методом, используя для разбавления фермента 50 mM ацетатный буфер pH 6,0+6,1, содержащий 10 mM CaCl<sub>2</sub> [15]. За 1 единицу активности принимали количество ЦГТазы, катализирующее образование 1 мкМ бета-ЦД в течение 1 мин при 40°C.

Прирост клеточной биомассы регистрировали фотометрическим методом, основанным на способности бактериальной суспензии поглощать либо рассеивать свет пропорционально количеству бактерий, по оптической плотности КЖ при длине волны 630 нм на спектрофотометре СФ-46 («ЛОМО», Россия).

Определение соотношения количества спор к количеству вегетативных клеток проводили путем прямого подсчета их в поле зрения при микроскопировании КЖ с исполь-

зованием фазово-контрастного устройства микроскопа «Leica DM 1000» (Германия).

Определение динамической вязкости КЖ осуществляли с помощью цифрового ротационного вискозиметра Brookfield LSRV (США) при скорости вращения ротора 10 об/мин.

**Результаты и обсуждение.** Конструирование питательной среды по составу выполняли, варьируя содержание субстрата, источников азота различной природы, буферных компонентов, источников кальция, в среде К-1. Выполняя пошаговое изменение концентрации указанных факторов в сторону увеличения или уменьшения, отмечали степень их влияния на результирующую активность ЦГТазы и вязкость КЖ. В соответствии с полученным откликом проводили дополнительные эксперименты, направленные на поиск оптимума концентрации исследуемого фактора при фиксированных значениях остальных. В таблице представлены результаты конструирования питательной среды для максимального биосинтеза ЦГТазы при одновременном измерении вязкости КЖ (приведены некоторые варианты состава питательных сред).

Из литературных данных известно, что на уровень продукции ЭПС имеют влияние

Таблица

Подбор компонентов питательной среды для максимального биосинтеза ЦГТазы *P. ehimensis* IB-739 и снижения накопления экзополисахарида (ЭПС)

Компонент, %	Содержание компонента в средах № ..., %									
	1 (К-1)	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Крахмал	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,5
Пептон	0,4	–	0,4	0,4	0,4	0,3	0,45	–	0,3	0,3
Дрожжевой экстракт	0,5	–	0,5	0,5	0,5	0,3	0,45	–	0,3	0,3
Кукурузный экстракт	–	0,3	–	–	–	0,3	–	0,1	0,3	0,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	–	–	–	–	–
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	–	0,1	0,1	–	–	–	–	–	–
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	0,2	–	–	–	0,2	0,45	0,2	0,2	0,2
CaCl <sub>2</sub>	–	–	0,2	–	–	–	–	–	–	–
CaCO <sub>3</sub>	–	–	–	0,2	0,2	–	–	–	–	–
Характеристика КЖ, полученная на средах различного состава:										
Активность, ед/мл	2,53±0,2	1,85±0,2	2,54±0,5	2,86±0,5	3,75±0,5	2,31±0,4	1,13±0,2	0,65±0,4	1,24±0,4	0,75±0,2
Пределы вязкости КЖ, сПа	55–75	970–1065	970–1065	1550–1640	55–75	1550–1640	1550–1640	55–75	55–75	55–75

различные факторы, в том числе содержание фосфат-ионов и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [16]. Как следует из представленных данных, в условиях лабораторного эксперимента при работе с культурой *P. ehimensis* IB-739 использование двузамещенного фосфата натрия и карбоната кальция (вариант № 4, табл.) в составе питательной среды не приводит к снижению биосинтеза ЭПС. Возможно, это связано с тем, что одновременное наличие двух этих компонентов в составе среды, как показали данные контроля pH, приводит к сдвигу кислотно-основного равновесия и подщелачиванию среды, что негативно отражается на физиологическом состоянии штамма, вследствие чего активность ЦГТазы возрастает незначительно.

Максимальная активность при работе с культурой *P. ehimensis* IB-739 достигается на среде следующего состава (в граммах): крахмал – 10,0; пептон – 4,0; дрожжевой экстракт – 5,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCO}_3$  – 1,0; дистиллированная вода – до 1000 мл. При использовании питательной среды указанного состава был достигнут устойчивый биосинтез ЦГТазы культурой *P. ehimensis* IB-739, а также снижен уровень накопления экстрацеллюлярных полисахаридов. Таким образом, при выращивании штамма в присутствии карбоната кальция в концентрации 1+2 г/л вязкость КЖ составила 55–75 сПа и была приемлема для выделения ЦГТазы и изучения ее свойств.

На среде оптимального состава была изучена динамика накопления ЦГТазы в процессе культивирования штамма *P. ehimensis* IB-739. Полученные данные представлены на рисунке.

Приведенные данные показывают, что начало роста вегетативных клеток отмечается через 13–15 ч после инокуляции. Секрция ЦГТазы начинается через 25–27 ч от начала культивирования с подъемом активности до максимального (и стабильного) уровня 3,7–4,2 ед/мл после 48–55 ч. Микроскопический анализ проб КЖ показал, что процесс активного деления клеток к этому времени прекращается. Спорообразование культуры *P. ehimensis* IB-739 в ферментационной среде начинается через 48 ч культивирования. Этот процесс полностью завершается через

72 ч, когда в среде накапливается максимальное количество ЦГТазы. При этом устойчивый биосинтез ЦГТазы наблюдается в период стационарной фазы роста и коррелирует с процессом перехода от вегетативной стадии роста к спорообразованию.

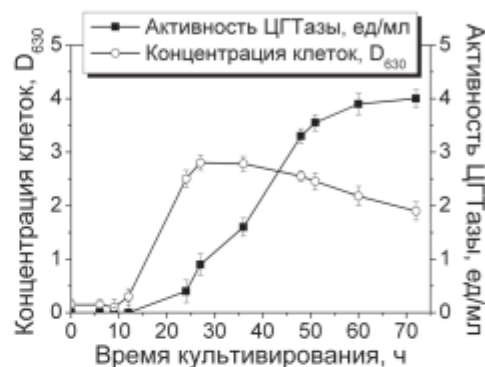


Рис. Динамика роста биомассы и синтеза ЦГТазы в ходе культивирования штамма *P. ehimensis* IB-739

**Выводы.** Резюмируя сказанное, следует отметить, что присутствие катионов кальция в питательной среде в концентрации 1+2 г/л ингибирует образование экстрацеллюлярных полисахаридов, влияющих на вязкость КЖ, в процессе культивирования циклодекстриногенных бактерий *P. ehimensis* IB-739, вследствие чего достигается устойчивый синтез и увеличение активности фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Abelyan V.H. Cyclodextrines: Production and uses. Kuala Lumpur, Malaysia: Stevian Biotechnology Corp. Snd. Bhd., 2005. 511 p.
2. Абелян В.А., Афян К.Б., Манукян Л.С. Новые циклодекстринглюканотрансферазы, продуцируемые *Bacillus macerans* // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36, № 4. С. 395–401.
3. Усанов Н.Г., Гильванова Е.А., Мелентьев А.И., Курченко В.П. Свойства циклодекстринглюканотрансферазы *Paenibacillus illinoisensis* IB-1087 // Труды Белорусского государственного университета (серия Биотехнология). 2008. Т. 3, № 2. С. 132–140.
4. Doukyu N., Kuwahara H., Aono R. Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* that produces cyclodextrin

СРАВНЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
РАЗЛИЧНЫХ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗ

© 2011 П.Ю. Федорова, Е.А. Гильванова, Н.Г. Усанов

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа

Поступила 01.07.2011

Приводятся данные, указывающие на факт высокой частоты встречаемости способности к образованию циклодекстринов среди бактерий рода *Paenibacillus* (Ash et al. 1994 emend. Behrendt et al. 2010). Проведено сравнение физико-химических и каталитических свойств циклодекстринглюканотрансфераз четырех штаммов, выделенных из почвы тремя различными методами и охарактеризованных филогенетически в качестве представителей *P. macerans*, *P. ehimensis*, *P. illinoensis* и *P. campinasensis*.

**Ключевые слова:** циклодекстрины, ЦД, циклодекстринглюканотрансфераза, ЦГТаза, *Paenibacillus*, *P. macerans*, *P. ehimensis*, *P. illinoensis*, *P. campinasensis*.

Циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТаза, КФ 2.4.1.19) – фермент, катализирующий реакции межмолекулярного трансгликозирования, в своей сумме приводящие к деполимеризации крахмала и образованию циклодекстринов (ЦД) – нередуцирующих макроциклических олигосахаридов, широко используемых в пищевой промышленности, фармацевтике, косметике, органическом синтезе [1].

Наиболее распространены и известны, альфа-( $\alpha$ ), бета-( $\beta$ ) и гамма-( $\gamma$ ) ЦД, молекулы которых состоят из 6, 7 и 8 остатков D-глюкопиранозы, связанных  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4-D связями. При действии ЦГТаза на крахмал в реакционной смеси одновременно образуются и накапливаются все три гомолога, ингибирующие действие фермента.

В зависимости от того, какой продукт доминирует в продуктах конверсии, различают ( $\alpha$ -), ( $\beta$ -) и ( $\gamma$ -)ЦГТаза, природа которых в свою очередь зависит от генетическо-видовых особенностей штамма-продуцента.

Несмотря на обилие публикаций о выделении новых бактерий, способных к синтезу ЦГТаза, нако-

Практически не имеется работ, в которых бы в рамках одной лаборатории проводилось сравнение свойств нескольких ЦГТаза бактерий различных видовых групп, прошедших филогенетическую идентификацию. Целью настоящего исследования является восполнение пробелов в данной тематике.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали лиофильно высушенные препараты циклодекстринглюканотрансфераз продуцентов из коллекции лаборатории прикладной микробиологии Института биологии УНЦ РАН: *Paenibacillus ehimensis* ВКМБ-2680D (IB-739), *P.illinoensis* IB-1087, *P.campinasensis* IB-417, *P.macerans* IB-14 (IB-1053).

Выращивание бактерий *Paenibacillus ehimensis* осуществляли в 250 мл качалочных колбах содержащих 50 мл среды, при скорости 180 об/мин при 37–39°C в течение 68–72 ч, на среде, содержащей (в граммах): крахмал – 10,0; пептон – 4,0; дрожжевой экстракт – 5,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{CaCO}_3$  – 1,0; дистиллированную воду до 1000 мл, при стартовых pH 7,0–7,2.

Биотехнология

Для выделения ЦГТаза из культуральной жидкости бактериальные клетки отделяли центрифугированием при 6000 мин<sup>-1</sup> в течение 30 мин, фильтрат культуральной жидкости концентрировали методом ультрафильтрации на полых волокнах ВПУ-50. Для получения сухого не очищенного препарата концентрат подвергали лиофильной сушке в аппарате «ИНЕЙ-6».

пленный материал зачастую оторван от современных таксономических описаний, названия изолятов бактерий не соответствуют действительности, а сами публикации фактически лишены смысла. Филогенетически изучены лишь единичные штаммы аэробных спорообразующих бактерий, таких как *Paenibacillus macerans* [2], *P.illinoensis* [10], *P.graminis* [19], *P.stellifer* [17], *P. campinasensis* [20], *Bacillus agaradhaerens* [14]. Единичные продуценты позиционированы на физиолого-биохимическом уровне на уровне родов *Klebsiella* [9].

Несмотря на перечисленные факты, даже в последних обзорах [16, 18], посвященных сравнительному описанию продуцентов ЦД, в качестве основной родовой группы продолжает фигурировать род *Bacillus*, Cohn 1872.

JCM11200 (№ NCBI=AB073187) и *P.campinasensis* BL11 (DQ232773) [7-8; 20].

Для наработки образцов ферментов использовали среды и режимы культивирования, приведенные в материалах и методах.

Препараты подвергали частичной очистке пересаживанием, высаливанием, хроматографическими и абсорбционными методами.

Наработку ЦГТаза *P.illinoensis* IB-1087 проводили в вышеописанных условиях на среде K1, содержащей (в граммах): крахмал – 10,0; пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 5,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 2,0; дистиллированную воду до 1000 мл, при стартовых pH 7,2–7,4.

Наработку ЦГТаза *P.campinasensis* IB-417 проводили на среде K1 с добавлением 0,8–1,0%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , при стартовых pH 9,2–9,8.

Наработку препарата ЦГТаза *P.macerans* IB-14 проводили на среде, содержащей (в граммах): крахмал – 10,0; пептон – 3,0; дрожжевой экстракт – 3,0; кукурузный экстракт – 3,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,2;  $\text{CaCO}_3$  – 1,0; дистиллированную воду до 1000 мл, при стартовых pH 7,4–7,8.

ЦГТазную активность растворов и препаратов измеряли фенолфталеиновым методом [3], используя для разбавления фермента 50 мМ ацетатный буфер pH 6,0–6,1, содержащий 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ . За 1 единицу активности принимали количество ЦГТаза, катализирующее образование 1 мкМ  $\beta$ -ЦД в течение 1 мин при 40°C.

Федорова Полина Юрьевна, e-mail: millinariya@yandex.ru;  
Гильванова Елена Альбертовна, канд. биол. наук, e-mail: gilena@amrb.ru;  
Усанов Николай Глебович, канд. биол. наук, e-mail: nikisa@amrb.ru.

Аналитическое определение специфичности ЦГТаз осуществляли следующим методом. Пробы (5 мл) реакционной смеси, состоящей из клейстеризованного картофельного крахмала в 50 мМ ацетатном буфере (рН 6,0), ЦГТазы и 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, помещали в биологический термостат и выдерживали при 40°C в течение 24 часов. По истечении указанного интервала времени, из пробирок извлекали по 900 мкл образцов, которые помещали в 2,0 мл пробирки Эппендорф. В каждую из проб вносили по 90 мкл 10%-ного раствора ксилозы, игравшей роль внутреннего стандарта. После завершения указанных манипуляций в пробирки дозировали по 990 мкл ацетонитрила ОСЧ для хроматографии и отделяли образовавшийся осадок крахмала центрифугированием при 8000 мин<sup>-1</sup> в течение 10 минут. Порции супернатанта, соответствующие условиям реакции, анализировали с помощью ВЭЖХ на колонке «SEPARON-NH<sub>2</sub>»-5мкм (3x150 мм), используя в качестве элюента смесь ацетонитрил – вода в объемном соотношении 63:37. Подачу растворителя осуществляли насосом HPP-5001 со скоростью 0,7 мл/мин, а в качестве детектора использовали рефрактометр RIDK-102. Регистрацию и оцифровку аналогового сигнала, последующую обработку хроматограмм проводили с помощью программно-вычислительного комплекса «Мультисхром 1.59». Калибровку прибора осуществляли методом внутреннего стандарта, используя индивидуальные ЦД производства «Wacker Chemie» (США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения ферментных препаратов использованы культуры из коллекции лаборатории прикладной микробиологии Института биологии УНЦ РАН *Paenibacillus illinoisensis* (IB-1087), *P. ehimensis* ВКМ В-2680D (IB-739), *P. macerans* (IB-1053), *P. campinasensis* (IB-417). Три первых штамма были выделены из почвы с помощью аэробной и анаэробной накопительной среды на основе растворов 0,5% β-циклодекстрина [4, 5]. Алкалолентный штамм *P. campinasensis* IB-417 обнаружен в процессе скрининга продуцентов щелочных бактериальных целлюлаз на щелочной элективной среде, содержащей в своем составе 0,5% КМЦ-Na и 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (рН=10,0÷11,0).

Способность к синтезу ЦД, была обнаружена лишь после выполнения 16S рРНК анализа и обнаружения близкого сходства прочитанной последовательности гена с таковыми, описанными ранее бразильскими авторами у культур *P. campinasensis*

Используя стандартные процедуры, исследовали физико-химические свойства выделенных белков, их молекулярную массу.

Результаты описаний ЦГТаз 4-х видов бактерий, выделенных в нашей лаборатории и охарактеризованных филогенетическими методами, сведены в таблице.

Суммируя полученные результаты, можно указать на тот факт, что описания ЦГТаз *P. macerans* IB-1053 и *P. campinasensis* IB-417, *P. illinoisensis* IB-1087 были близки к описанным ранее для культур тех же видов.

Весьма важной характеристикой ЦГТаз является их специфичность в отношении спектра ЦД, накапливающихся в продуктах конверсии крахмала [1]. По преобладающему продукту реакции дают название ЦГТазе, указывая что она, например, относится к β-типу. По доминантному продукту реакции принято разделять циклизующие ферменты на α-[11], β-[8] и γ-ЦГТазы [12; 13].

Вместе с тем, в расчет не берется тот факт, что само соотношение [α-ЦД]:[β-ЦД]:[γ-ЦД] в продуктах реакции динамично меняется во времени, и зачастую, весьма существенно. Например для α-ЦГТаз *P. macerans* описаны серьезные вариации соотношения α-ЦД:β-ЦД:γ-ЦД, возникающие в течение реакции, равно как и при вариациях стартового соотношения субстрат/фермент (E/S).

Учитывая, что условия выбора режима реакции зависит, как от воли автора исследования, так и от использованных им методов измерения циклизующей активности, сравнение ЦГТаз, кинетические свойства которых были исследованы в разных лабораториях зачастую не возможно.

В этой связи для изучения кинетических особенностей ЦГТаз, имевшихся в нашем распоряжении, был применен собственный подход, основанный на определении безразмерных коэффициентов, являющихся отношениями молярных концентраций  $KU_{\alpha} = [\beta\text{-ЦД}]/[\alpha\text{-ЦД}]$  и  $KU_{\gamma} = [\beta\text{-ЦД}]/[\gamma\text{-ЦД}]$  в продуктах суточной конверсии крахмала.

Измерения велись в широком диапазоне стартового соотношения (E/S), а в качестве единицы характеризующей количество ЦГТазы, была использована ее активность в мкКат, измеренная фенолфталеиновым методом.

На рис. представлены результаты сравнения каталитических свойств четырех штаммов циклодекстриногенных бактерий относящихся к роду *Paenibacillus*.

УДК 577.152.24:577.15.08

## УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ

© 2007 г. Н. Г. Усанов, Е. А. Гильванова, П. А. Елизарьев, Е. А. Пруцакова, А. И. Мелентьев

Институт биологии УНЦ РАН, г. Уфа, 450054; e-mail: nikusa@anrb.ru

Поступила в редакцию 21.01.2006 г.

Усовершенствована методика спектрофотометрического определения активности циклодекстрин-глюканотрансферазы (ЦГТазы, КФ 2.4.1.19) с использованием в качестве окрашенного реагента фенолфталеина. Процедура включает в себя проведение ферментативной реакции в 2%-ном растворе крахмала при 40°C в течение 60 мин, внесение в реакционную смесь (0.5 мл) фенолфталеинового реагента (3.0 мл), приготовленного на основе 0.1 М калий-карбонатного буфера (рН 11.0) по особой методике и измерение оптической плотности полученной смеси при 553 нм. Активность вычисляли по формуле экспоненциального роста, связывающей величину падения оптической плотности относительно контроля и степень разведения фермента. Описываемый метод пригоден для работы в сравнительно широком диапазоне удельной активности β-ЦГТазы и не требует точного подбора степени разбавления анализируемых растворов.

### УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

119

#### МЕТОДИКА

**Спектрофотометрические измерения.** Выполняли в стеклянных кюветках с длиной оптического пути 1 см на приборе СФ-56 (ЛОМО, Россия) с системой интерфейса на базе персонального компьютера при ширине щели монохроматора 1 нм. Повторность единичных измерений пятикратная, с последующим усреднением результата. При построении калибровочных кривых использовали циклодекстрины (α-, β-, γ-) квалификации х.ч., отечественного производства. В реакции использовали крахмал картофельный для нефелометрии. Концентрацию растворов ЦД рассчитывали по абсолютно сухому веществу (АСВ), определяя влажность имеющихся препаратов методом доведения до постоянного веса при 110°C. Калибровочные растворы готовили, смешивая 1 часть водного раствора ЦД соответствующей концентрации с 2 частями 3%-ного свежезаваренного крахмала в 0.1 М ацетате натрия, рН 5.70.

**Приготовление фенолфталеинового реагента.** К 500 мл 0.1М раствора углекислого калия в дистиллированной воде при активном перемешивании добавляли ~3.5 мл 0.3%-ного фенолфталеина в 96% этиловом спирте. Полученный раствор доводили до значения  $D = 2.00 \pm 0.15$  при 553 нм в кювете 1 см путем точного подтитрования тем же раствором фенолфталеина, а затем оставляли в плотно закрытом сосуде на 24 ч при комнатной температуре. По истечении указанного времени раствор разбавляли 0.1 М  $K_2CO_3$  до  $D_{553} = 1.00 \pm 0.05$  в 1-см кювете, помещали в темный пластиковый сосуд и хранили в холодильнике при 3–5°C, периодически проверяя экстинцию при 553 нм. Рабочим считали реагент, имевший величину  $D_{553} > 0.850$ .

подогретого до комнатной температуры фенолфталеинового реагента, служившего одновременно стоп-раствором. Контролем являлись образцы реакционной смеси каждого из разведений фермента, не подвергшиеся инкубации в термостате. За единицу активности ЦГТазы принимали количество фермента, катализировавшего образование 1 мкМ β-ЦД в течение 1 мин в описанных условиях. Активность β-ЦГТазы рассчитывали по формуле:

$$E = [0.69058 \cdot e^{(\Delta D_{553} \cdot 0.32721)} - 0.68915]N/60, \quad (1)$$

где  $E$  – активность тестируемого препарата культуральной жидкости, ед/мл;  $\Delta D_{553}$  – разность оптических плотностей раствора фенолфталеина после внесения порций реакционной смеси и контрольного раствора;  $N$  – степень разбавления культуральной жидкости или ферментного препарата, использованного для определения активности, при котором разность оптических плотностей находится в рекомендуемом рабочем диапазоне  $0.07 \leq D_{553} \leq 0.28$ .

Концентрацию образовавшегося β-ЦД (в расчете на АСВ) в реакционной среде раствора крахмала в ацетатном буфере (рН 5.7) определяли по падению оптической плотности рабочего раствора согласно уравнению:

$$C(\text{мг АСВ } \beta\text{-ЦД/л}) = 232.25538 \cdot e^{(\Delta D_{553} \cdot 0.32721)} - 231.8. \quad (2)$$

**Статистическая обработка.** Обработку результатов измерений и аппроксимацию экспериментальных данных осуществляли с помощью программы Origin 7.0 Pro.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Перед проведением анализа необходимое для данной серии опытов количество фенолфталеинового реагента переливали в отдельный сосуд и доводили до комнатной температуры. Ферментативную реакцию осуществляли, используя в качестве субстрата растворимый картофельный крахмал с концентрацией 3% в 0.1 М ацетатном буфере (рН  $5.70 \pm 0.03$ ), доведенным 10%-ной уксусной кислотой. Порцию 900 мкл субстрата помещали в пробирку Эппендорф и подогревали 5–10 мин в твердотельном термостате до 40°C. Реакцию инициировали введением в пробирку 450 мкл анализируемого ферментного раствора в 0.1 М ацетатном буфере (рН 5.70) при перемешивании. Смесь инкубировали в течение 1 ч при 40°C, после чего отбирали 500 мкл продуктов реакции и с перемешиванием переносили в пластиковые пробирки на 5 мл, с предварительно отмеренной порцией (3000 мкл)

Принцип фенолфталеинового метода измерения активности ЦГТазы давно известен: при смешивании щелочного раствора фенолфталеина с исследуемой пробой, содержащей  $\beta$ -ЦД, интенсивность малиново-пурпурной окраски снижается, изменение которой может быть измерено спектрофотометрически и, следовательно, сопоставлено с количеством внесенного макроциклического олигосахарида [5]. Метод выгодно отличается от ВЭЖХ аналога [7] высокой чувствительностью, быстротой и возможностью проведения измерений в больших сериях опытов. И в ранних [2], и более поздних [3–6] вариантах метода рекомендовано использовать свежий раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , в который дозируется аликвота фенолфталеина в виде спиртового раствора. При этом, хотя и оговаривается, что рабочий раствор должен быть “приготовлен непосредственно перед определением”,

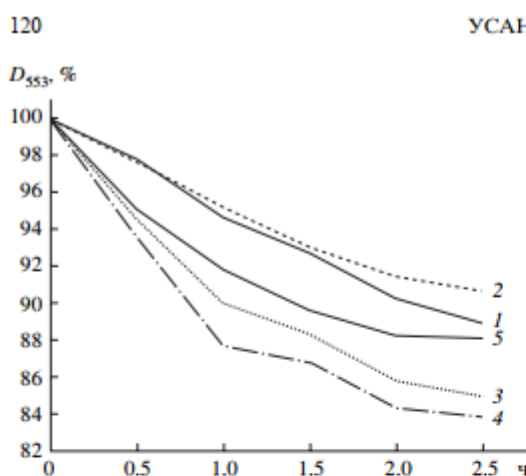


Рис. 1. Падение оптической плотности раствора фенолфталеина в натрий – (1–4) и калий – (5) карбонатном буфере различной ионной силы, (мМ): 1 – 5; 2 – 10; 3 – 50; 4 – 100; 5 – 100.

не уточняется, должен ли укладываться временной интервал между смешиванием и измерением на спектрофотометре в секунды, минуты или же позволительны иные интервалы времени. Получить ответ на поставленный вопрос можно в простом эксперименте, смешав непосредственно в кювете натрий-карбонатный буфер с порцией спиртового фенолфталеина. На рис. 1 продемонстрирована кинетика падения экстинции моделей рабочих растворов фенолфталеина, приготовленных на основе карбоната натрия с различными концентрациями, лежащими в пределах, предложенных разными авторами [3–5, 7]. Из графика следует, что наиболее активное изменение малиново-пурпурной окраски фенолфталеина в растворе  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  происходит в течение первых 1.5 ч после добавления индикатора и относительная разница в оптической плотности стартового и экспонированных растворов может достигать 15–20%. Очевидно, что подобные результаты нельзя

УСАНОВ и др.

летучих жидкостей. Сумма неудобств и недоработок приводит к тому, что от фенолфталеинового метода зачастую просто отказываются, а измерение активности ЦГТазы проводят с помощью медленной и дорогостоящей ВЭЖХ. Иные индикаторы, предлагавшиеся в качестве альтернативы фенолфталеину, например метиловый оранжевый [5], обладающий одновременной чувствительностью ко всем трем ЦД, не позволяют получить однозначно интерпретируемые результаты, зависящие от специфичности ЦГТазы.

Природа флуктуаций оптической плотности щелочных растворов фенолфталеина, возможно, лежит в многостадийном характере превращений окрашенной и бесцветных форм этого индикатора, насчитывающих 7 изомерных молекулярных вариантов. При этом начало реакций изомеризации инициируется именно увеличением рН среды [8].

Для решения проблемы нестабильности принципиально возможны два пути: первый – подобрать щелочную буферную систему, которая обеспечит большую стабильность пурпурного раствора; второй – дождаться стабилизации переходных процессов, связанных с изменениями оптической плотности и, таким образом, пользоваться “состарившимся” стабильным реагентом.

Нами были испытаны защелачивающие системы на основе растворов солей и гидроксидов  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{TRIS}^+$ . В целом, была обнаружена очень низкая стабильность оптических свойств окрашенных растворов фенолфталеина, приготовленных на основе гидроксидов одновалентных щелочных металлов или их трехзамещенных фосфатов, а также  $\text{TRIS}$ . Наименьшие абсолютные изменения оптической плотности растворов фенолфталеина в процессе недельной экспозиции при комнатной температуре были отмечены в щелочных буферах на основе карбоната натрия и калия, при некотором преимуществе последнего (табл. 1).

20%. Очевидно, что подобные результаты нельзя назвать удовлетворительными, так как в основе метода лежит именно измерение разницы оптических величин контрольной и опытных смесей. Задержки при определении оптической плотности, изменение порядка замеров на спектрофотометре приводят к появлению эффекта “ложной” активности ЦГТазы или к получению парадоксального результата в виде “отрицательной циклизующей активности”. Еще один источник ошибок лежит в самой методике приготовления малиново-пурпурного раствора, предписывающей дозирование фенолфталеина в этиловом спирте с помощью микродозаторов, не предназначенных для

Следует отметить, что спектр поглощения раствора фенолфталеинового индикатора, приготовленного на основе 0.1 М калий-карбонатного буфера, имел максимум поглощения при 553 нм, в отличие от аналогичного раствора, содержащего карбонат натрия (550 нм) [7]. Вместе с тем, как следует из полученных нами данных (рис. 2), при добавлении в реагент проб реакционной смеси, локализация максимума не изменялась.

Тем не менее флукутации  $D_{553}$  фенолфталеина в калий-карбонатном буфере в первые 2.5 ч после приготовления раствора, по-прежнему носили достаточно выраженный характер, аналогичный

УДК 602.4:547.455.623:007.573.6

### **ФЕРМЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ, МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ И КРАХМАЛА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕЧАТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ**

Л.С. Латунина, С.С. Каманин, В.А. Арляпов

В данной ситуации ферментные биосенсоры являются многообещающей альтернативой: помимо их хорошей селективности, они могут быть легко интегрированы в автоматические схемы и используются для разработки простого и переносного оборудования, что позволяет быстро и на месте исследовать образцы [2, 3]. Одним из перспективных технологий развития биосенсорики является использование печатных электродов. Они получили широкое распространение в решении ряда практических задач, например, в глюкометрах – биосенсорах амперометрического и оптического типа для определения содержания глюкозы в крови. Печатные графитовые электроды отличаются компактностью, низкой себестоимостью, многофункциональностью и возможностью модификации, что позволяет создавать на их основе различного рода биосенсоры, удобные для промышленного производства [4].

В литературных источниках описаны модели медиаторных биосенсоров на основе фермента глюкозооксидазы (ГО), иммобилизованного на поверхности графитовых печатных электродов, позволяющих определять содержание глюкозы в среднем интервале 0,01-1 mM [5, 6]. Описаны также биосенсоры на основе графитовых печатных электродов, содержащие фермент лактатоксидазу (ЛО), позволяющие определять концентрацию лактата со значением операционной стабильности в районе 3-4 % [7, 8]. Определение содержания крахмала биосенсорным методом осуществляется с применением биферментного рецепторного элемента, включающего в себя глюкозооксидазу и амилазу (ГО+Ам). В литературных источниках существуют примеры разработки биосенсоров данного типа [9], однако их представлено не так много. Сообщений о разработке биосенсоров для определения крахмала на базе печатных электродов в научной печати не зафиксировано.

### Материалы и методы

**Биосенсорные измерения.** Сигнал регистрировали, используя графитовые печатные электроды (Русенс, Россия), на поверхности которых располагали рецепторный элемент. Измерения проводили в кювете объемом 4 см<sup>3</sup> в натрий-калиевом фосфатном буферном растворе (Sigma-Aldrich, США) с рН=6,8 при перемешивании магнитной мешалкой (Экрос, Россия) со скоростью 200 об/мин. Ввод пробы осуществляли автоматическими микропипетками переменного объема (5-50 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл, 1000-5000 мкл) (Ленпипет, Россия). Рабочий потенциал для электродов задавали по эмпирическим данным циклической вольтамперометрии с использованием потенциостата EmStat (PalmSens, Нидерланды). Для электродов, содержащих ГО, он составил +200 мВ, для электродов с ЛО и ГО+Ам +0,25 В. Выходные данные обрабатывались на персональном компьютере с применением программы PS Trace. Аналитическим сигналом (ответом биосенсора) являлась амплитуда изменения выходного сигнала биосенсора при добавлении лактата, глюкозы или крахмала. После каждого измерения осуществляли промывание электрода буферным раствором в течение 1-2 минут.

**Хромова Наталья Юрьевна**

## **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВЫХ БЕЛКОВЫХ ДОБАВОК**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата технических наук

### **2.2.11. Определение аминного азота формальным титрованием**

Аминные группы аминокислот вступают в реакцию с формальдегидом с образованием метиленовых соединений (метиленаминокислот) [142].

Метиленаминокислоты обладают более сильными кислотными свойствами, чем аминокислоты, и легко оттитровываются щелочью. Таким образом, содержание азота аминогрупп можно рассчитать по количеству щелочи, пошедшему на титрование. При этом принимается допущение, что количество карбоксильных групп, оттитрованных щелочью, эквивалентно количеству аминогрупп, прореагировавших с формальдегидом, что справедливо лишь для моноаминомонокарбоновых аминокислот. Например,

аминокислота аргинин не реагирует с формальдегидом, поэтому в реакции не участвует. При титровании тирозина со щелочью взаимодействуют не только карбоксильная, но и фенольная группа [142].

В стакан емкостью 50 мл внести 17 мл дистиллированной воды и 3 мл питательной среды. Погрузить в полученную смесь электроды рН – метра.

При постоянном перемешивании титровать рН смеси 0,1 Н раствором едкого натра до рН 7,0.

Добавить в полученный раствор 2 мл смеси формалина с фенолфталеином и при постоянном перемешивании титровать 0,1 Н раствором едкого натра до рН 9,2. Отметить количество мл 0,1 Н едкого натра, пошедшего на титрование.

Повторить испытание питательной среды. Одновременно провести контрольное испытание, добавив вместо 3 мл питательной среды 3 мл дистиллированной воды для проверки реактивов. Отметить количество мл 0,1 Н едкого натра, пошедшего на титрование контрольной пробы.

Рассчитать содержание аминного азота при испытании среды в двух параллельных определениях ( $X_1$  и  $X_2$ ) по формуле (8):

$$X_{\text{мг}\%} = (V - V_1) * K * 1,4 * 100/3, \quad (8)$$

где  $V$  – количество 0,1 Н раствора едкого натра, израсходованного на титрование испытуемой пробы, мл

$V_1$  – количество 0,1 Н раствора едкого натра, израсходованного на титрование контрольной пробы, мл

$K$  – поправочный коэффициент к 0,1 Н раствору едкого натра

1,4 – количество азота, соответствующее 1 мл 0,1 Н раствору едкого натра, мг

3 – количество испытуемой питательной среды, взятое на анализ, мл

Допускается расхождение между результатами параллельных определений не более  $\pm 3\%$ .

Рассчитать среднее арифметическое результатов, полученных при проведении двух параллельных определений аминного азота в питательной среде (полуфабрикаты среды), по формуле (9):

$$X_{\text{ср. мг}\%} = (X_1 + X_2)/2, \quad (9)$$

Среднее арифметическое значение, полученное из двух параллельных исследований содержания аминного азота в питательной среде, является окончательным результатом [65].

**ТРАНСГЛЮКОЗИЛИРОВАНИЕ СТЕВИОЗИДА  
ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗАМИ РАЗЛИЧНЫХ  
ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ**

**В.А. АБЕЛЯН\*, А.М. БАЛАЯН\*, В.Т. КОЧИКЯН\*, А.А. МАРКОСЯН\*\***

*\*Институт микробиологии НАН Армении, 378510 Абовян, Армения*

*\*\*Биотехнологическая корпорация «Стевиан», 50450 Куала Лумпур, Малайзия*

Циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТаза, КФ 2.4.1.19) из мезофильных, термофильных, алкалофильных и галофильных бацилл использованы для трансгликозилирования стевиозида с целью устранения горечи и послевкуся, с использованием циклодекстринов (ЦД) в качестве донора. Показано, что ЦГТаза экстремофильных микроорганизмов могут быть эффективными биокатализаторами. Оптимальные рН и температура для всех ферментов находились в пределах 6,5-7,5 и 45° соответственно. Оптимальное соотношение стевиозида и ЦД и общая концентрация сухих веществ для получения продукта с наилучшими вкусовыми качествами были 1:1 (вес/вес) и 11,6% соответственно.

The cyclodextrin glucanotransferases (CGTase, EC 2.4.1.19) produced by mesophilic, thermophilic, alcalophilic and halophilic bacilli have been applied for the transglycosylation of stevioside to remove the bitterness and aftertaste, using the cyclodextrins (CDs) as donors. It was shown that the CGTases produced by extremophilic microorganisms can be used as efficient biocatalists. The optimum pH and temperature were in the range of pH 6,5-7,5 and 45°, respectively. The optimum ratio of stevioside to CD and total concentration of dry materials for the synthesis of the product with most better taste quality were 1:1 (w/w) and 11,6%, respectively.

*Циклодекстринглюканотрансферазы - трансгликозилирование -  
подсластители - стевиозид*

Стевиозид является натуральным подсластителем, который выделяют из листьев растений *Stevia rebaudiana*. Он обладает низкой калорийностью

и широко используется в качестве натурального подсластителя - заменителя сахара [5, 6, 9, 10, 13, 14].

Водно-спиртовой экстракт содержит смесь различных дитерпеновых гликозидов, которые имеют единую основу – стевииол и отличаются содержанием углеводных остатков в положении С13 и С19. Были выделены и идентифицированы стевиозид, ребаудиозиды А, С, Е и D, дулкозид А, рубузозид и стевииобиозид. Основным компонентом среди них является стевииозид, который в 250-300 раз слаще сахара. При его регулярном употреблении снижается содержание сахара, радионуклидов и холестерина в организме, улучшается регенерация клеток и коагуляция крови, тормозится рост новообразований, укрепляются кровеносные сосуды. Он проявляет также желчегонное, противовоспалительное и диуретическое свойства, препятствует образованию язв в желудочно-кишечном тракте [3].

Однако стевииозид обладает остаточной горечью и послевкусием, которые влияют на его качественные характеристики. Их можно снять реакцией межмолекулярного трансгликозилирования под действием различных ферментов, в течение которой происходит присоединение новых углеводов в вышеуказанных положениях. Именно количество углеводных единиц в указанных позициях определяет качество и степень сладости компонента.

В качестве трансгликозилирующего фермента используют пуллулазу, изомальтазу [12], β-галактозидазу [8] и декстрин сахаразу [17], а в качестве доноров – пуллулан, мальтозу, лактозу и частично гидролизованный крахмал соответственно. Однако они позволяют устранять горечь только частично из-за низкого выхода производных с требуемыми качественными характеристиками.

Наилучшие результаты получены трансгликозилированием с помощью циклодекстрингликоанотрансферазы (ЦГТаз) из *Bacillus macerans* и крахмала в качестве донора [4]. При этом из полученных производных только два (4''-О-α-D-глюкозил-стевииозид и 4'''-О-α-D-глюкозил-стевииозид) обладали соответствующими вкусовыми качествами, однако их выход достаточно низок и составлял 2,5 и 6,5% соответственно. Кроме того, очистка смеси производных стевииозида представляет собой достаточно сложную задачу из-за большого количества низкомолекулярных мальтоолигосахаридов.

Цель работы - изучение особенностей трансгликозилирования стевииозида с применением ЦГТаз различных групп микроорганизмов и циклодекстрина в качестве донора.

**Материал и методика:** В качестве продуцентов ЦГТаз использовали вновь выделенные мезофильные бациллы: *Bacillus macerans* ИНМИА-В10-4м, *Bacillus circulans* ИНМИА-В10-5м, термофильный штамм *Bacillus stearothermophilus* ИНМИА-В-4006, алкалофильный *Bacillus alcalophilus* ИНМИА-ВА-4229 и галофильный *Bacillus halophilus* ИНМИА-В10-12Н.

Выращивание штаммов в глубинных условиях и получение ЦГТаз осуществляли по ранее описанной схеме [1, 2]. Биомассу отделяли центрифугированием при 5000 г в течение 20 мин. Ультрафильтрационное концентрирование осуществляли на приборе УПЛ-0,6 на колонке АР-0,2 (Россия). Количественное определение ЦД и производных стевииозида проводили с помощью ВЭЖХ согласно [11]. Белок определяли по Лоури, используя БСА в качестве стандарта; количество редуцирующих сахаров – по методу Сомоджи-Нельсона.

**Определение циклизирующей активности ЦГТаз.** Смесь 2 мл 2%-ного раствора картофельного крахмала в соответствующем буфере (оптимальный pH для каждого фермента) и 0,5 мл неочищенного фермента инкубировали при 50°. Через определенные интервалы времени (0,5-1,0 мин) отбирали 600 мкл пробы и добавляли 900 мкл фенолфталеинового [16] или бромкрезолового зеленого [7] реагента для идентификации β- или γ-ЦД соответственно. Количество α-ЦД определяли методом ВЭЖХ. За единицу активности принимали количество фермента, которое продуцировало 1 мкмоль ЦД в 1 мин.

**Определение трансгликозилирующей активности ЦГТаз.** Определение проводили согласно модифицированному методу [15]. Реакционная смесь, содержащая испытуемый препарат ЦГТазы (4,0 ед.), 10 мг растворимого крахмала, 50 ммоль сахарозы и 10 ммоль CaCl<sub>2</sub> в 1 мл 0,1 М буфера с оптимальным pH, инкубировали при 50° в течение 15 мин. Реакцию останавливали кипячением (10 мин) и после центрифугирования (10000 g, 10-15 мин) определяли количество мальтозилфруктозы методом ВЭЖХ. За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль мальтозилфруктозы за 1 мин.

ТСХ продуктов проводили в системе растворителей этилацетат-этанол-вода (8:2:1) на пластинках "Silufol" (ЧССР).

В работе использовали стевииозид "Shandong Huaxian Stevia Co., LTD" (КНР) и реактивы производства «Wako Pure Chemical Industries», LTD (Япония).

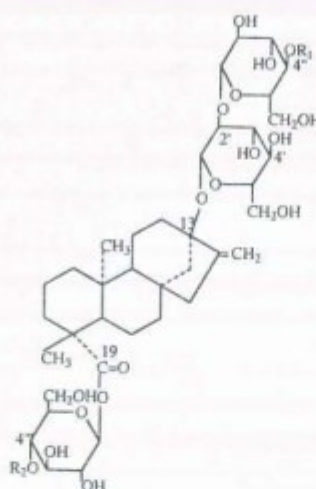
**Результаты и обсуждение:** Исследовали трансгликозилирующую активность ЦГТаз из различных групп микроорганизмов для получения гликозилированных производных стевииозидов в присутствии различных циклодекстринов (ЦД) в качестве доноров. Полученные соединения очищали методом ВЭЖХ, а их вкусовые качества оценивали органолептически в ГНУ ВНИМИ и ВНИИ кондитерской промышленности (Москва).

**Получение трансгликозилированного стевииозидов. β-Циклодекстрин (β-ЦД)** в количестве 58 или 116г растворяли в 600мл воды, добавляли 58 или 116 г стевииозидов соответственно и раствор выдерживали при 45° в течение 15 мин до полного растворения компонентов (конечная концентрация субстратов составляет 11,6 и 23,2%; pH реакционной среды был оптимальным для каждого фермента). Добавляли 5,0; 8,5; 17,0; 34,0 или 68 единиц ЦГТазы на 1г стевииозидов, количество раствора доводили до 1л дистиллированной водой и трансформацию осуществляли при вышеназванной температуре в течение 8 ч и дополнительно 12 ч при 32°.

Для приготовления растворов 40- и 60%-ной концентрации вместо β-ЦД использовали α-ЦД.

По истечении этого времени реакционную смесь подвергали термообработке при 100° в течение 10 мин для инактивации фермента, обрабатывали активированным углем (1%) при 70° в течение 20 мин, отработанный уголь отделяли фильтрованием и фильтрат выпаривали при 45-50° под вакуумом до содержания сухих веществ 60%.

**Очистка трансгликозилированных продуктов.** Концентрированную реакционную смесь выдерживали в течение 10-12 ч при 10-12° для осаждения остаточного ЦД, фильтровали и фильтрат пропускали через колонку с DIAION HP-20 (1,6 x 50 см) в количестве 10% (вес/объем). Колонку промывали тремя объемами дистиллированной воды, элюцию трансгликозилированных продуктов проводили последовательно двумя объемами 20-, 40-, 80- и 96%-ного этилового спирта и растворы высушивали досуха при 45-50° под вакуумом



R1	R2	Наименование
1. $\alpha$ -Glc	H	4''-O- $\alpha$ -D-глюкозил-стевиозид
2. H	$\alpha$ -Glc	4'''-O- $\alpha$ -D-глюкозил-стевиозид
3. $\alpha$ -Glc <sup>4'</sup> <sub>a</sub> 'Glc	H	4''-O- $\alpha$ -мальтозил-стевиозид
4. $\alpha$ -Glc	$\alpha$ -Glc	4'',4''-ди-O- $\alpha$ -D-глюкозил-стевиозид
5. H	$\alpha$ -Glc <sup>4'</sup> <sub>a</sub> 'Glc	4'''-O- $\alpha$ -мальтозил-стевиозид
6. $\alpha$ -Glc <sup>4'</sup> <sub>a</sub> 'Glc <sup>4'</sup> <sub>a</sub> 'Glc	H	4''-O- $\alpha$ -мальтотриозил-стевиозид
7. $\alpha$ -Glc <sup>4'</sup> <sub>a</sub> 'Glc	$\alpha$ -Glc	4''-O- $\alpha$ -мальтозил-4''-O- $\alpha$ -D-глюкозил-стевиозид
8. $\alpha$ -Glc	$\alpha$ -Glc <sup>4'</sup> <sub>a</sub> 'Glc	4''-O- $\alpha$ -D-глюкозил-4''-O- $\alpha$ -мальтозил-стевиозид
9. H	$\alpha$ -Glc <sup>4'</sup> <sub>a</sub> 'Glc <sup>4'</sup> <sub>a</sub> 'Glc	4'''-O- $\alpha$ -мальтотриозил-стевиозид

Рис. 1. Продукты  $\alpha$ -1,4-трансгликозилирования стевиозида.

Дополнительную очистку осуществляли с помощью ТСХ.

В результате было выделено девять производных (рис.1), которые существенно отличались своими вкусовыми качествами. Лучшими были признаны 4'''-O- $\alpha$ -D-глюкозил-стевиозид и 4'''-O- $\alpha$ -D-глюкозил-стевиозид (табл.1). Эти результаты согласуются с данными, полученными при использовании в качестве донора крахмала [4].

**Влияние количества фермента.** Для выявления количества вносимого фермента на эффективность процесса готовили 11,6%-ный раствор (рН 7,0) стевиозида и  $\beta$ -ЦД в соотношении 1:1 (вес/вес), добавляли различные количества ферментов, реакцию осуществляли в течение 8 ч при 45° и дополнительно 12 ч при 32°.

В случае всех исследованных ферментов с увеличением количества биокатализатора повышалась степень трансферазной реакции. Однако суммарный выход 4''-O- $\alpha$ -D- и 4'''-O- $\alpha$ -D-глюкозил-стевиозидов достигает максимума при использовании 8-9 единиц фермента на 1г стевиозида для ЦГТаз *B.macerans* и *B.stearothermophilus*, 11-11,5 единиц для фермента *B.circulans* и 15-16 единиц для ЦГТаз, продуцируемых *B.halophilus* и

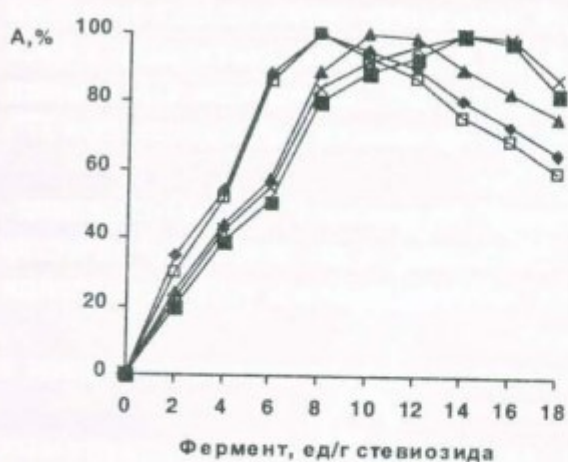


Рис.4. Суммарный выход (А, %) 4''-О-α-D- и 4'''-О-α-D-глюкозил-стевииозидов в зависимости от количества добавляемой ЦГТазы. (1), *B.macerans*; (2), *B.stearothermophilus*; (3), *B.circulans*; (4), *B.halophilus*; (5), *B.alcalophilus*.

*B.alcalophilus* (рис.4).

Влияние соотношения и концентрации субстратов. На трансгликозилирование стевииозида определенное влияние оказывает также соотношение исходных компонентов в реакционной смеси. Для выявления оптимального варианта, готовили 11,6%-ный раствор стевииозида и циклодекстрина в различных соотношениях, добавляли оптимальные количества ЦГТаз. Реакцию осуществляли в течение 8 ч при 45° и дополнительно

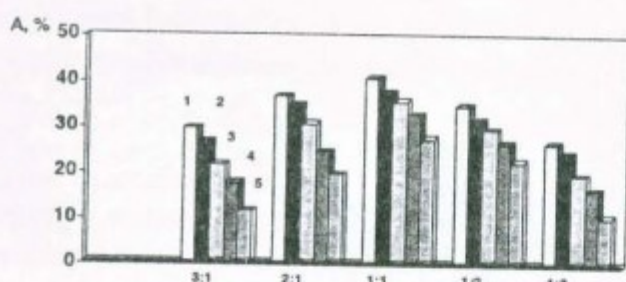


Рис.5. Суммарный выход (А, %) 4''-О-α-D- и 4'''-О-α-D-глюкозил-стевииозидов в зависимости от соотношения стевииозида и бета-ЦД. (1), *B.macerans*; (2), *B.stearothermophilus*; (3), *B.circulans*; (4), *B.halophilus*; (5), *B.alcalophilus*.

12ч при 32°. Выявлено, что в данных условиях эксперимента суммарный выход 4''-О-α-D- и 4'''-О-α-D-глюкозил-стевииозидов достигает максимума при соотношении субстратов 1:1 в/в (рис.5).

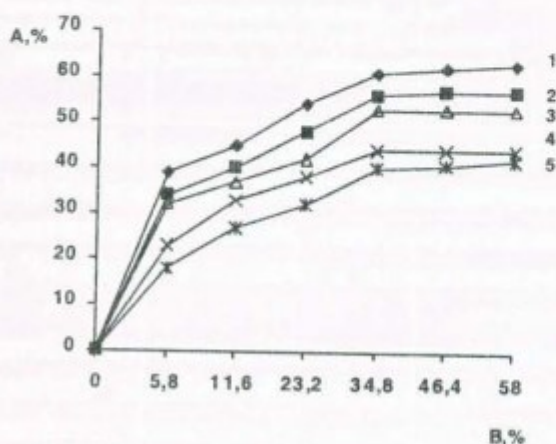


Рис.6. Влияние общей концентрации субстратов (В, %) на трансферазную активность (А, %) ЦГТаз. (1), *B.macerans*; (2), *B.stearothermophilus*; (3), *B.circulans*; (4), *B.halophilus*; (5), *B.alcalophilus*.

Эффективность трансгликозилирования повышается пропорционально увеличению общей концентрации субстратов, однако это не приводит к полному устранению горечи и послевкусия. По вкусовым качествам конечного продукта наилучшей выбрана концентрация 11,6% при весовом соотношении стевииозида и циклодекстрина 1:1 (рис.6).

Таким образом, в результате проведенных сравнительных исследований впервые показано, что ЦГТазы экстремофильных микроорганизмов, помимо

ферментов, продуцируемых *V.masegans*, могут быть эффективными биокатализаторами в реакциях трансгликозилирования стевииозидов. Причем, вместо крахмала в качестве донора могут быть использованы различные ЦД. При этом существенно облегчается процесс очистки конечного продукта, а также уменьшается суммарное количество производных стевииозидов с более длинными углеводными цепочками и линейных олигосахаридов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Абеян В.А., Балаян А.М., Манукян Л.С., Афян К.Б., Меликсетян В.С., Андреасян Н.А., Маркосян А.А.* Прикл. биохимия и микробиология. 38, 6, 616-624, 2002.

ISSN 1998-2666. Товари і ринки. 2018. №4

УДК 641.56:616.279-008.64 DOI: [https://doi.org/10.31617/tr.knute.2018\(28\)04](https://doi.org/10.31617/tr.knute.2018(28)04)

**Ірина ВЛАСЕНКО** д. м. н., професор, завідувач кафедри товарознавства, експертизи та торговельного підприємництва Вінницького торговельно-економічного інституту Київського національного торговельно-економічного університету  
 вул. Соборна, 87, м. Вінниця, 21000, Україна  
 E-mail: [vlasenkoiril@gmail.com](mailto:vlasenkoiril@gmail.com)  
 ORCID ID: 0000-0001-9995-2025

**Володимир ВЛАСЕНКО** д. б. н., професор кафедри туризму та готельно-ресторанної справи Вінницького торговельно-економічного інституту Київського національного торговельно-економічного університету  
 вул. Соборна, 87, м. Вінниця, 21000, Україна  
 E-mail: [vlasenkoiril@gmail.com](mailto:vlasenkoiril@gmail.com)  
 ORCID ID: 0000-0003-3674-4370

РИНКОВІ  
ДОСЛІДЖЕННЯ

## ВИРОБНИЦТВО ПРОДУКТІВ СПЕЦІАЛЬНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ ДЛЯ ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ

*Розглянуто стан та тенденції розвитку вітчизняного виробництва спеціальних продуктів харчування для хворих на цукровий діабет. Проаналізовано основні функціональні складові цих продуктів та їхній вплив на організм людини. Окреслено заходи, необхідні для покращення забезпеченості продуктами спеціального призначення хворих на цукровий діабет.*

**Ключові слова:** цукровий діабет, спеціальні продукти харчування, цукрозамінники, діабетичні вироби.

*Власенко И., Власенко В. Производство продуктов питания для больных сахарным диабетом. Рассмотрено состояние и тенденции развития отечественного производства специальных продуктов питания для больных сахарным диабетом. Проанализированы основные функциональные составляющие этих продуктов и их влияние на организм человека. Очерчены меры, необходимые для улучшения обеспечения продуктами специального назначения больных сахарным диабетом.*

**Ключевые слова:** сахарный диабет, специальные продукты питания, сахарозаменители, диабетические продукты.

- обов'язково вказувати на маркуванні продуктів наявність підсолоджувачів.

Україна належить до небагатьох країн, де культивується природний цукрозамінник – *стевія*, яка є надійною альтернативою цукру, оскільки, на відміну від інших натуральних видів цукру, має низький глікемічний індекс.

Цукрозамінник стевіозид має цілу низку корисних властивостей. *По-перше* – він знижує рівень холестерину, сприяє виведенню радіонуклідів, прискорює відновлення клітин. *По-друге* – він позитивно впливає на систему крові – знижує коагуляцію та зміцнює кровоносні судини. *По-третє* – сповільнює розвиток пухлин. Окрім того, стевіозид справляє жовчогінну й протизапальну дію, сприяє нормальній роботі печінки та підшлункової залози. Вироби, виготовлені з використанням цього цукрозамінника, кращі, ніж з іншими, адже більш натуральні. У супермаркетах можна придбати мармелад, желе, натуральний шоколад із цукрозамінниками на основі стевії.

На сьогодні продукти переробки стевії затверджені як харчова добавка в багатьох країнах світу, зокрема, країнах Північної Америки, Латинської Америки, Азіатсько-Тихоокеанського регіону, Європи, таких як Франція, Швейцарія [10].

Зараз основними виробниками стевії є Китай і Парагвай, хоча вирощують її також в Бразилії, США, В'єтнамі, Новій Зеландії та інших країнах.

Починаючи з 1996 р., на території України в промислових масштабах стевію вирощували переважно підприємства, які розташовувалися на території АР Крим. Наразі стевію і продукти її переробки виробляють компанії "Стевіасан" (с. Старе Бориспільського р-ну Київської обл.) та "Арт-Лайф", ТОВ "Стевіан" (Волинська обл.), ПП "Стевія" (м. Харків), ПП "Сладіс" (м. Київ), ТОВ "Артемізія" (Миколаївська обл.) та ін. Найбільш конкурентоздатним виробником стевії є група компаній "Стевія" [10].

В Україні вирощування стевії здійснюється на площі майже 20 га, що не забезпечує потребу вітчизняних переробних підприємств у сировині. Задля отримання продуктів її переробки (концентрату, стевіозиду тощо) здійснюється імпорт сировини з інших країн-виробників [11].

Такі продукти як стевіозид, стевіасан є лише сходиною до розвитку цілої галузі натуральних підсолоджувачів на рослинній основі. Розробки в цій галузі триватимуть, оскільки потреба в натуральних, безпечних і корисних підсолоджувачах лише зростатиме.

Дедалі більше використовується *мальтитол* (харчова добавка Е 965) – підсолоджувач натурального походження, який активно застосовується в кулінарії, вводиться в продукти харчування та готові страви. Його випускають у вигляді порошку або сиропу. Підсолоджувач має приємний смак, значно нижчу порівняно з цукром калорійність (2.1 та 4.0 ккал/г відповідно) та вдвічі менший глікемічний індекс



**СТРОЕВА СВЕТЛАНА СЕРГЕЕВНА**

**ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА АЛЬФА-СПЕЦИФИЧНОЙ  
ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ ПРИРОДНЫХ  
ИСТОЧНИКОВ И РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТНОГО  
ПРЕПАРАТА НА ЕГО ОСНОВЕ**

**Специальность 05.18.10 - Технология чая, табака и биологически активных  
веществ и субтропических культур**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук**

Москва – 2006

1) Получение препарата альфа-ЦГТ-аза ГЗХ: Фугат культуральной жидкости (14дм<sup>3</sup>) подвергали концентрированию в 2,4 раза на вакуум-выпарной установке УВВ-50. Концентрат в объеме 5,9 дм<sup>3</sup> сушили без добавления наполнителей в распылительной сушилке СРЦ-1,2/09ВК (РСЛ-10). Выход воздушно-сухого препарата альфа-ЦГТ-аза ГЗХ составил 12,68 г/ дм<sup>3</sup> (общий выход препарата - 202,3 г).

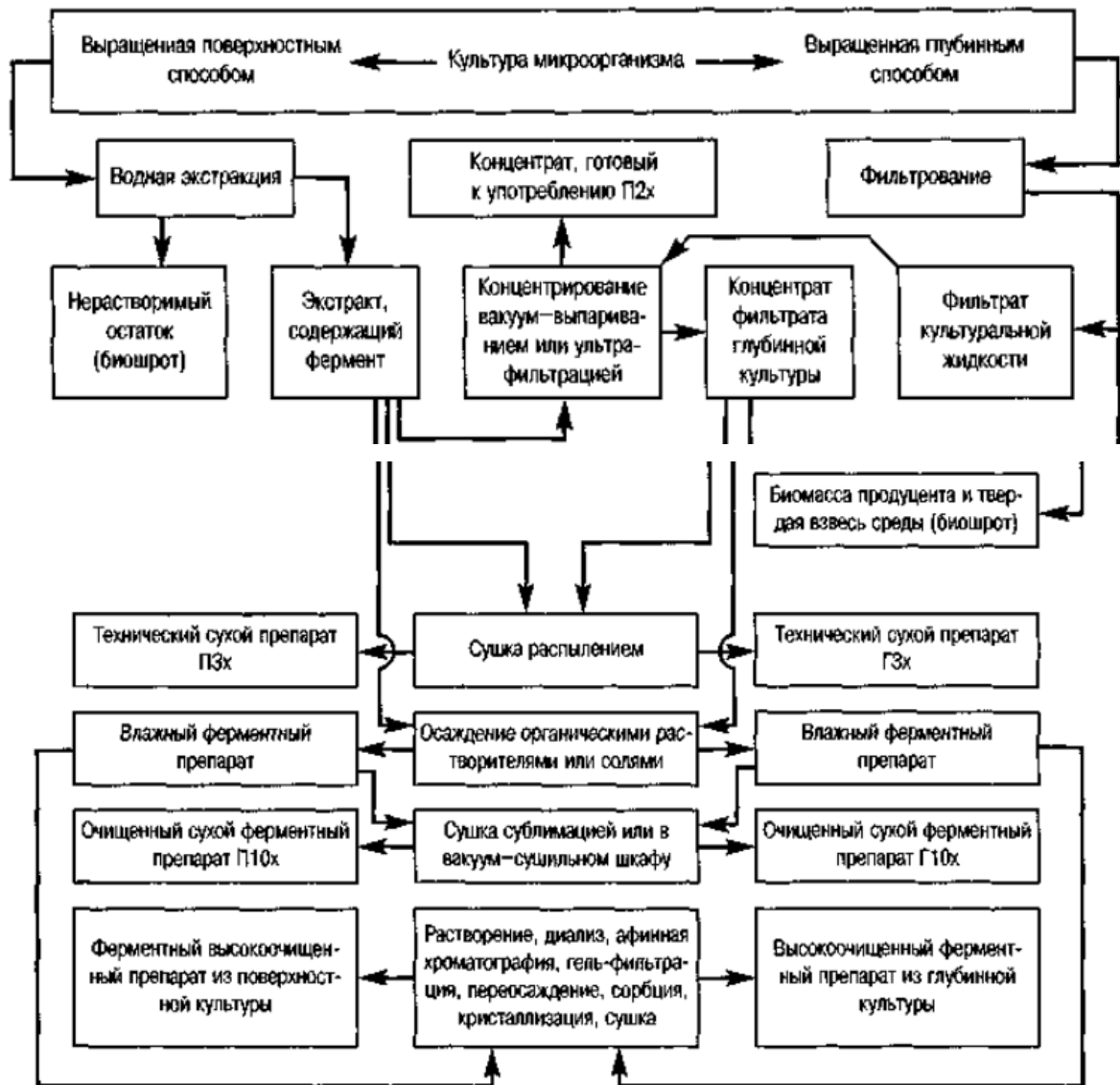
Активность альфа-ЦГТ-азы в готовом препарате составила 2 430 ед/г, удельная активность 6,47 ед/мг белка. Оптимум действия препарата: рН – 6,2; t - 40<sup>0</sup>С.

2) Получение препарата альфа-ЦГТ-аза Г10Х: фугат культуральной жидкости (14дм<sup>3</sup>) подвергали концентрированию в 2,4 раза на вакуум-выпарной установке УВВ-50. Концентрат в объеме 5,9 дм<sup>3</sup> охлаждали до 2<sup>0</sup>С. Осаждение ферментов вели периодически в емкости объемом 10 дм<sup>3</sup> охлажденным этанолом при соотношении этанол : концентрат 4:1. Сформировавшийся осадок отделяли на центрифуге Т24Д, перерастворяли в небольшом количестве воды и сушили без добавления наполнителей в сушилке лиофильной "AdVantage". Выход воздушно-сухого препарата альфа-ЦГТ-аза Г10Х составил 10,85 г/ дм<sup>3</sup> (общий выход препарата - 173,5 г). Активность альфа-ЦГТ-азы в готовом препарате составила 2 937,3 ед/г, удельная активность 15,53 ед/мг белка. Оптимум действия препарата: рН – 6,2; t - 40<sup>0</sup>С.

### 1.6.1. Принципиальная схема получения ферментных препаратов

Схема очистки фермента от балластных веществ сводится к освобождению его от нерастворимых веществ, сопутствующих растворимых веществ и

Принципиальная схема получения очищенных ферментных препаратов из культур микроорганизмов



---

**УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ  
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ**

---

**И. М. ГРАЧЕВА, А. Ю. КРИВОВА**

# **ТЕХНОЛОГИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

---

**ИЗДАНИЕ ТРЕТЬЕ, ПЕРЕРАБОТАННОЕ И ДОПОЛНЕННОЕ**

Допущено Министерством образования Российской Федерации в качестве учебника для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Биотехнология» направления подготовки дипломированных специалистов «Биотехнология»