

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)

Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)

(підпис)

«__» лютий 2026 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНИКОВ
(ім'я та прізвище)

(підпис)

«__» лютий 2026 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: Біосинтез лаккази *Geobacillus* sp.

Виконала: здобувачка 5 курсу, групи 1

БАБІНА Юлія Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАБНИКОВ Віктор Петрович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

Коваль Р.В.

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувачка

(підпис)

Київ – 2026 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“01” грудня 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БАБІНА Юлія Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез лаккази *Geobacillus* sp.
керівник роботи СТАБНИКОВ Віктор Петрович, д.т.н., проф.,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 листопада 2025 року № 957к

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2026

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Geobacillus* sp., цільовий продукт: лаккази, об'єм ферментера 10 м³, коефіцієнт заповнення 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Розділ 1. Характеристика лаккази. Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування. Розділ 4. Біосинтез лаккази. Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Розділ 6. Специфікація обладнання. Розділ 7. Опис технологічної схеми. Розділ 8. Основні етапи виділення та очищення лаккази. Розділ 9. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва лаккази – 2 аркуша формату А1.

Апаратурна схема виробництва лаккази – 2 аркуша формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 грудня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Характеристика лаккази	01.12.2025-03.12.2025	
2	Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	04.12.2025-19.12.2025	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	20.12.2025-25.12.2025	
4	Розділ 4. Біосинтез лаккази	26.12.2025-01.01.2026	
5	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	02.01.2026-09.01.2026	
6	Розділ 6. Специфікація обладнання	10.01.2026-11.01.2026	
7	Розділ 7. Опис технологічної схеми	12.01.2026-14.01.2026	
8	Розділ 8. Основні етапи виділення та очищення лаккази	15.01.2026-17.01.2026	
9	Розділ 9. Контроль виробництва	18.01.2026-22.01.2026	
10	Оформлення пояснювальної записки	23.01.2026-25.01.2026	
11	Виконання графічної частини проекту	26.01.2026-30.01.2026	

Здобувач

_____ (підпис)

Юлія БАБІНА

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Віктор СТАБНІКОВ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці біотехнологічного підходу до одержання технічного ферментного препарату лаккази бактеріального походження для застосування у процесах біовідбілювання макулатури. Актуальність дослідження зумовлена зростаючою потребою у впровадженні екологічно безпечних та ресурсозберігаючих технологій у целюлозно-паперовій промисловості, зокрема заміни або зменшення використання агресивних хімічних реагентів біокаталітичними методами.

З технологічної та економічної точок зору обґрунтовано використання періодичного режиму культивування, який характеризується простотою апаратурного оформлення, зниженими капітальними та експлуатаційними витратами, а також зручністю контролю фаз росту культури. Показано, що поєднання термофільного режиму та аеробного культивування дозволяє зменшити ризик контамінації та підвищити стабільність процесу, що має важливе значення для промислової реалізації.

У роботі розглянуто основні методи технологічного контролю процесу культивування, зокрема контроль температури, рН, швидкості перемішування та аерації, а також моніторинг росту культури та біологічної активності культурального продукту. Застосування зазначених методів контролю забезпечує відтворюваність процесу та створює передумови для його подальшої оптимізації і масштабування.

Робота складається зі вступу, 9 розділів та списку використаної літератури. Наведено 51 літературних джерела та 61 електронних посилань в тексті. Показано 7 рисунків та 12 таблиць. Технологічна та апаратурна схеми складаються з 2 листів формату А1.

Ключові слова: лаккази, *Geobacillus* sp., глибинне культивування, технічний ферментний препарат, розпилувальне сушіння, біовідбілювання макулатури.

ABSTRACT

The qualification thesis is devoted to the development of a biotechnological approach for obtaining a technical enzyme preparation of bacterial laccase intended for application in waste paper biobleaching processes. The relevance of the study is determined by the growing need to implement environmentally friendly and resource-efficient technologies in the pulp and paper industry, particularly to replace or reduce the use of aggressive chemical reagents through biocatalytic methods.

From technological and economic perspectives, the use of batch cultivation is substantiated, as this mode is characterized by simple equipment design, reduced capital and operating costs, and convenient control of microbial growth phases. It is shown that the combination of thermophilic conditions and aerobic cultivation reduces the risk of contamination and increases process stability, which is of significant importance for industrial implementation.

The study considers the main methods of technological control of the cultivation process, including monitoring of temperature, pH, agitation rate, and aeration, as well as control of culture growth and biological activity of the culture product. The application of these control methods ensures process reproducibility and creates prerequisites for further optimization and scale-up.

The thesis consists of an introduction, nine chapters, and a list of references. A total of 51 literature sources and 61 electronic references are cited in the text. The work includes 7 figures and 12 tables. The technological and equipment flow diagrams are presented on two A1-format sheets.

Keywords: laccase, *Geobacillus* sp., submerged cultivation, technical enzyme preparation, spray drying, waste paper biobleaching.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАККАЗИ.....	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	20
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	21
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	23
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	24
3.1. Розрахунок потреби у цільовому продукті.....	24
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	27
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і геометричного об'єму ферментера.....	28
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	29
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЛАККАЗИ.....	32
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	32
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	34
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ..	39
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	39
5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	43
5.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	45
5.3.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	47
5.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	48

5.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	51
5.4. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу цільового продукту.....	52
5.5. Обґрунтування вибору піногасника.....	52
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	54
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	57
РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛАККАЗИ.....	67
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	71
9.1. Мікробіологічний контроль.....	71
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	73
9.2.1. Визначення концентрації біомаси.....	73
9.2.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю.....	74
9.2.3. Визначення концентрації та активності лаккази.....	77
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	79

ВСТУП

Сучасна паперова промисловість є однією з ключових галузей, що визначають рівень розвитку економіки та культуру споживання інформаційних і пакувальних матеріалів (Aytaç, & Korkmaz, 2022). Традиційні технології виробництва паперу, зокрема процеси відбілювання пульпи, базуються на застосуванні значних кількостей хімічних реагентів, серед яких особливе місце займають хлор та його похідні. Незважаючи на високу ефективність, такі методи відбілювання призводять до утворення органохлорованих сполук, що становлять серйозну екологічну загрозу, а також зумовлюють зростання витрат на очищення стічних вод (Sharma, Bhardwaj, & Singh, 2020).

У цьому контексті особливого значення набуває впровадження біотехнологічних методів, які відповідають принципам сталого розвитку та дозволяють поєднувати високу якість продукції з екологічною безпекою виробництва. Одним із перспективних рішень є застосування ферментів, зокрема лаккази — мідьвмісного оксидоредуктазного ферменту, що каталізує окиснення широкого спектра фенольних і ароматичних сполук. Завдяки цим властивостям лаккази може бути використана у процесах біовідбілювання пульпи, що дозволяє істотно знизити споживання хімічних реагентів, скоротити обсяги утворення токсичних відходів та підвищити якість кінцевої продукції (Ansari et al., 2021; Atalah, & Blamey, 2022; Singh, & Arya, 2019).

Розробка вітчизняного біотехнологічного виробництва лаккази є актуальним завданням для України, адже вітчизняні целюлозно-паперові підприємства перебувають на етапі модернізації та потребують впровадження екологічно безпечних і ресурсозберігаючих технологій. Вибір саме цього напрямку зумовлений необхідністю поєднання екологічних вимог із економічною ефективністю виробництва, а також світовими тенденціями переходу до біотехнологічних методів обробки сировини.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Бабіна Ю.С.</i>				<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						7	85
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Новизною роботи використання штаму *Geobacillus* sp. ID17, що синтезує лакказу з активністю 400 Од/мл (неочищеного ферменту в культуральній рідині) (Atalah, & Blamey, 2022).

РОЗДІЛ 1

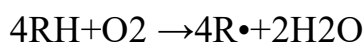
ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАККАЗИ

Лакказа (ЕС 1.10.3.2) — це мідьвмісний оксидазний фермент, що належить до класу оксидоредуктаз. Вона каталізує окислення широкого спектра ароматичних сполук, зокрема фенолів, поліфенолів, ариламінів та деяких неароматичних сполук, із одночасним відновленням молекулярного кисню до води. Завдяки здатності окиснювати багато структурно різних сполук без потреби у додаткових коензимах, лакказа привертає значну увагу дослідників у галузі біотехнології, екології, медицини, харчової та текстильної промисловості (Aza, & Samarero, 2023).

Фермент був вперше виявлений наприкінці XIX століття в соку лакового дерева (*Rhus vernicifera*), але найбільш активно досліджуваними джерелами лакказ є базидієміцети, зокрема дереворуйнівні гриби, такі як *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*. Крім грибів, лакказу продукують також деякі бактерії (наприклад, *Streptomyces*, *Azospirillum*, *Bacillus*), а також вищі рослини (Viswanath et al, 2014).

На молекулярному рівні лакказа є глікопротеїном, у складі якого присутні чотири атоми міді, що відіграють ключову роль у каталітичному процесі. Мідь розташована у трьох функціональних центрах: типу I (одна мідь), типу II (одна мідь) та типу III (дві міді), які разом утворюють так званий трикупричний центр. Центр типу I відповідає за первинний прийом електронів від субстрату, у той час як центри типу II і III забезпечують редукцію кисню до води (Ferraroni et al, 2017).

Реакція, що каталізується лакказою, має такий вигляд (Lin et al, 2023):



де RH — фенольна або подібна до неї сполука, а R• — радикал, що утворюється після відщеплення електрона.

Фізико-хімічні властивості лаккази залежать від виду-продуцента, умов

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Бабіна Ю.С.				РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАККАЗИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Стабніков В.П.						9	85
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

культивування та ступеня очищення препарату. Здебільшого лаккази має молекулярну масу в межах 50–100 кДа, хоча деякі гомо- або гетеродимерні форми можуть мати більшу масу. Глікозилювання ферменту впливає не лише на його розмір, а й на стабільність до високих температур і коливань рН (Gałązka, Jankiewicz, & Szczepkowski, 2023).

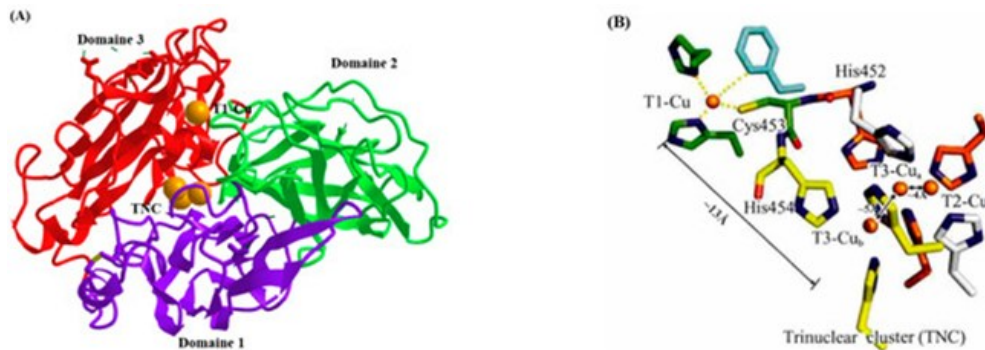


Рис.1.1. Кристалічна структура лаккази у *Trametes versicolor*: (А) Загальна структури; (В) схематичне зображення структури чотирьох мідних сайтів (Lin et al, 2023).

Оптимальні умови дії лаккази варіюють: грибні форми найактивніші при рН 3,0–5,0 та температурі 40–55 °С, тоді як бактеріальні — при рН до 8,0 та температурі до 70 °С. Ізоелектрична точка зазвичай становить 3,5–6,0, що враховується під час очищення методом ізоелектрофокусування (Wikee et al, 2019).

Фермент чутливий до інгібіторів, особливо до хелатуючих агентів (EDTA), іонів важких металів, а також аніонів, які блокують мідні центри (азиди, ціаніди, фториди). При цьому активність ферменту може бути стабілізована додаванням специфічних буферів та поліолів (Couto, & Herrera, 2006).

Завдяки мідному центру типу I, лаккази має інтенсивне синє забарвлення, що дозволяє використовувати спектрофотометричні методи для моніторингу активності (Conigliaro, Portaccio, Lepore, & Delfino, 2023).

Однією з особливостей лаккази є її здатність діяти на широкий спектр субстратів. Проте окиснення деяких великих або складних за структурою молекул є неможливим без участі так званих медіаторів — низькомолекулярних сполук, які передають електрони від субстрату до активного центру ферменту.

До таких медіаторів належать 2,2'-азіно-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота) (ABTS), 1-гідроксибензотриазол (HBT), сирінгін, ацетоцінон та інші (Chauhan, Goradia, & Saxena, 2017).

Завдяки своїм окислювальним властивостям лакказа знаходить широке застосування в різних галузях. У біотехнології та екології фермент використовується для біодеградації ксенобіотиків, очищення стічних вод від фенольних та барвникових забруднень, а також для біообробки целюлозовмісної сировини. У харчовій промисловості лакказа використовується для зменшення вмісту фенолів у напоях (зокрема у виноробстві та виробництві соків), покращення кольору та стабільності продуктів. У медицині фермент досліджується як можливий компонент антибактеріальних та антиоксидантних препаратів, а також як інструмент у біосенсорних системах для виявлення фенольних сполук та діагностики захворювань (Paraschiv et al, 2022).

У наукових, фармацевтичних та промислових цілях лакказа випускається у кількох формах, кожна з яких має свої переваги (Gałązka, Jankiewicz, & Szczepkowski, 2023):

Ліофілізована (порошкоподібна) форма – найпоширеніша. Забезпечує тривалий термін зберігання, можливість точної дозування та легке розчинення перед використанням. Застосовується в аналітичних наборах, для дослідницьких цілей, в біосенсорах (Gałązka, Jankiewicz, & Szczepkowski, 2023).

Розчин у буфері – готовий до використання препарат, зручний у ферментативних реакціях, біоаналітичних тестах. Часто містить стабілізатори (гліцерин, сорбітол), що забезпечують збереження активності при зберіганні (Agrawal, & Verma, 2019).

Імобілізована лакказа – фермент, закріплений на твердому носії (гелі, силікагелі, полімері або пористому склі). Така форма є зручною для багаторазового використання, зокрема в біореакторах, фільтрах для очищення стічних вод та при деградації барвників (Costa et al, 2019).

Рекомбінантна лакказа – фермент, отриманий за допомогою генетично модифікованих мікроорганізмів, таких як *E. coli*, *Pichia pastoris* або *Aspergillus*

niger. Цей підхід дозволяє стандартизувати активність ферменту, адаптувати його під необхідні параметри рН, температури, та модифікувати властивості шляхом білкової інженерії (Välimets et al, 2023).

Комерційні препарати – лаккази, що виробляються великими біотехнологічними компаніями (наприклад, Novozymes, Sigma-Aldrich, Aum Enzymes). Ці препарати адаптовані до використання у конкретних виробничих процесах: знебарвлення барвників у текстильній промисловості, обробка вин, модифікація полімерів (Kaczmarek, Kwiatos, Szczesna-Antczak, & Bielecki, 2017).

РОЗДІЛ 2
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА
БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

У контексті біосинтезу лаккази значну увагу останніми роками приділяють бактеріальним продуцентам, здатним до синтезу ферментів з підвищеною термостабільністю, широким діапазоном дії та високою вихідною активністю. У якості біологічного агента для біосинтезу лаккази в даній роботі обрано представника роду *Geobacillus* — грампозитивного, термофільного, спороутворювального аеробного мікроорганізму. Такий вибір зумовлений сукупністю біохімічних і технологічних переваг, які роблять цей рід перспективним у промисловій біотехнології ферментів, зокрема лакказ (Jaiswal, & Jaiswal, 2024).

Лакказа (ЕС 1.10.3.2) — це мідьвмісний оксидоредуктазний фермент, який каталізує одностадійне окиснення широкого спектра ароматичних і фенольних сполук із супутнім відновленням кисню до води. Традиційно продуцентами лаккази є базидіальні гриби, однак останнім часом зростає зацікавленість у бактеріальних лакказах через низку переваг: простішу структуру, меншу молекулярну масу, кращу експресію в хост-організмах і стабільність у несприятливих умовах (Su, Fu, Wang, Silva, & Cavaco-Paulo, 2018).

До основних переваг використання бактерій роду *Geobacillus* для синтезу лаккази належать (Chauhan, Goradia, & Saxena, 2017; Khaswal, Chaturvedi, Mishra, K., Kumar, & Paul, 2022):

Висока термостійкість — бактерії ростуть у температурному діапазоні 50–75 °С, що забезпечує зниження ризику контамінації при культивуванні та підвищення швидкості метаболічних процесів.

					НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.	Бабіна Ю.С.				РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА				
Перевір.	Стабніков В.П.			Літ.				Арк.	Аркушів
Реценз.								13	85
Н. Контр.				Кафедра БТМ					
Затверд.	Стабніков В.П.								

Ферментативна стабільність — лаккази, отримані від *Geobacillus*, стабільні до дії високих температур і широкого діапазону рН, що дозволяє їх застосовувати у промислових умовах.

Швидке нарощування біомаси — короткий лаг-період і простіші поживні потреби, порівняно з грибами, дозволяють ефективніше використовувати ресурси.

Безпечність та відсутність патогенності — штами *Geobacillus* не є патогенними, що дозволяє знизити ризики при виробництві біопрепаратів.

Наявність науково підтверджених даних про продукування лакказоподібних ферментів — зокрема, штами *Geobacillus* sp. WSUCF1, *G. thermocatenuatus* та *G. thermoleovorans* продемонстрували здатність синтезувати активні фенолоксидази. Ці ферменти демонструють ефективне окиснення типових лакказних субстратів, таких як АВТS, сирингалгін, гваякол тощо (Khaswal, Chaturvedi, Mishra, K., Kumar, & Paul, 2022).

Крім того, важливо зазначити, що бактеріальні лаккази мають меншу молекулярну масу та спрощену структуру порівняно з грибними аналогами, що спрощує їх рекомбінантне продукування та очищення. Такі ферменти можуть бути ефективно використані у біоочищенні стічних вод від фенольних забруднювачів, знебарвленні текстильних барвників, виробництві біопластиків, паперу та біопалива, а також у створенні біосенсорів нового покоління (Chauhan, Goradia, & Saxena, 2017).

З табл.2.1. можна відзначити, що активність лаккази *Geobacillus* sp. ID17 є найвищою в культуральній рідині та становить 400 Од/мл. Найнижча активність ферменту притаманна для штаму *G. stearothermophilus* MB600 та становить всього 4,49 г/л. Щодо цього штаму, виникають сумніви щодо правильності розрахунків кількості очищеної лаккази, що становить 7,17 г/л (тобто неочищеної має бути ще більше). Такий висновок виникає через низький вміст азотвмістних сполук, що будуть активно використовуватись для синтезу ферменту, не кажучи вже за біомасу. Також, показник кількості лаккази було

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів лаккази

Продуцент	Склад поживного середовища в г/л	Активність ферменту, Од/мл	Концентрація ферменту, г/л	Умови культивування	Література
<i>Geobacillus kaustophilus</i> TP-02	Триптон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, NaCl – 5, Гваякол – 1, CuSO ₄ – 0,016	93,39	114 – неочищеного, 0,488 - очищеного	24 год, 60 °С, внесення 2% інокуляту	Mar et al, 2020
<i>Geobacillus</i> sp. ID17	Пептон – 5,00 Дріжджовий екстракт – 1,00 Fe(III) цитрат – 0,10 NaCl – 19,45 MgCl ₂ – 5,90, Na ₂ SO ₄ – 3,24 CaCl ₂ – 1,80, KCl – 0,55 NaHCO ₃ – 0,16, KBr – 0,08 SrCl ₂ – 0,034 H ₃ BO ₃ – 0,022 Na ₂ SiO ₃ – 0,004 NaF – 0,0024 (NH ₄)NO ₃ – 0,0016 Na ₂ HPO ₄ – 0,008	400	Не вказано	24 год, 55 °С, pH 7,0	Atalah, & Blamey, 2022

Закінчення табл.2.1.

<p><i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1</p>	<p>Необроблені відходи кукурудзи (кукурудзяна піч) – 5, Крафт-лігнін – 0,25, KNO₃ – 0,25 KH₂PO₄ – 0,10 MgSO₄ – 0,10 Дріжджовий екстракт – 0,10 Na₂MoO₄ – 0,005 CaCl₂ – 0,02</p>	<p>9,23 ± 0,6</p>	<p>Не вказано</p>	<p>144 год, 60 °С, рН 7,0, 150 об/хв</p>	<p>Govil et al, 2020</p>
<p><i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> MB600</p>	<p>CaCl₂ – 0,01 Пептон – 5,0 Na₂HPO₄ – 2,4 D-глюкоза – 10,0 NH₄NO₃ – 0,1 K₂HPO₄ – 2,0 MgSO₄ – 0,01 Гваякол – 0,062 Розчин мікроелементів (1 мл/л) (мг/л): Титріплекс III – 500 FeSO₄·7H₂O – 200 ZnSO₄·7H₂O – 10 MnCl₂·4H₂O – 3 H₃BO₃ – 30 CoCl₂·6H₂O – 20 CuCl₂·2H₂O – 1 NiCl₂·6H₂O – 2 Na₂MoO₄·2H₂O – 3</p>	<p>4,49</p>	<p>7,17 - очищеного</p>	<p>72 год, 80 °С, рН 6,0, статичні умови</p>	<p>Bibi, Yasmin, Blanford, & Safdar, 2023</p>

вказано для штаму *G. kaustophilus* TP-02. Через відсутність даних по іншим біологічним агентам щодо концентрації ферменту, пропонується цей показник опустити та не використовувати для подальшого ґрунтового вибору, а зосередити увагу на активності лаккази в культуральній рідині.

Для більш детального порівняння пропонується визначити вартість поживного середовища, а також в подальшому умовну вартість самого ферменту. Відповідно, перерахунок показано в табл.2.2. та табл.2.3.

Таблиця 2.2.

Визначення вартості поживного середовища для одержання ферменту лаккази

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації*	
<i>Geobacillus kaustophilus</i> TP-02	Триптон – 10	1320	13,2	1	
	Дріжджовий екстракт – 5	703	3,515	2	
	NaCl – 5	5	0,025	3	
	Гваякол – 1	7220	7,22	4	
	CuSO ₄ – 0,016	150	0,002	5	
	Вартість 1 л середовища ≈ 23,96 грн				
<i>Geobacillus</i> sp. ID17	Пептон – 5,00	1320	6,6	1	
	Дріжджовий екстракт – 1,00	703	0,703	2	
	Fe(III) цитрат – 0,10	340	0,034	6	
	NaCl – 19,45	5	0,097	3	
	MgCl ₂ – 5,90	28	0,165	7	
	Na ₂ SO ₄ – 3,24	16,2	0,052	8	
	CaCl ₂ – 1,80	43,5	0,078	9	
	KCl – 0,55	57	0,031	10	
	NaHCO ₃ – 0,16	38	0,006	11	
	KBr – 0,08	600	0,048	12	
	SrCl ₂ – 0,034	187	0,006	13	
	H ₃ BO ₃ – 0,022	70,8	0,002	14	
	Na ₂ SiO ₃ – 0,004	59,5	0,0002	15	
	NaF – 0,0024	840	0,002	16	
	(NH ₄)NO ₃ – 0,0016	27,3	0,00004	17	
	Na ₂ HPO ₄ – 0,008	140	0,001	18	
	Вартість 1 л середовища ≈ 7,83 грн				

Закінчення табл.2.2.

<i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1	Необроблені відходи кукурудзи (кукурудзяна піч) – 5	2,8	0,014	19	
	Крафт-лігнін – 0,25	14	0,004	20	
	KNO ₃ – 0,25	73,8	0,018	21	
	KH ₂ PO ₄ – 0,10	70	0,007	22	
	MgSO ₄ – 0,10	18,6	0,002	23	
	Дріжджовий екстракт – 0,10	703	0,07	2	
	Na ₂ MoO ₄ – 0,005	1860	0,009	24	
	CaCl ₂ – 0,02	43,5	0,001	9	
	Вартість 1 л середовища ≈ 0,125 грн				
<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> MB600	CaCl ₂ – 0,01	43,5	0,0004	9	
	Пептон – 5,0	1320	6,6	1	
	Na ₂ HPO ₄ – 2,4	140	0,336	18	
	Глюкоза – 10,0	49,8	0,498	25	
	NH ₄ NO ₃ – 0,1	27,3	0,003	17	
	K ₂ HPO ₄ – 2,0	101	0,202	26	
	MgSO ₄ – 0,01	18,6	0,0002	23	
	Гваякол – 0,062	7220	0,448	4	
	Розчин мікроелементів - 1	0,094	0,0001	-	
	Визначення вартості 1 л розчину мікроелементів – 0,094 грн				
	Титріплекс III (Трилон Б) – 0,5	74	0,037	27	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2	27,6	0,006	28	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01	52,8	0,001	29	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O – 0,003	360	0,001	30	
	H ₃ BO ₃ – 0,03	70,8	0,002	14	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O – 0,02	1950	0,039	31	
	CuCl ₂ ·2H ₂ O – 0,001	650	0,001	32	
	NiCl ₂ ·6H ₂ O – 0,002	487,2	0,001	33	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O – 0,003	1860	0,006	24	
	Вартість 1 л середовища ≈ 8,09 грн				

Примітка (ціни наведено станом на травень 2025 року): 1 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-pepton-fermentatyvnyj?srsId=AfmBOoo5kgTOaRMfsZvWmK1ut8ANqhRycgFFu87SWlbvegSy-Di4Z5pv>, 2 - <https://vianoksgel.ua/ua/p2429300269-drozhzhevoj-ekstrakt.html>, 3 - <https://www.olx.ua/d/uk/obyavlenie/artemsol-sol-pischevaya-i-tehnicheskaya-sl-harchova-ta-tehnchna-opt-pdv-IDOSShh.html>, 4 - <https://prom.ua/ua/p1867539727-gvayakol-guaiacol-aroma.html>, 5 - <https://megachem.com.ua/ua/sulfat-medi-kormovaya.html>, 6 - http://metalab.com.ua/index.php?route=product/product&path=20_26_70&product_id=459, 7 - <https://megachem.com.ua/ua/hlorid-magniia.html>, 8 - <https://www.systopt.com.ua/item-natrij-sirchanokyslyj-sulfat-natriyu?srsId=AfmBOopey8MhQSg5WyeqLWh2TJSroiR0RqoMFExTJbQxz6E1ord1B7tz>, 9 - <https://www.systopt.com.ua/item-kaltsij-hlorystyj-hloryd-kaltsiyu?srsId=AfmBOor8lcHHamBVGea4hDHeVjbtS2AziHZynfandfzCKCjAMQwlnNPE>, 10 - https://www.systopt.com.ua/item-kalij-hlorystyj?srsId=AfmBOooO_AIpz42ZZQ77PLZ0WJsKStTfx1ZWj3HPXXIby2Ku0dLTO1kj, 11 - https://divada.com.ua/p1535960631-soda-pischevaya-meshok.html?source=merchant_center&gad_source=1&gad_campaignid=20680622122&gbraid=0AAAAA_pLX_WVAX50XbTKEcavNf_pn9vftR&gclid=CjwKCAjwz_bABhAGEiwAm-P8YRkNGJEB9xs9BqJswvwaQ5ROycmEAfKr9JAUdoZjQCSQ-u-PFWMiURoCAdSQA_vD_BwE, 12 - https://www.systopt.com.ua/item-kalij-bromystyj?srsId=AfmBOorACaoJxK0S4663XWVzNQCmCX_tM9V-Hi2hQWOUVBndwLyLSkKh, 13 -

https://harkiv-torg.com.ua/ua/p825619753-strontsiy-hloristyj.html?srsltid=AfmBOooQMHqXBCJ2ahsXOL2RmapaeNia3fYL7Y9AMprUlgm8TsnZ29d3 ,	14	-
https://www.systopt.com.ua/item-bornakyslota?srsltid=AfmBOorCqQk2m69FbUKFhODLRrXGQ75d8Xw3lwqD1cCJiM9sUfbLPSwQ ,	15	-
https://xn---utbcjbgv0e.com.ua/metasilikat-natrija-5-vodnij-belgija-25-kg.html ,	16	-
https://www.systopt.com.ua/item-ftorid-natriyu?srsltid=AfmBOoo84pj76oHfEPxFMkslRs_AeLEV5ejpZ0DCeJwdkkQ2OyjLFgXg ,	17	-
https://www.systopt.com.ua/item-amiachna-selitra-azotnokyslyj-amonij-nitrat-amoniyu?srsltid=AfmBOopdRcYmaXtNPd-tQfIj4uYQiiUBVcpr9ZCM9KmJxcuDMjRfQI3- ,	18	-
https://ukrstarline.ua/himichna-produkciya/gidrofosfat-natriyu-1-zamish-bezvodnyj?srsltid=AfmBOooEIDJsdMacjT7K2X3q_xLIbaAoQcjRgitQ6YwkQnCoV-e98dPG ,	19	-
https://flagma.ua/uk/vidkhody-kukurudzy-1-i-ta-2-i-katehorii-o4373978.html ,	20	-
https://www.alibaba.com/product-detail/HOSOME-Kraft-Lignin-Natural-Water-Reducer_1601226059332.html?spm=a2700.7724857.0.0.6caf5c7eWygNVJ ,	21	-
https://www.systopt.com.ua/item-kalijna-selitra-kalij-azotnokyslyj-nitrat-kaliyu?srsltid=AfmBOoq1WcrrEAgAP_aJaJ62otHUjLWUyelXluqFEbSbcgpo71MfE9M7 ,	22	-
https://harkiv-torg.com.ua/ua/p774255158-monofosfat-kaliya.html?srsltid=AfmBOooxIS_X55O_1kuq_mSQ94GFnVue76EKamgEZaspAlfsCXhCkdvj ,	23	-
https://www.systopt.com.ua/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu?srsltid=AfmBOorRrTyYPFiUhjPq841nxq2Ky9ucdYrgBOgkWzb2vB70eHdW5H- ,	24	-
https://www.systopt.com.ua/item-natrij-molibdenovokyslyj-molibdat-natriyu?srsltid=AfmBOor9uXJj57dwXxfhz-1TVz1h4BqTrOgvl2LQBgNOZnUCbOLxBtbs ,	25	-
https://www.systopt.com.ua/ru/item-glyukoza?srsltid=AfmBOop9ZD_rYuee0yBiV_Jqd2tJ8orNTThK4tYiVBoOYAe8IvQ1b0RM ,	26	-
https://megachem.com.ua/ua/kalij-fosformokislyj-tehnicheskij.html ,	27	-
https://www.systopt.com.ua/item-zalizo-sirchanokyslye-7-vodne?srsltid=AfmBOor2ZdOTGAVWxo-1uI4u90_x6-U-ZsHzdmpZ3uToHzDN6fl_iYwa ,	28	-
https://www.systopt.com.ua/ru/item-tsynk-sirchanokyslyj-sulfat-tsynku?srsltid=AfmBOooPSpMDAYQnHOayf78Bso_Y5rttAlKWIS1YMCWYzprgyzcdiMJW ,	29	-
https://www.systopt.com.ua/item-marganets-hlorystyj-hloryd-margantsyu?srsltid=AfmBOorcXqp4Qorq8umX2hL-d94g9zF3Ry7QDdfNSidWpIIlaQjTc48k ,	30	-
https://www.systopt.com.ua/ru/item-kobalt-hlorystyj-hloryd-kobaltu-6-vodnyj?srsltid=AfmBOopBUlx6-Zr4O-z-RXHDCWAGnSX6T-ffMyg7WtErsinOkIe98Vo ,	31	-
https://www.covalent.com.ua/ru/shop/copper_chloride/ ,	32	-
https://www.systopt.com.ua/item-nikel-hlorystyj-hloryd-nikelyu?srsltid=AfmBOoqpRcGLafeeZvY_W0NBCQQapij10D8LQhSsEf3611HrqrRq7SvZ	33	-

Тож, спираючись на інформацію з табл.2.2. найменша вартість поживного середовища притаманна для *Geobacillus* sp. WSUCF1. Найдорожче середовище використовується для культивування *G. kaustophilus* TP-02 та коштує більше 20 грн/л. Для кінцевого визначення продуценту лаккази пропонується визначити умовну вартість грн/Од ферменту, оскільки з табл.2.1. було зроблено висновок про неможливість коректного порівняння зазначених даних щодо концентрацій лаккази в статтях. Відповідно, узагальнене порівняння показано в табл.2.3.

Визначення важливих параметрів щодо продуценту лаккази

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Активність лаккази, Од/мл	Умовна вартість 1 Од лаккази, грн/Од	Тривалість культивування, год	Кількість утворених Од лаккази за годину, Од/год
<i>Geobacillus kaustophilus</i> TP-02	23,96	93,39	0,256	24	3,89
<i>Geobacillus</i> sp. ID17	7,83	400	0,019	24	16,66
<i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1	0,125	9,23 ± 0,6	0,013	144	0,064
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> MB600	8,09	4,49	1,8	72	0,062

Отже, за фінальним порівнянням пропонується обрати штам *Geobacillus* sp. ID17. Хоча вартість по активності лаккази трохи вище за цей самий показник в *Geobacillus* sp. WSUCF1, проте кількість утворених Од лаккази за годину набагато більше, через що саме цей продуцент є найоптимальнішим серед усіх вищезазначених.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Основним джерелом карбону та азоту в середовищі є пептон та дріжджовий екстракт. Кількість карбону в таких джерелах становить близько 40%. Отже з 6 г компонентів (5 г пептону та 1 г дріжджового екстракт) можна отримати $6 \cdot 0,4 = 2,4$ г карбону. Половина іде на холосте окислення, тому доступного вуглецю залишиться $2,4 \cdot 0,5 = 1,2$ г.

Лакказа відноситься до гідролітичних ферментів. Оскільки чіткої концентрації не наведено, припускаємо, що її кількість на 1 л становить близько 1 г. Білкові струри лише на половину складаються з карбону, отже, щоб отримати 1 г ферменту необхідно 0,5 г карбону. Кількість вуглецю, яка залишиться на конструктивний метаболізм (синтез біомаси) становить $1,2 - 0,5 = 0,7$ г.

Біомаса також складається на половину з вуглецю. Тож, теоретична концентрація становитиме $0,7 / 0,5 = 1,4$ г біомаси на л поживного середовища по вуглецю.

Щодо азоту, дріжджовий екстракт та пептон містять близько 10% нітрогену. Тоді, з 6 г можна отримати 0,6 г азоту. До білкових компонентів входить 16% азоту, тобто для синтезу 1 г ферменту необхідно 0,16 г азоту. Кількість азоту яка залишиться на побудову клітини становить $0,6 - 0,16 = 0,44$ г.

До біомаси входить близько 10% азоту. Отже, з 0,44 г можна отримати $0,44 / 0,1 = 4,4$ г біомаси. Карбону буде лімітувальним фактором в середовищі.

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

Штам *Geobacillus* sp. ID17 за морфологічними ознаками належить до типової групи грампозитивних термофільних бактерій. Клітини мають форму прямих паличок довжиною 2,5–5,0 мкм і шириною близько 0,5–0,8 мкм. У фазі активного росту спостерігається наявність поодиноких або попарно розташованих клітин. Штам є рухомих завдяки наявності джгутиків, що дозволяє йому активно пересуватись у рідкому середовищі. Клітини утворюють овальні термостійкі ендоспори, розташовані субтермінально, які добре видно при фарбуванні за методом Граму або Малігіна (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010).

За Грамом штам фарбується позитивно, що свідчить про товсту пептидогліканову стінку клітин. При мікроскопії спостерігається чіткий контур клітин, гомогенна цитоплазма та добре виражені спори у стаціонарній фазі росту (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010).

Культурально *Geobacillus* sp. ID17 утворює опалесцюючий осад у рідкому середовищі з помірним помутнінням. Після 24 годин культивування при 55 °С у бульйоні збагаченого складу (пептон, дріжджовий екстракт, мінеральні солі) спостерігається зростання біомаси переважно у вигляді рівномірного каламутного шару з деяким осадом на дні. Запах відсутній або слабо виражений. На щільному поживному середовищі колонії мають округлу форму, опуклу конфігурацію, гладку поверхню і матовий білувато-жовтий відтінок, притаманний багатьом термофілам (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010).

Температурний оптимум росту становить 55 °С, з можливістю росту у межах 45–65 °С. Оптимальний рН середовища для росту — близько 7,0. За цих

умов культура досягає максимального нарощування біомаси упродовж 24 годин культивування (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010).

Штам *Geobacillus* sp. ID17 характеризується типовими для представників роду *Geobacillus* фізіолого-біохімічними особливостями, які дозволяють йому ефективно функціонувати в умовах підвищеної температури. Це термофільний мікроорганізм з температурним оптимумом росту близько 55 °С, при якому забезпечується найвищий рівень біосинтетичної активності. Діапазон температур росту становить від 45 до 65 °С, що свідчить про наявність термостабільних ферментативних систем, здатних працювати за умов підвищеної температури (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010).

Штам є облигатним аеробом — потребує кисню як кінцевого акцептора електронів у дихальному ланцюзі. Це підтверджується активним ростом на поверхні рідкого середовища при доступі кисню, а також відсутністю росту в анаеробних умовах. Важливою рисою є здатність до спороутворення, що забезпечує високу термостійкість і виживання за несприятливих умов середовища (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010).

У біохімічному аспекті *Geobacillus* sp. ID17 демонструє каталазну та оксидазну активність, що характерно для аеробних бактерій. Виявлено здатність до утилізації різних джерел вуглецю, зокрема моносахаридів (глюкоза, ксилоза), дисахаридів (сахароза), а також деяких органічних кислот. Гідролізує білкові субстрати, такі як желатина та казеїн, що свідчить про продукцію позаклітинних протеаз. Також штам може гідролізувати крохмаль, що підтверджує амілазну активність (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010).

У процесі культивування на поживному середовищі, збагаченому пептоном та дріжджовим екстрактом, спостерігається активне нарощування біомаси, що супроводжується використанням доступного органічного азоту. Продукування кислот із вуглеводів виявлено слабо або відсутнє, що притаманно багатьом аеробним спороутворювальним бактеріям (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010).

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Рід *Geobacillus* належить до домену *Bacteria*, типу *Bacillota* (раніше — *Firmicutes*), класу *Bacilli*, порядку *Bacillales*, родини *Bacillaceae*. Представники цього роду були виокремлені з роду *Bacillus* на початку 2000-х років на основі філогенетичного аналізу 16S рРНК та порівняльного вивчення фізіолого-біохімічних властивостей. Ініціатором виокремлення роду *Geobacillus* у самостійний таксон був Nazina та співавт. (2001), які описали нові види термофільних бактерій, що значно відрізнялися від *Bacillus* spp. за послідовностями генів і температурним діапазоном росту (Zeigler & The Bacillus Genetic Stock Center, 2001).

Домен: *Bacteria*

Тип: *Bacillota*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Bacillales*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: *Geobacillus*

Вид: sp.

Штам: ID17

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Розрахунок потреби у цільовому продукті

Лакказа (ЕС 1.10.3.2) належить до класу мідьвмісних оксидаз, які здійснюють окиснення широкого спектра фенольних і нефенольних ароматичних сполук із використанням молекулярного кисню як кінцевого акцептора електронів. У результаті ферментативного каталізу відбувається відновлення кисню до води, що робить даний біокаталізатор надзвичайно привабливим для практичного застосування (Mate, & Alcalde, 2017). Особливістю лаккази є її низька субстратна специфічність, завдяки чому фермент здатний діяти на велику кількість різноманітних сполук, включно з природними поліфенолами та ксенобіотиками. В природних умовах лаккази синтезуються грибами, бактеріями, комахами і навіть рослинами, де вони виконують захисні та структуроутворювальні функції (Singh et al., 2025).

З біохімічної точки зору лакказа є складним білком, активний центр якого включає чотири атоми міді, розділені на три функціональні типи (T1, T2 і T3). Вони забезпечують послідовний перенесення електронів і сприяють високій ефективності реакцій окиснення (Loi et al., 2025). Для ферментів цього типу характерний широкий діапазон оптимальних умов функціонування: активність може проявлятися як у кислому середовищі (рН 3,0–5,0), так і у нейтральному, а температурний оптимум коливається від 30 до 60 °С залежно від джерела ферменту (Gałazka, Jankiewicz, & Szczepkowski, 2023). Важливо підкреслити, що, на відміну від багатьох інших оксидаз та пероксидаз, лакказа не потребує додаткових кофакторів, окрім кисню (Fernández-Remacha et al., 2022), що значно здешевлює її застосування у промислових процесах.

Завдяки універсальності дії лакказа набула широкого поширення у біотехнології та суміжних галузях. У текстильній промисловості вона

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Бабіна Ю.С.</i>						24	85
<i>Перевір.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		

використовується для відбілювання тканин та видалення синтетичних барвників, що дозволяє скоротити використання агресивних хімічних реагентів. У целюлозно-паперовій промисловості фермент застосовується для розщеплення лігніну й біобілення паперу, завдяки чому зменшується потреба у хлорвмісних відбілювачах. У харчовій галузі лаккази знаходять застосування при стабілізації пива, вина та соків шляхом видалення фенольних сполук, які можуть спричиняти небажане помутніння; крім того, додавання ферменту до тіста позитивно впливає на його структуру та підвищує стійкість хлібобулочних виробів до черствіння (Shraddha et al., 2011; Mojsov, 2014; Paraschiv et al., 2022; Upadhyay, Shrivastava, & Agrawal, 2016).

Окремий напрямок становить біоремедіація, де лаккази використовуються для детоксикації ксенобіотиків, фенольних відходів та барвників, а також у процесах очищення стічних вод (Paraschiv et al., 2022; Gałazka, Jankiewicz, & Szczepkowski, 2023). У медичній і фармацевтичній галузях фермент розглядають як перспективний інструмент для створення біосенсорів, електрохімічних детекційних систем та як компонент у нових терапевтичних підходах. У хімічній промисловості лаккази виступає ефективним біокаталізатором у «зеленій хімії», сприяючи синтезу полімерів, модифікації лігніну та створенню екологічно безпечних клеїв і покриттів (Kudanga et al., 2011; Scheibel et al., 2024).

Вибір виробництва лаккази для біовідбілювання паперу в Україні обґрунтований низкою науково-технічних та економічних чинників. По-перше, традиційні методи відбілювання паперу, що передбачають застосування хлору та його сполук, супроводжуються утворенням органічних хлорованих сполук (АОХ), які є шкідливими для навколишнього середовища (Sharma, Bhardwaj, & Singh, 2020). Використання лаккази як біологічного каталізатора дозволяє значно знизити застосування агресивних хімічних реагентів, забезпечуючи більш екологічний процес відбілювання та зменшуючи утворення токсичних відходів.

По-друге, застосування лаккази сприяє підвищенню якості кінцевої продукції. Ферментативне відбілювання дозволяє досягти високого рівня білизни паперу без шкоди для волокон та при мінімальному використанні

хімічних компонентів (Kenealy, & Jeffries, 2003). Це, у свою чергу, знижує виробничі витрати та підвищує конкурентоспроможність продукції на ринку. По-третє, впровадження біотехнологічних методів відповідає сучасним світовим тенденціям у паперовій промисловості, де все більше уваги приділяється сталому розвитку, зменшенню екологічного сліду та оптимізації виробничих процесів (Lokko et al., 2018).

Аналіз ринку виробників паперу в Україні свідчить про наявність потенційних споживачів ферменту. Серед основних підприємств слід виділити Жидачівський целюлозно-паперовий комбінат (<https://www.zhkpaper.com/>), який спеціалізується на виробництві обгорткового паперу та картону для плоских шарів гофрування; Коростишівську паперову фабрику (<https://paper-mill.pro/>), що виготовляє крафт-папір та пакувальний обгортковий папір; Кохавинську паперову фабрику (<https://www.kpf.ua/>), яка виробляє туалетний папір, паперові рушники та серветки; а також компанію АСТЕОН (<https://ak.ua/>), що займається випуском офісного паперу для друку та копіювання. Ці підприємства використовують різні види сировини та технології виробництва, що створює передумови для адаптації ферментативного етапу відбілювання до конкретних умов виробництва.

Впровадження лаккази у процес відбілювання паперу на українських підприємствах має значний потенціал. Використання ферменту дозволить зменшити витрати на хімічні реагенти, знизити негативний вплив на навколишнє середовище та підвищити якість продукції. Для ефективного застосування лаккази необхідно провести додаткові дослідження щодо оптимальних умов ферментативного відбілювання, враховуючи типи пульпи, технологічні режими та специфіку виробничих процесів конкретних підприємств.

Високі темпи зростання паперового виробництва безпосередньо зумовлюють підвищення потреби у використанні відбілювальних реагентів. Традиційні хімічні методи відбілювання, що застосовуються нині, супроводжуються значним екологічним навантаженням, як це було зазначено раніше. У цьому контексті впровадження технологій біовідбілювання набуває

особливої актуальності. Застосування ферментних препаратів дає змогу знизити обсяг використання агресивних хімічних реагентів, зменшити енерговитрати та скоротити утворення токсичних побічних продуктів.

Нарощування виробництва паперу в Україні формує об'єктивну потребу у пошуку інноваційних, екологічно безпечних і економічно доцільних методів відбілювання. Використання біотехнологічних підходів, зокрема ферментативного біовідбілювання, є перспективним напрямом, що відповідає сучасним вимогам сталого розвитку та може забезпечити конкурентоспроможність вітчизняної паперової промисловості як на внутрішньому, так і на зовнішньому ринку.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

За 2024 рік всі галузеві підприємства по виробництву паперу та картонної продукції виготовили 137,5 тис. тонн паперу (<https://www.fixygen.ua/news/20250117/kiyvskiy-kpk-zbilshiv-obsyag-produktsiyi-na-55-u-2024-rotsi.html>). З врахуванням високої конкуренції, наявності хімічних (більш токсичних, але в тому ж контексті більш класичних) аналогів, пропонується передбачити потребу всього в 15% від зазначеної кількості, що становить:

$$137\,500 \times 0,15 = 20\,625 \text{ тонн паперу}$$

Біовідбілювання відбувається на стадії пульпи. Пульпа — це целюозна маса, отримана з деревини, рослинних волокон або макулатури, яка використовується як основна сировина для виробництва паперу та картону. Вона містить волокна, воду та незначні домішки лігніну, геміцелюлози та мінеральних компонентів, і саме її обробка визначає якість та властивості кінцевого паперу. Консистенція пульпи визначає масову частку сухої речовини у водній суспензії та є ключовим параметром, що впливає на технологічні процеси виробництва паперу. Залежно від вмісту сухої речовини виділяють три основні рівні консистенції. Низька консистенція (до 3–5 % сухої речовини) характерна для промивання та перших стадій обробки пульпи, коли її легко транспортувати і перемішувати, проте при цьому споживається значна кількість води та

відбілюючих реагентів. Середня консистенція (10–15 %) застосовується на етапах хімічної та ферментативної обробки, оскільки дозволяє ефективно поєднувати технологічну обробку з економією реагентів і води. Висока консистенція (понад 20 %) забезпечує мінімізацію водоспоживання та зниження витрат хімічних реагентів, проте створює технічні складнощі, пов'язані з високою в'язкістю пульпи, що ускладнює її текучість та обробку (<https://www.paperonweb.com/pulpupro.htm>).

Папір складається з сухої пульпи (близько 95 % маси) та залишкової води (Mboowa, 2024).

Тож, на зазначену потребу кількість сухих речовин становитиме:

$$20\,625 \times 0,95 = 19\,593,75 \text{ тонн сухих речовин}$$

Кількість лаккази яка потрібна для обробки становить 10-20 Од ферменту на г сировини (Singh et al., 2015). Для подальших розрахунків приймаємо, що нам потрібно 15 Од ферменту на г сухої речовини. Тож, необхідна загальна активність становить:

$$19\,593\,750\,000 \times 15 = 29\,390\,625\,000 \text{ Од ферменту}$$

Обраний біологічний агент (*Geobacillus* sp. ID17) дає можливість одержати лакказу, що в супернатанті має активність 400 Од/мл (Atalah, & Blamey, 2022). Отже, для забезпечення розрахованої активності потрібна наступна кількість культуральної рідини:

$$\frac{29\,390\,625\,000}{400} = 734\,765\,625 \text{ мл} \approx 734,8 \text{ м}^3$$

З врахуванням втрат на одержання технічного ферменту (близько 20%), річна потреба в культуральній рідині становитиме:

$$\frac{734,8}{(1 - 0,2)} = 918,5 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення річної потреби у лакказі (згідно п.1.2) потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 918,5 м³ культуральної рідини (V_{кр}).

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів (T_{TP}) – 230, тоді об'єм культуральної рідини за добу (V_D) становить:

$$V_D = V_{KP} / T_{TP} = 918,5/230 \approx 4 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{ЦК} = (K_1 \times V_D \times T_{ЦФ})/24 = (1,1 \times 4 \times 32,5)/24 = 5,96 \text{ м}^3/\text{цикл},$$

де $T_{ЦФ}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу ($T_K = 24$ год) та час підготовки ферментера до роботи ($T_{ПР} = 8,5$ год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

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

Визначивши об'єм культуральної рідини за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_S , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{ГФ} = V_{ЦК} / K_S = 5,96/0,6 = 9,93 \text{ м}^3.$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{ГФ} = 10 \text{ м}^3$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез клавуланової кислоти здійснюють у ферментері геометричним об'ємом ($V_{ГФ}$) 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення (K_S) 0,6.

Робочий об'єм ферментера ($V_{РОБ}$) становить:

$$V_{РОБ} = V_{ГФ} \times K_S = 10 \times 0,6 = 6 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 6 м^3 культуральної рідини потрібно:

$$V_{РОБ.1} = 6 \times 0,1 = 0,6 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування в посівному апараті об'ємом:

$$V_{ПА1} = V_{РОБ.1} / K_S = 0,6 / 0,6 = 1 \text{ м}^3.$$

Для одержання 0,6 м³ культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{РОБ.2} = 0,6 \times 0,1 = 0,06 \text{ м}^3 = 60 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом:

$$V_{ИЗ2} = V_{РОБ.2} / K_S = 60 / 0,6 = 100 \text{ л.}$$

Для одержання 60 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{РОБ.3} = 60 \times 0,1 = 6 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом:

$$V_{ИЗ3} = V_{РОБ.3} / K_S = 6 / 0,6 = 10 \text{ л.}$$

Для отримання 6 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{РОБ.4} = 6 \times 0,1 = 0,6 \text{ л (600 мл) посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту отримують культивуванням у колбах на качалці.

Для цього використовують колби об'ємом 750 мл з 150 мл середовища в кожній.

Тобто, потрібно буде 4 колби.

Висновки щодо кількості стадій підготовки посівного матеріалу, об'ємів ферментаційного обладнання і об'ємів води для підготовки поживного середовища на всіх етапах процесу наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, м ³	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера (об'єм середовища) м ³	Об'єм посівного матеріалу (10%), м ³	Конденсат (10%), м ³	Об'єм води для приготування композицій середовища, м ³
10	0,6	6	0,6	0,6	4,8
1	0,6	0,6	0,06	0,06	0,48
0,1	0,6	0,06 (60 л)	0,006 (6 л)	0,006 (6 л)	0,048 (48 л)
0,01 (10 л)	0,6	0,006 (6 л)	0,0006 (0,6 л)	0,0006 (0,6 л)	0,0048 (4,8 л)

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи.

РОЗДІЛ 4

БІОСИНТЕЗ ЛАККАЗИ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Пептон, як органічний субстрат для *Geobacillus* sp. ID17, проходить кілька етапів катаболізму, перетворюючись на піруват і через різні метаболічні шляхи інтегрується в клітинні процеси, зокрема в глюконеогенез (Nyzhnyk & Kots, (2023).

Пептон — це білковий гідролізат, що містить пептиди та амінокислоти, які бактерія використовує для росту. В процесі катаболізму триптон спочатку піддається гідролізу за допомогою ферментів, що розщеплюють пептидні зв'язки, звільняючи амінокислоти. Однією з основних амінокислот, що утворюються з триптону, є серин. Це здійснюється через дію пептидаз і амінофосфатаз, що розщеплюють більші пептиди до вільних амінокислот.

Пептон → серин (через гідроліз пептидів)

Серин, отриманий з триптону, піддається дезамінуванню, при якому аміногрупа відщеплюється, утворюючи піровиноградну кислоту. Цей процес є важливим етапом в метаболізмі серину, оскільки він забезпечує утворення сполук, які можуть бути використані для енергетичних потреб або для синтезу інших молекул.

Серин → піровиноградна кислота + аміак (NH_4^+)

Піровиноградна кислота, що утворюється після дезамінування серину, може бути включена в цикл Кребса (цикл трикарбонових кислот), де вона окиснюється для утворення енергії у вигляді АТФ, НАДН та ФАДН₂.

Піровиноградна кислота → ацетил-СоА → цикл Кребса → енергія (АТФ, НАДН та ФАДН₂).

Глюконеогенез — це процес синтезу глюкози з неуглеводних джерел, і він може включати піровиноградну кислоту як один із вихідних субстратів.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 4 БІОСИНТЕЗ ЛАККАЗИ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архивів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Бабіна Ю.С.</i>						32	85
<i>Перевір.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Піровиноградна кислота → оксалоацетат → фосфоенолпіруват → глюкоза

В цьому процесі піровиноградна кислота конвертується в оксалоацетат, який є проміжним продуктом циклу Кребса. Далі оксалоацетат може бути перетворений у фосфоенолпіруват, який в кінцевому результаті стає глюкозою. Це важливий шлях для бактерій, що не мають прямого доступу до вуглеводів і повинні синтезувати глюкозу самостійно для подальших біохімічних процесів.

Схему наведено згідно штаму *Geobacillus* sp. WCH70 за базою даних KEGG (<https://www.kegg.jp/pathway/gwc00010>, <https://www.kegg.jp/pathway/gwc00620>) та показано на рис.4.1.

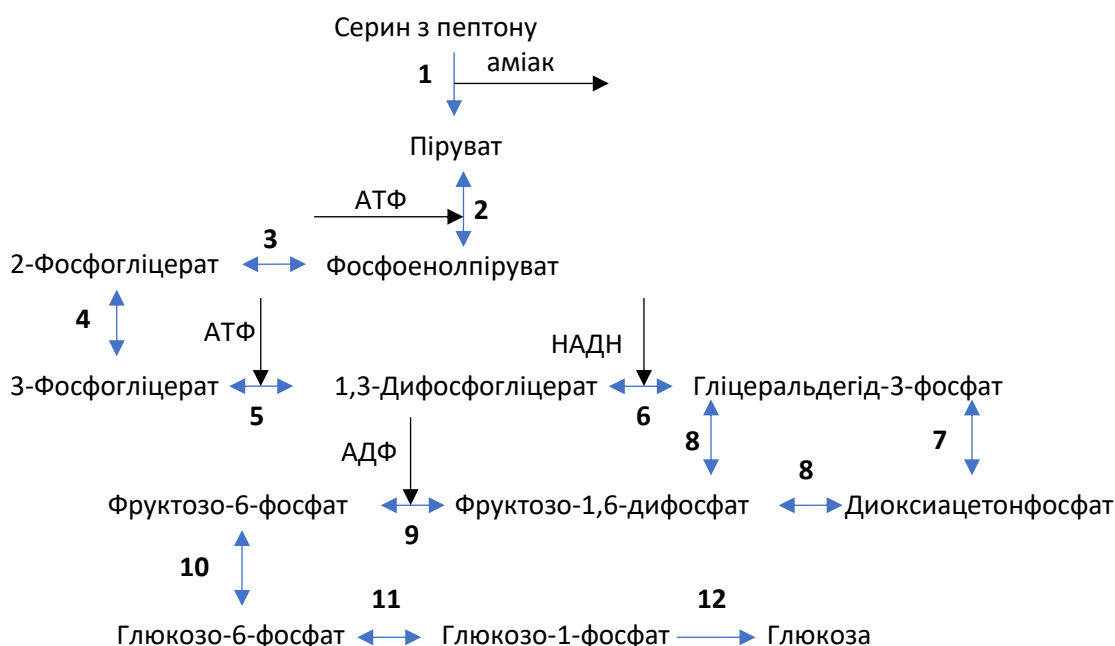


Рис.4.1. Схема катаболізму серину (з пепотну) до пірувату та глюкози за гліюконеогенезом

Ферменти: 1 – треонін дегідратаза [ЕС:4.3.1.19], 2 - піруват, ортофосфатдикіназа [ЕС:2.7.9.1], 3 - енолаза [ЕС:4.2.1.11], 4 - 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза [ЕС:5.4.2.11], 5 - фосфогліцераткіназа [ЕС:2.7.2.3], 6 - гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (фосфорилуюча) [ЕС:1.2.1.12], 7 - тріозофосфатізомераза [ЕС:5.3.1.1], 8 - фруктозо-1,6-бісфосфатальдолаза/фосфатаза [ЕС:4.1.2.13 3.1.3.11], 9 - дифосфат-

залежна фосфофруктокіназа [ЕС: 2.7.1.90], 10 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза [ЕС:5.3.1.9], 11 - фосфоглюкомутаза [ЕС:5.4.2.2], 12 - глюкозо-1-фосфатаза [ЕС:3.1.3.10].

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Основним джерелом карбону в поживному середовищі буде виступати пептон, що є джерелом пептидів та амінокислот, які будуть активно залучатись до біосинтезу лаккази (Atalah, & Blamey, 2022).

Аналіз амінокислот очищеного лакказного ферменту показав, що фермент містить 13 амінокислот. Фермент багатий на аланін (15,5%) та серин (13,2%) від загальної кількості амінокислот. Також містив велику кількість глютамінової кислоти, треоніну та аспарагінової кислоти – 11,4%, 11,1% та 10,4% від загальної кількості амінокислот відповідно. Валін, пролін та лейцин становили значну частку, яка досягла 22,8% від загальної кількості амінокислот. З іншого боку, фермент містить малу кількість аргінін, гістидин, гліцин, ізолейцин та лізин, які склали лише близько 15,6% від загальної кількості амінокислот (Atalla et al, 2013).

Для складання схеми біотрансформації пропонується використовувати дані з статті Jones et al (2009), в якій вказано, що по амінокислотному складу в пептоні переважає гліцин. Тож, схема біотрансформації показано на рис.3.1 та рис.3.2.

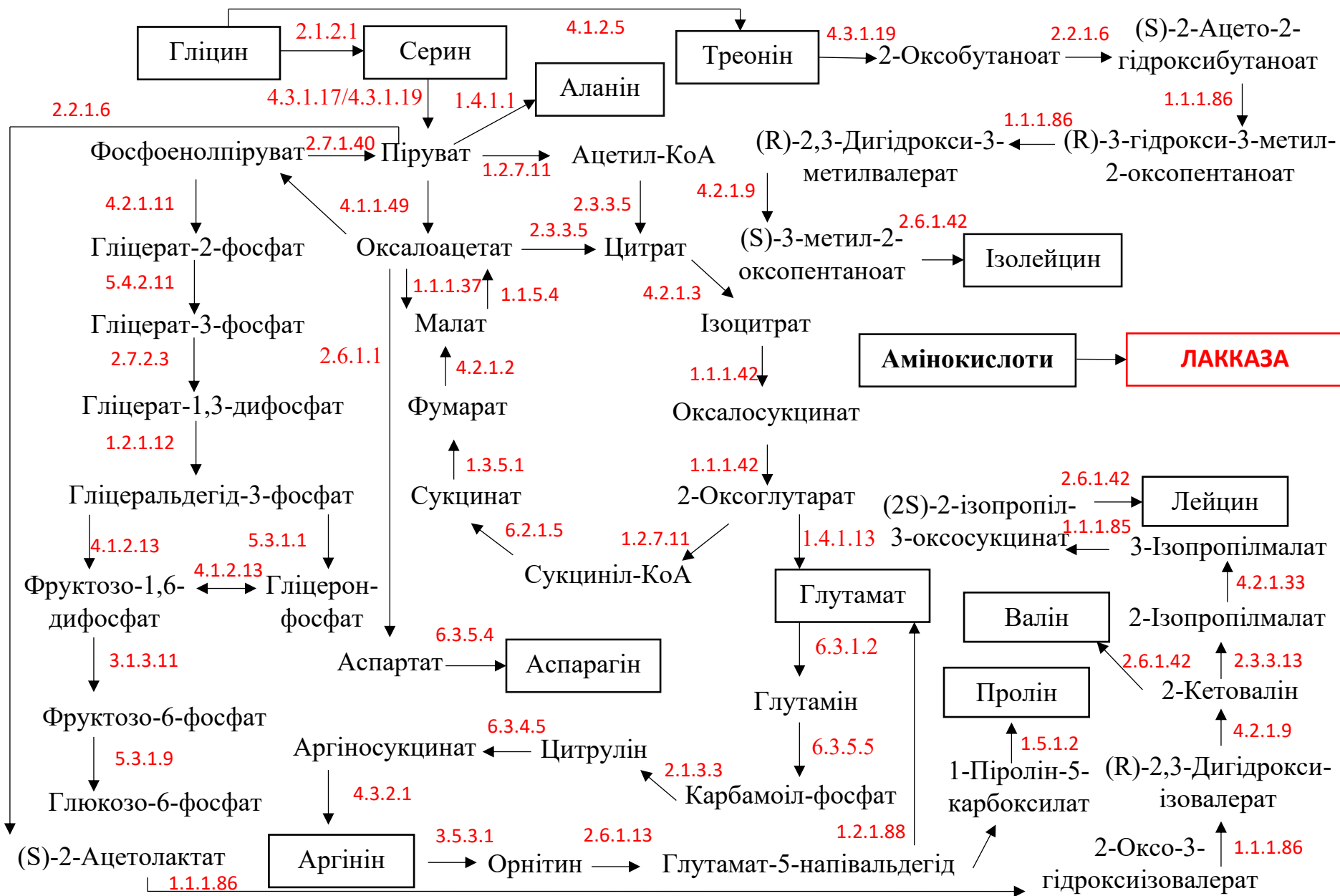


Рис.3.1. Схема біотрансформації пептону в лакказу, частина 1

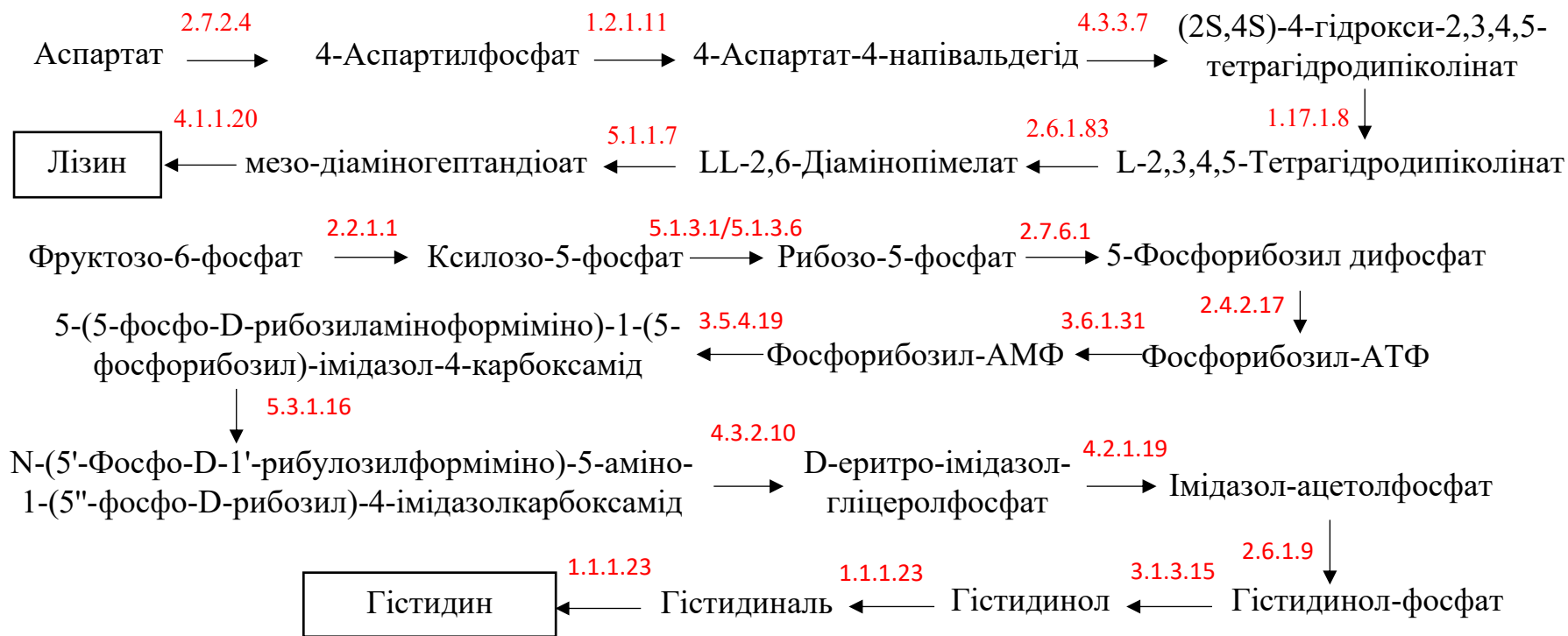


Рис.3.2. Схема біотрансформації пептону в лакказу, частина 2

В табл.3.1. показано розшифровки та назви ферментів, що використовуються для синтезу лаккази.

Таблиця 3.1.

Ферменти, що використовуються для синтезу лаккази

ЕС-номер	Назва ферменту
1.1.1.37	Малатдегідрогеназа
1.1.1.42	Ізоцитратдегідрогеназа
1.1.1.85	3-Ізопропілмалатдегідрогеназа
1.1.1.86	Гідроксиізовалератдегідрогеназа
1.1.1.133	Гістидінальдегідрогеназа
1.1.1.23	Гістидінол-дегідрогеназа
1.1.1.49	Малат-ензим (NAD ⁺)
1.1.5.4	Ізоцитратдегідрогеназа (NADP ⁺)
1.2.1.12	Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа
1.2.1.11	Аспартат-семіальдегіддегідрогеназа
1.3.5.1	Сукцинатдегідрогеназа
1.4.1.13	Глутаматдегідрогеназа
1.4.1.1	Аланіндегідрогеназа
2.1.2.3	Карбамоїлфосфат-синтаза
2.1.6.1	Метилтрансфераза
2.2.1.6	Серингідроксиметилтрансфераза
2.3.1.182	Глутамат-5-кіназа
2.3.1.19	2-Ізопропілмалатсинтаза
2.3.3.5	Цитратсинтаза
2.4.1.13	Фосфогексоізомераза
2.4.2.17	АМФ-цитидилілтрансфераза
2.6.1.1	Аспартатамінотрансфераза
2.7.1.40	Піруваткіназа
2.7.1.1	Гексокіназа
2.7.1.19	АТФ-цитратліаза
2.7.2.3	3-Фосфогліцераткіназа
2.7.2.4	Аспартаткіназа
3.1.3.11	Фруктозо-1,6-бісфосфатаза
3.1.3.15	Гістидінолфосфат-фосфатаза
3.3.1.1	Лактаза

Закінчення табл.3.1.

3.5.3.1	Аргіназа
3.5.3.4	Аспарагіназа
3.5.3.5	Глутаміназа
3.5.4.19	Імідазолкарбоксамідаза
4.1.1.20	Лізіндекарбоксилаза
4.1.1.23	Глутамат-5-семіальдегіддегідрогеназа
4.1.1.85	2-Ізопропілмалатдекарбоксилаза
4.1.1.86	2-Кетоваліндекарбоксилаза
4.1.2.13	Фруктозо-1,6-бісфосфатальдолаза
4.1.2.5	Серіндекарбоксилаза
4.2.1.11	Енолаза
4.2.1.19	Аконітаза
4.2.1.33	2-Ізопропілмалатгідратаза
4.2.1.83	Глутамат-5-кіназа
4.3.1.17	Треонін-альдолаза
4.3.1.19	Треоніндегідратаза
4.3.2.10	Імідазолгліцеролфосфат-синтаза
4.3.2.1	Аргінінсукцинатліаза
5.1.1.7	Діамінопімелат-епімераза
5.1.3.1	Рибозо-5-фосфатізомераза А
5.1.3.6	Рибозо-5-фосфатізомераза В
5.3.1.16	Ізомераза фосфо-D-рибулозиламіноформіміно-імідозолкарбоксаміду
5.3.1.1	Тріозофосфатізомераза

РОЗДІЛ 5

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Geobacillus sp. ID17 належить до групи облигатних термофілів — бактерій, здатних розвиватися лише за підвищених температур. Оптимальний температурний діапазон для більшості видів роду *Geobacillus* становить 50–65 °С. Температура 55 °С обрана як компроміс між інтенсивним ростом і стабільністю середовища. У цих умовах спостерігається максимальна активність термостабільних ферментів, що забезпечують ефективний метаболізм, швидкий ріст і високу біомасу бактерій (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010).

Більшість представників роду *Geobacillus* ростуть у нейтральному або слабколужному середовищі (оптимум рН 6,5–7,5). Значення рН 7,0 є нейтральним і забезпечує (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010):

- стабільну активність основних ферментних систем клітини;
- підтримку цілісності клітинної стінки;
- оптимальні умови для засвоєння поживних речовин.

У середовищі з рН нижче 6 або вище 8 ріст значно уповільнюється або припиняється.

Geobacillus sp. ID17 — аеробний або факультативно анаеробний мікроорганізм, який потребує наявності кисню для ефективного енергетичного метаболізму. При аеробному диханні бактерії використовують кисень як кінцевий акцептор електронів, що дозволяє (Ren, Strobel, Sears, & Park, 2010):

- отримати більше АТФ порівняно з анаеробними умовами;
- забезпечити високий рівень клітинної продуктивності;
- прискорити фазу росту.

Культивування проводиться в умовах аерації або на качалці, щоб забезпечити достатню оксигенацію середовища.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бабіна Ю.С.			РОЗДІЛ 5 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					39	85
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Перемішування є важливою умовою для ефективного культивування *Geobacillus* sp. ID17, оскільки цей мікроорганізм є аеробом і потребує достатньої кількості розчиненого кисню у середовищі. Крім того, рівномірний розподіл поживних речовин, стабільність температури та значення рН також значною мірою залежать від режиму перемішування (<https://www.science.gov/topicpages/b/bacteria+geobacillus+stearothermophilus#>).

У лабораторних умовах культивування проводиться у колбах на качалці або в біореакторі зі швидкістю перемішування, яка забезпечує (<https://www.science.gov/topicpages/b/bacteria+geobacillus+stearothermophilus#>):

- інтенсивну аерацію, необхідну для аеробного дихання;
- запобігання осіданню клітин та нерівномірному росту;
- гомогенізацію середовища, що гарантує стабільність умов по всьому об'єму.

Оптимальна швидкість перемішування зазвичай становить 150–200 об/хв. Надмірна турбулентність зазвичай не рекомендується, оскільки може пошкоджувати клітини або призводити до деградації термолабільних компонентів (<https://www.science.gov/topicpages/b/bacteria+geobacillus+stearothermophilus#>).

У даній роботі для культивування *Geobacillus* sp. ID17 було обрано глибинний спосіб у періодичному режимі за суворого дотримання асептичних умов. Такий підхід є обґрунтованим з точки зору фізіології мікроорганізму та умов, необхідних для його оптимального росту (Карлаш, & Красінько, 2022).

Глибинне культивування забезпечує рівномірне перемішування культурального середовища, що дозволяє ефективно розподіляти поживні речовини та підтримувати однорідний рівень розчиненого кисню. Це особливо важливо для *Geobacillus* sp. ID17, який є облигатним аеробом, тобто потребує постійної наявності кисню для метаболічної активності та росту (Карлаш, & Красінько, 2022).

На відміну від цього, поверхневе культивування, яке зазвичай використовується для мікроаерофільних або факультативно анаеробних

організмів, не забезпечує достатньої аерації по всьому об'єму середовища. Це обмежує ріст аеробних термофілів, оскільки кисень доступний лише на поверхні, а в глибині середовища можуть створюватися анаеробні зони. Аналогічно, напівтверді середовища чи агарові пластини не підходять для масового нарощування біомаси або виробництва метаболітів, оскільки вони мають обмежену площу росту і погану аерацію (Карлаш, & Красінько, 2022).

Періодичний режим культивування є зручним для досліджень, де необхідно відстежувати динаміку росту та метаболізму мікроорганізму. Всі компоненти середовища та посівний матеріал вносяться на початку процесу, що дозволяє створити стабільні умови для дослідження росту культури протягом 24 годин. Безперервний або напівбезперервний режим культивування потребують складнішого технічного забезпечення (зокрема, систем для безперервного додавання середовища та видалення культури), а також не дають змоги повністю контролювати всі фази росту культури, що є необхідним для вивчення її біотехнологічного потенціалу (Карлаш, & Красінько, 2022).

Крім того, за культивування в багатому на органіку середовищі виникає високий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами. Саме тому всі етапи роботи проводяться за умов суворої асептики. Це включає стерилізацію поживних середовищ та лабораторного посуду, роботу у ламінарній шафі, використання стерильних інструментів, а також обробку рук і поверхонь антисептиками. Усі ці заходи унеможливають проникнення мікрофлори, яка може споживати поживні речовини, змінювати рН середовища або продукувати небажані метаболіти, що ускладнюють оцінку росту цільового штаму (Карлаш, & Красінько, 2022).

Поєднання глибинного способу культивування, періодичного режиму та асептичних умов забезпечує оптимальні фізико-хімічні параметри для росту *Geobacillus* sp. ID17, дозволяє уникнути ризику забруднення та отримати достовірні, репрезентативні результати, необхідні для подальших біотехнологічних досліджень.

З урахуванням фізіолого-біохімічних особливостей *Geobacillus* sp. ID17, а також обраного способу культивування (глибинний, періодичний, в асептичних умовах), для проведення процесу було обрано мішалковий ферментер періодичної дії BLBIO-5000SJA з номінальним об'ємом 5000 л, виготовлений з нержавіючої сталі марки 316L (https://www.alibaba.com/product-detail/EU-Standard-Stable-Industry-Stainless-Steels_1601385693300.html?spm=a2700.prosearch.normal_offer.d_title.5e0167afl19zPo&priceId=d2ae4fd682de466ebf8b46b10c20d222).

Вибір саме мішалкового ферментера є обґрунтованим передусім аеробним характером метаболізму досліджуваного штаму. *Geobacillus* sp. ID17 потребує постійної наявності розчиненого кисню для ефективного енергетичного обміну, швидкого росту та накопичення біомаси. Наявність механічної мішалки у ферментері забезпечує інтенсивне та контрольоване перемішування культурального середовища, що сприяє рівномірному розподілу кисню по всьому об'єму, запобігає утворенню анаеробних зон та осіданню клітинної маси (https://www.alibaba.com/product-detail/EU-Standard-Stable-Industry-Stainless-Steels_1601385693300.html?spm=a2700.prosearch.normal_offer.d_title.5e0167afl19zPo&priceId=d2ae4fd682de466ebf8b46b10c20d222).

Крім того, ефективне перемішування є критично важливим для підтримання стабільних фізико-хімічних параметрів середовища, зокрема температури та значення рН. Оскільки оптимальна температура росту *Geobacillus* sp. ID17 становить близько 55 °С, ферментер BLBIO-5000SJA оснащений сорочкою для теплообміну, що дозволяє точно підтримувати заданий температурний режим протягом усього циклу культивування. Це особливо важливо для термофільних мікроорганізмів, оскільки навіть незначні температурні коливання можуть призводити до зниження ферментативної активності або порушення клітинного метаболізму (<https://www.alibaba.com/product-detail/EU-Standard-Stable-Industry-Stainless->

[Steels_1601385693300.html?spm=a2700.prosearch.normal_offer.d_title.5e0167af19zPo&priceId=d2ae4fd682de466ebf8b46b10c20d222](https://www.alibaba.com/product-detail/EU-Standard-Stable-Industry-Stainless-Steels_1601385693300.html?spm=a2700.prosearch.normal_offer.d_title.5e0167af19zPo&priceId=d2ae4fd682de466ebf8b46b10c20d222)).

Виконання ферментера з нержавіючої сталі типу 316L також є принципово важливим з точки зору асептики та хімічної стійкості. Даний матеріал характеризується високою корозійною стійкістю, інертністю до компонентів поживного середовища та можливістю багаторазової стерилізації (у тому числі парою), що забезпечує дотримання суворих асептичних умов і мінімізує ризик контамінації. Це є особливо актуальним при культивуванні у багатих на органічні сполуки середовищах, де стороння мікрофлора може швидко розвиватися та суттєво спотворювати результати експерименту.

Номінальний об'єм ферментера 5000 л дозволяє реалізувати масштабоване глибинне культивування, зберігаючи при цьому контроль над основними технологічними параметрами процесу. Такий об'єм є доцільним для отримання репрезентативних даних щодо росту культури та її біотехнологічного потенціалу, а також для подальшої екстраполяції результатів на напівпромисловий або промисловий рівень. Габаритні розміри ферментера (1700 × 2600 мм) відповідають вимогам до розміщення обладнання у виробничих або пілотних біотехнологічних приміщеннях (https://www.alibaba.com/product-detail/EU-Standard-Stable-Industry-Stainless-Steels_1601385693300.html?spm=a2700.prosearch.normal_offer.d_title.5e0167af19zPo&priceId=d2ae4fd682de466ebf8b46b10c20d222).

Отже, використання мішалкового ферментера BLBIO-5000SJA у періодичному режимі культивування є технічно та біологічно обґрунтованим. Поєднання ефективної аерації, контрольованого перемішування, точного температурного регулювання та високого рівня асептики забезпечує оптимальні умови для росту *Geobacillus* sp. ID17 і отримання достовірних експериментальних результатів, необхідних для подальших біотехнологічних досліджень.

5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Біосинтез лаккази штамми *Geobacillus* sp. здійснюється в аеробних умовах і супроводжується інтенсивним споживанням розчиненого кисню, що зумовлено як високою метаболічною активністю термофільних бактерій, так і природою лаккази як мультикупрового оксидазного ферменту, функціонування якого безпосередньо пов'язане з перенесенням електронів на молекулярний кисень. У зв'язку з цим стадія підготовки аераційного повітря є критично важливою для забезпечення стабільності процесу культивування, високої ферментативної активності та відтворюваності біосинтезу.

Підготовка аераційного повітря передбачає, насамперед, його очищення від механічних домішок і мікроорганізмів. Незважаючи на те, що *Geobacillus* sp. є термофільними бактеріями, здатними розвиватися за підвищених температур (50–65 °C), контамінація повітря споровими формами інших мікроорганізмів або термотолерантними бактеріями може призводити до конкуренції за поживні речовини, зниження виходу лаккази та порушення стерильності біопроцесу. Тому застосування багатоступеневої фільтрації (грубі та тонкі фільтри, стерилізувальні мембранні фільтри з порами 0,2–0,3 мкм) є обґрунтованим і необхідним елементом технологічної схеми.

Другим важливим аспектом є регулювання вологості та температури аераційного повітря. Подача надмірно сухого повітря сприяє інтенсивному випаровуванню середовища культивування, зміні концентрацій поживних компонентів і солей, а також підвищенню піноутворення. Зволоження повітря до параметрів, близьких до насичення за робочої температури процесу, дає змогу мінімізувати ці небажані ефекти. З урахуванням термофільної природи *Geobacillus* sp., доцільним є також попередній підігрів повітря, що знижує теплові втрати ферментера та сприяє підтриманню стабільного температурного режиму культивування.

Процес підготовки аераційного повітря включає такі стадії:

1. Забір повітря

Здійснюється через повітрязабірну трубу, розташовану над рівнем даху будівлі (15–18 м від землі), де вміст пилу та мікроорганізмів мінімальний. Вхідний отвір обладнують захисними сітками або жалюзі.

2. Попередня очистка

Повітря очищують у масляних або рукавних фільтрах від грубодисперсних механічних домішок розміром понад 5–10 мкм з метою захисту компресорного обладнання.

3. Стиснення повітря

Очищене повітря стискається компресором до надлишкового тиску 0,3–0,5 МПа, необхідного для подачі в ферментер. У процесі стиснення температура повітря підвищується до 120–160 °С.

4. Охолодження та видалення вологи

Стиснене повітря охолоджують у теплообмінниках до 25–30 °С, при цьому конденсована волога та залишки мастила видаляються у вологомасловідокремлювачі.

5. Нагрівання повітря

Перед тонкою очисткою повітря підігрівають до 55–65 °С для зниження відносної вологості та запобігання зволоженню фільтрів.

6. Головна очистка

Повітря проходить через фільтр тонкої очистки, який затримує основну масу дрібних часток і мікроорганізмів.

7. Індивідуальна стерилізація

Безпосередньо перед подачею у ферментер повітря стерилізують у мембранному фільтрі з розміром пор 0,22 мкм, що забезпечує надходження стерильного аераційного повітря в інокулятори та ферментер.

5.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого культивування з метою одержання лаккази *Geobacillus* sp. ID17 використовується поживне середовище наступного складу (г/л) (Atalah, & Blamey, 2022):

Пептон – 5,00
Дріжджовий екстракт – 1,00
Fe(III) цитрат – 0,10
NaCl – 19,45
MgCl₂ – 5,90
Na₂SO₄ – 3,24
CaCl₂ – 1,80
KCl – 0,55
NaHCO₃ – 0,16
KBr – 0,08
SrCl₂ – 0,034
H₃BO₃ – 0,022
Na₂SiO₃ – 0,004
NaF – 0,0024
(NH₄)NO₃ – 0,0016
Na₂HPO₄ – 0,008

Для одержання інокуляту *Geobacillus* sp. ID17 в статті (Atalah, & Blamey, 2022) середовище не вказано, тому для цього буде використовуватись середовище, що зазначено для виробничого культивування.

Оскільки середовище для одержання інокуляту та виробничого культивування є однаковим, поділ на композиції буде незмінним для кожної стадії (Atalah, & Blamey, 2022). Вищенаведене поживне середовище можна розділити на наступні композиції:

Композиція А пептон, дріжджовий екстракт та Fe(III) цитрат, 120 °C при 0,01 МПа протягом 20 хвилин.

Композиція Б: NaCl, Na₂SO₄, KCl, NaHCO₃, KBr, SrCl₂, H₃BO₃, Na₂SiO₃, NaF, (NH₄)NO₃, Na₂HPO₄, 131 °C при 0,15 МПа протягом 30 хвилин.

Композиція В: CaCl₂, MgCl₂, 131 °C при 0,15 МПа протягом 30 хвилин.

Солі кальцію та магнію виділені в окремо композиції задля унеможливлення утворення нерозчинних солей з фосфатами.

Варто зазначити, що для підтримки рН на рівні 7,0 в статті використовували 100 мМ натрій фосфатний буфер, що також потрібно врахувати при складанні технологічної схеми (Atalah, & Blamey, 2022).

Проте, варто відзначити, що для стадії колб, та інокуляторів на 10 та 100 л буде передбачено запасний розчин мікроелементів, через їх низьку концентрацію. До цієї композиції ввійде Na_2SiO_3 , NaF , $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ та Na_2HPO_4 , оскільки їх кількість буде менша за 10 мг.

Крім того, варто зазначити, що фосфатні солі підуть в розчин мікроелементів, через що, поділ на композиції для колб, інокулятору на 10 та 100 л буде наступним:

Композиція А пептон, дріжджовий екстракт та Fe(III) цитрат, 120 °С при 0,01 МПа протягом 20 хвилин.

Композиція Б: NaCl , Na_2SO_4 , KCl , NaHCO_3 , KBr , SrCl_2 , H_3BO_3 , CaCl_2 , MgCl_2 , 131 °С при 0,15 МПа протягом 30 хвилин.

5.3.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

В табл.5.1. показано розрахунок кожного елементу поживного середовища згідно вище зазначеного поділу по композиціям. На даному етапі розрахунок ведеться для накопичення інокуляту в колбах.

Таблиця 5.1.

Розрахунок компонентів поживного середовища для етапу підготовки інокуляту в колбах

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 540 мл поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Пептон	5,00	2,7	А	200
Дріжджовий екстракт	1,00	0,54		
Fe(III) цитрат	0,10	0,054		
Вода		200 мл		

NaCl	19,45	10,5	Б	330
Na ₂ SO ₄	3,24	1,75		
KCl	0,55	0,3		
NaHCO ₃	0,16	0,09		
KBr	0,08	0,04		
SrCl ₂	0,034	0,02		
H ₃ BO ₃	0,022	0,01		
MgCl ₂	5,90	3,19		
CaCl ₂	1,80	0,97		
Вода	330 мл			
Розчин мікроелементів	10 мл		-	10

Отже, композиція А та Б готується в колбах об'ємом 0,5 л.

5.3.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

В табл.5.2. показано розрахунок кожного елементу поживного середовища згідно вище зазначеного поділу по композиціям. На даному етапі розрахунок ведеться для накопичення інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л.

Таблиця 5.2.

Розрахунок компонентів поживного середовища для етапу підготовки інокуляту в інокуляторі на 10 л

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 5,4 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Пептон	5,00	27	А	1300
Дріжджовий екстракт	1,00	5,4		
Fe(III) цитрат	0,10	0,54		
Вода	1300 мл			
NaCl	19,45	105	Б	≈4000 мл
Na ₂ SO ₄	3,24	17,5		
KCl	0,55	3		
NaHCO ₃	0,16	0,9		
KBr	0,08	0,4		
SrCl ₂	0,034	0,2		
H ₃ BO ₃	0,022	0,1		
MgCl ₂	5,90	31,9		
CaCl ₂	1,80	9,7		
Вода	3650 мл			

Закінчення табл.5.2.

Конденсат	365 мл		
Розчин мікроелементів	100 мл	-	100

Тож, композиція А готується та стерилізується в колбі об'ємом 2 л, а композиція Б готується в реакторі об'ємом 5 л, а стерилізується в інокуляторі об'ємом 10 л.

В табл.5.3. показано розрахунок кожного елементу поживного середовища згідно вище зазначеного поділу по композиціям. На даному етапі розрахунок ведеться для накопичення інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л.

Таблиця 5.3.

Розрахунок компонентів поживного середовища для етапу підготовки інокуляту в інокуляторі на 100 л

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 54 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	5,00	270	А	≈13,9
Дріжджовий екстракт	1,00	54		
Fe(III) цитрат	0,10	5,4		
Вода		12,6 л		
Конденсат		1,3 л		
NaCl	19,45	1050	Б	≈40
Na ₂ SO ₄	3,24	175		
KCl	0,55	30		
NaHCO ₃	0,16	9		
KBr	0,08	4		
SrCl ₂	0,034	2		
H ₃ BO ₃	0,022	1		
MgCl ₂	5,90	319		
CaCl ₂	1,80	97		
Вода		36,4 л		
Конденсат		3,64 л		

Тож, композиція А готується та стерилізується в реакторі об'ємом 15 л, а композиція Б готується в реакторі об'ємом 50 л, а стерилізується в інокуляторі об'ємом 100 л.

В табл.5.4. показано розрахунок кожного елементу поживного середовища згідно вище зазначеного поділу по композиціям. На даному етапі розрахунок ведеться для накопичення інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³.

Таблиця 5.4.

Розрахунок компонентів поживного середовища для етапу підготовки інокуляту в інокуляторі на 1 м³

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 540 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	5,00	2700	А	≈100
Дріжджовий екстракт	1,00	540		
Fe(III) цитрат	0,10	54		
Вода		9 л		
Конденсат		9,1 л		
NaCl	19,45	10500	Б	≈400
Na ₂ SO ₄	3,24	1750		
KCl	0,55	300		
NaHCO ₃	0,16	90		
KBr	0,08	40		
SrCl ₂	0,034	20		
H ₃ BO ₃	0,022	10		
Na ₂ SiO ₃	0,004	2		
NaF	0,0024	1		
(NH ₄)NO ₃	0,0016	1		
Na ₂ HPO ₄	0,008	4		
Вода		364 л		
Конденсат		36,4 л		
MgCl ₂	5,90	3190		
CaCl ₂	1,80	970		
Вода		36,5 л		
Конденсат		3,65 л		

Тож, композиція А готується та стерилізується в реакторі об'ємом 150 л, композиція Б готується в реакторі об'ємом 500 л, а стерилізується в інокуляторі об'ємом 1 м³, а композиція В готується та стерилізується в реакторі об'ємом 50 л.

5.3.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

для виробничого біосинтезу

В табл.5.5. показано розрахунок кожного елементу поживного середовища згідно вище зазначеного поділу по композиціям. На даному етапі розрахунок ведеться для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 10 м³.

Таблиця 5.5.

Розрахунок компонентів поживного середовища для етапу виробничого біосинтезу в ферментері на 10 м³

Компонент	Концентрація, г/л	Перерахунок на 5400 л поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Пептон	5,00	27	А	≈1000
Дріжджовий екстракт	1,00	5,4		
Fe(III) цитрат	0,10	0,54		
Вода		910 л		
Конденсат		91 л		
NaCl	19,45	105	Б	≈4000
Na ₂ SO ₄	3,24	17,5		
KCl	0,55	3		
NaHCO ₃	0,16	0,9		
KBr	0,08	0,4		
SrCl ₂	0,034	0,2		
H ₃ BO ₃	0,022	0,1		
Na ₂ SiO ₃	0,004	0,02		
NaF	0,0024	0,01		
(NH ₄)NO ₃	0,0016	0,01		
Na ₂ HPO ₄	0,008	0,04		
Вода		3640 л		
Конденсат		364 л		
MgCl ₂	5,90	31,9	В	≈400
CaCl ₂	1,80	9,7		
Вода		365 л		
Конденсат		36,5 л		

Тож, композиція А готується та стерилізується в реакторі об'ємом 1500 л, композиція Б готується в реакторі об'ємом 5000 л, а стерилізується в ферментері

об'ємом 10 м³, а композиція В готується та стерилізується в реакторі об'ємом 500 л.

5.4. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу цільового продукту

Для підтримки сталого значення рН у ферментації *Geobacillus* sp. під час біосинтезу лаккази обрано 100 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 7,0. Основна функція буферу — пригнічення зміни рН при утворенні кислотних або лужних продуктів метаболізму, що впливає на активність ферментів і стабільність росту клітин. Буферні розчини спрямовані на те, щоб при додаванні невеликих кількостей іонів Н⁺ або ОН⁻ рН змінювався мінімально, завдяки реакції між кон'югованою кислотою та її основою — тобто фосфатна система забезпечує резистентність рН до зовнішніх впливів відповідно до принципу Гендерсона — Гассельбаха. Це критично для ферментацій, де активність ферментів (зокрема лаккази) високо чутлива до рН (особливо при нейтральних значеннях) — без ефективної буферної системи рН може змінюватися в міру росту клітин і накопичення метаболітів, що призводить до зниження продуктивності процесу.

Оскільки остаточно невідомо яку кількість буферу необхідно додавати для підтримки рН на відповідному рівні (зазвичай це визначається експериментально), будемо орієнтуватись на сталі значення для кислотного та лужного титранту, а тобто 2 мл на 1 л поживного середовища.

5.5. Обґрунтування вибору піногасника

У процесі культивування *Geobacillus* sp. з метою біосинтезу лаккази можливе утворення піни, зумовлене барботажною аерацією та наявністю у поживному середовищі поверхнево-активних компонентів білкової природи. До складу середовища входять пептон у концентрації 5 г/л та дріжджовий екстракт у концентрації 1 г/л, що є відносно низькими значеннями для бактеріальних ферментацій і не створюють умов для інтенсивного та стійкого піноутворення.

З огляду на це застосування хімічних піногасників (силіконових олій, полігліколів тощо) є недоцільним. Такі добавки можуть негативно впливати на

масоперенос кисню, ускладнювати подальше виділення та очищення лаккази, а також створювати ризик інгібування ферментативної активності.

За зазначених умов доцільним є використання механічного піногасника, принцип дії якого ґрунтується на фізичному руйнуванні піни в зоні газ–рідина без внесення сторонніх речовин у культуральне середовище. Механічний піногасник забезпечує ефективний контроль помірному піноутворення, не впливає на хімічний склад середовища та не змінює фізико-хімічних властивостей культуральної рідини.

Для культивування *Geobacillus* sp. ID17 з метою одержання лаккази передбачається глибинне культивування з періодичним режимом в асептичних умовах. Культивування передбачає наявність стерильного аераційного повітря, а також забезпечення оптимальної температури культивування – 55 °С. Для підтримки рН на рівні 7,0 згідно даних статті використовується 100 мМ натрій-фосфатний буфер. Хоча в статті не вказано швидкість перемішування, а також не вказано про наявність статичних умов, спираючись на сучасну літературу пропонується здійснювати культивування з перемішуванням в 150 об/хв задля інтенсифікації масообмінних процесів, а також більш рівномірного розподілення розчиненого кисню по товщі поживного середовища.

Щодо ємнісного обладнання, необхідно передбачити наступні позиції:

- Для підготовки композиції А – реактор-стерилізатор об'ємом 15, 150 л та 1,5 м³
- Для підготовки композиції Б – реактор-змішувач об'ємом 5, 50, 500 л та 5 м³
- Для підготовки композиції В – реактор-стерилізатор об'ємом 50 та 500 л.

З додаткових (допоміжних) технологічних операцій важливим є:

- Забезпечення стерильного аераційного повітря
- Підготовка 100 мМ натрій-фосфатного буфера
- Підготовку розчину мікроелементів

РОЗДІЛ 6
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання допоміжних робіт та виробничого біосинтезу для одержання лаккази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
P-1	Реактор змішувач об'ємом 5 л	1	Лабораторний сталевий реактор LSR-5L. Номінальний об'єм – 5 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 450x480x1500 (LABOAO, Китай) ¹
Д-2 Д-5 Д-7 Д-9 Д-13 Д-17 Д-21 Д-25 Д-29	Об'ємно-ваговий дозатор	9	Об'ємно-ваговий дозатор FLEX PH20. Продуктивність – 1400 доз/хв. Максимальне дозування – 1000 мл. Точність дозування до 1%. Габаритні розміри (мм): 1800x580x550 (Flexmash, Україна) ²
I-3	Інокулятор об'ємом 10 л	1	Інокулятор BR500-M1. Номінальний об'єм – 10 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 650x650x1492 мм (Labfirst Scientific, Китай) ³
P-4	Реактор змішувач об'ємом 15 л	1	Лабораторний сталевий реактор. Номінальний об'єм – 15 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 250 x315 (не вказано, Німеччина) ⁴

<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	
<i>Розроб.</i>	Бабіна Ю.С.				
<i>Перевір.</i>	Стабніков В.П.				
<i>Реценз.</i>					
<i>Н. Контр.</i>					
<i>Затверд.</i>	Стабніков В.П.				
РОЗДІЛ 6 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
				54	85
			<i>Кафедра БТМ</i>		

Продовження табл.6.1.

P-6 P-16	Реактор змішувач об'ємом 50 л	2	Лабораторний сталевий реактор ХС-50L. Номінальний об'єм – 50 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 500x500x1200 (Nanjing Ningkai Instrument Co., Ltd., Китай) ⁵
I-7	Інокулятор об'ємом 100 л	1	Інокулятор BR500-C1-100L. Номінальний об'єм – 100 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 1000×2600×1000 мм (Labfirst Scientific, Китай) ⁶
P-8	Реактор змішувач об'ємом 150 л	1	Лабораторний сталевий реактор DJR-150. Номінальний об'єм – 150 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 950x950x1650 (Henan Touch Science Instruments Co., Ltd., Китай) ⁷
H-10	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос FLUIMAC HELIOS. Продуктивність 310 л/год (FLUIMAC, Італія) ⁸
Д-11 Д-15	Ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор ВД-1. Дозування до 2 кг. Швидкість дозування 600 доз/год. Габаритні розміри (мм): 900x1200x2000 (ТОВ «Пакувальні технології», Україна) ⁹
P-12 P-28	Реактор змішувач об'ємом 500 л	2	Сталевий реактор BLS-JBG. Номінальний об'єм – 500 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 840x1000x2300 (Zhejiang L&B Machinery Co., Ltd., Китай) ¹⁰
H-14	Відцентровий насос	1	Насос відцентровий New Wawe JS100 1.1. Продуктивність 3 м ³ /год (New Wawe, Китай) ¹¹
I-18	Інокулятор об'ємом 1 м ³	1	Інокулятор BLBIO-1000SJA. Номінальний об'єм – 1000 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 1000×1500 мм (Bailun Biotech Jiangsu Co., Ltd., Китай) ¹²
Д-19 Д-23 Д-27	Ваговий дозатор	3	Ваговий дозатор ВД-4н. Вага дози до 50 кг. Продуктивність до 5 доз/хв (ABC Tech, Україна) ¹³
P-20	Реактор змішувач об'ємом 1500 л	1	Сталевий реактор К-1500. Номінальний об'єм – 1500 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 1622x 3310 (Shandong Tanglian Chemical Equipment Co., Ltd., Китай) ¹⁴
H-22 H-30	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос AS VX AS25. Безперервна робота – 1280 л/год, періодична – до 3000 л/год (ETATRON D.S., Італія) ¹⁵

P-24	Реактор змішувач об'ємом 5000 л	1	Стальний реактор BLS-FYF. Номінальний об'єм – 5000 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 1810x2000 (Zhejiang L&b Machinery Co., Ltd., Китай) ¹⁶
H-26	Відцентровий насос	1	Насос відцентровий M-300C. Продуктивність 7 м ³ /год (SAER, Італія) ¹⁷
Ф-31	Ферментер	1	Ферментер BLBIO-5000SJA. Номінальний об'єм – 5000 л. Виконаний з нержавіючої сталі типу 316L. Має сорочку та оснащений мішалкою. Габаритні розміри (мм): 1700×2600 мм (Bailun Biotech Jiangsu Co., Ltd., Китай) ¹²
H-32	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий SAER M-400B. Продуктивність 10 м ³ /год (SAER, Італія) ¹⁸

Примітка: 1 - <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/5l-lab-jacketed-stainless-steel-reactor>, 2 - <https://flexmash.com/equipment/dosizing/flex-%D1%80h2/>, 3 - https://www.lab1st.com/hybrid-molecular-distillation?gad_source=1&gad_campaignid=11172610076&gbraid=0AAAAACyIuOu1Epopflw0sFolNOXvJ-UfD1&gclid=CjwKCAiA3rPKBhBZEiwAhPNFQLUXUVtFBkCxR4SjDHScM9Er6INdFFLOsPt1vxSqxGu7g0pbT1REzRoCWqUQAvD_BwE, 4 - <https://machineryline.ua/ru/-/prodazha/himicheskie-reaktory/Stainless-Steel-Reactor--22081713362760063900>, 5 - https://www.alibaba.com/product-detail/Stainless-Steel-304-50-Liter-Continuous_1601610568178.html, 6 - <https://files.lab1st.com/documents/BR500-C1-100L%20Lab1st%20Bioreactor%20V1.231025.pdf>, 7 - https://www.alibaba.com/product-detail/Jacketed-Stainless-Steel-Automatic-150L-Laboratory_1601653373877.html?spm=a2700.7724857.0.0.64e75063KORYbo, 8 - <https://bts.net.ua/ua/pumping-equipment-distillery/chemical-pumps/peristaltichnyy-nasos-fluimac-helios-asp-15-fx-310-l-god-0-37-kvt-70-ob-khv/?srsrtid=AfmBOop2mbM8199ciloALOLwQl7xW0fygHz9BdU5jOcoUTU3XGTnLP1a>, 9 - https://packtech.com.ua/uk/obladnannya/dozuvalne/dozatory-sypuchykh-produktiv/vd-1-vd-4?gad_source=1&gad_campaignid=22336363343&gbraid=0AAAAADL5zud5m7jMsQNBbMuwIUo17r1j&gclid=CjwKCAiA3rPKBhBZEiwAhPNFQPvZgl3iLVNc9EVRXUfLWn6y5g6eNpXp8JXs8j-LgRhcJE-CC15bfxoCBUwQAvD_BwE, 10 - <https://blsfluid.en.made-in-china.com/product/iFjTskyPGdUo/China-500-Liter-Cooling-Jacket-Stainless-Steel-Reactor-for-Chemical.html>, 11 - <https://farro.shop.ua/product/nasos-poverhnevyy-vidtsentrovyy-new-wawe-js100-1-1-kvt-n-45-3-m3-hod-kabel-1-1-m/>, 12 - https://www.alibaba.com/product-detail/EU-Standard-Stable-Industry-Stainless-Steels_1601385693300.html?spm=a2700.prosearch.normal_offer.d_title.5e0167afl19zPo&priceId=d2ae4fd682de466ebf8b46b10c20d222, 13 - <https://abctech.com.ua/ua/p2580456498-vesovoe-doiziruyuschie-ustrojstvo.html>, 14 - https://www.made-in-china.com/price/prodetail_Pressure-Vessel_NXYmEABdnOUk.html?acc=5494762105-lxy&cpn=23344856125-&tgt=&net=x&dev=c-&gid=CjwKCAiA3rPKBhBZEiwAhPNFQBNcuc1WaIq4kr79VS_SfdsrQqAG6t5rXs5vdnubJSMLhY4KtApL8hoCxxYQAvD_BwE&kwd=&mtp=&loc=1012852-&gad_source=1&gad_campaignid=23335914861&gbraid=0AAAAA-M7K1h42hR1UKZ7cvS6Dr41kkrBL&gclid=CjwKCAiA3rPKBhBZEiwAhPNFQBNcuc1WaIq4kr79VS_SfdsrQqAG6t5rXs5vdnubJSMLhY4KtApL8hoCxxYQAvD_BwE, 15 - https://www.etatron.com.ua/chemical_pump/peristaltic_pump/as/as_vx/, 16 - https://www.alibaba.com/product-detail/5000-Liter-Stainless-Steel-Jacketed-Chemical_60366202935.html, 17 - <https://geyser.com.ua/nasos-tsentrobezhnyi-m-300c-11-kvt-saer-7-m3-ch-48-m/>, 18 - https://ovs.com.ua/ua/nasos-tsentrobegnyj-saer-saer-m-400v-1-5-kvt-10-m3-chas-52-m?srsrtid=AfmBOopD79O0-QdotYgLLf5ViRqblh7ucpX2bs_WcK_g6p7MuJ-8-rBb

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря відбирають через вертикальну повітрязабірну трубу з повітрязабірним пристроєм, розміщеним на 15 м вище рівня землі, що сприяє зменшенню вмісту пилу та мікрофлори.

ДР 1.2. Очищення повітря від грубодисперсних домішок

Повітря, отримане на попередньому етапі, очищають у фільтрі попереднього очищення, де затримуються механічні частки пилу з розміром $\delta > 50$ мкм. Ефективність очищення сягає до 90%, що знижує загальний рівень забруднення повітря та частково зменшує кількість мікроорганізмів, адсорбованих на пилових частках.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Очищене повітря подають у компресор, де його стискають до тиску 0,35–0,5 МПа. У процесі компресії температура повітря підвищується до 120–200 °С, а вологовміст у перерахунку на одиницю об'єму зростає.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення надлишкової вологи

Стиснене повітря надходить до теплообмінника-охолоджувача, де охолоджується до 25–40 °С з використанням охолодженої води як теплоносія. У результаті конденсації водяної пари надлишкова волога відокремлюється в ресивері, при цьому відносна вологість повітря становить 60–70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Після охолодження повітря підігривають у теплообміннику-нагрівачі за допомогою пари низького тиску до температури 60–65 °С, що забезпечує зниження відносної вологості до приблизно 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Бабіна Ю.С.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					57	
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Нагріте повітря спрямовується до головного фільтра тонкого очищення, розташованого поблизу ферментаційних відділень, де досягається ступінь очищення на рівні близько 95%.

ДР 1.7. Кінцеве очищення повітря в індивідуальних фільтрах

Повітря після головного фільтра подається через індивідуальні стерилізувальні фільтри кожного інокулятора та ферментеру до відповідних технологічних пунктів (ТП 3.5, ТП 4.1). Ступінь остаточного очищення повітря становить 99,999%.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 2.1. Приготування та стерилізація 100 мМ натрій-фосфатного буферу

Оскільки зазначено, що підтримка рН важлива для одержання високої активності ферменту, пропонується готувати буфер лише для виробничого біосинтезу. За розрахунками близько 2 мл буфера використовується на 1 л об'єму культуральної рідини задля коригування рН. Тож, враховуючи, що під час виробничого біосинтезу передбачається 600 л культуральної рідини, кількість титранту яка необхідна становить $600 \cdot 2 = 1200$ мл, тобто 1,2 л.

Для приготування 1,2 л 0,1 М розчину натрій-фосфатного буферу з рН 7,4 потрібно зважити 24,26 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 4,07 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (<https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/phosphate-buffer-ph-5-8-to-7-4>). Наважки переносять в скляну колбу об'ємом 2 л, закривають ватно-марлевим корком та передають на стерилізацію в автоклав при 131 °С при 0,15 МПа протягом 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація запасних розчинів мікроелементів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів для стадії колб

Тож, за підрахунками кількість солей на цій стадії (пораховано по об'єму поживного середовища на стадії) є наступним: Na_2SiO_3 - 0,002 г, NaF - 0,001, $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ - 0,001 та Na_2HPO_4 - 0,004. Пропонується передбачити 200 мл

зазначеного розчину, для того, щоб внести 10 мл до кінцевого поживного середовища, тому врахуємо розбавлення (в 20 разів).

На технічних вагах зважують 0,04 г Na_2SiO_3 , 0,02 г NaF , 0,02 г та 0,08 г Na_2HPO_4 . Наважки переносять до колби об'ємом 0,5 л, доливають 200 мл води водопровідної. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та передають на стерилізацію до автоклаву при температурі 131 °С, при 0,15 МПа тривалістю 30 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів для стадії інокулятору на 10 л

Тож, за підрахунками кількість солей на цій стадії (пораховано по об'єму поживного середовища на стадії) є наступним: Na_2SiO_3 - 0,02 г, NaF - 0,01, $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ - 0,01 та Na_2HPO_4 - 0,04. Пропонується передбачити 200 мл зазначеного розчину, для того, щоб внести 100 мл до кінцевого поживного середовища, тому врахуємо розбавлення (в 2 рази).

На технічних вагах зважують 0,04 г Na_2SiO_3 , 0,02 г NaF , 0,02 г та 0,08 г Na_2HPO_4 . Наважки переносять до колби об'ємом 0,5 л, доливають 200 мл води водопровідної. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та передають на стерилізацію до автоклаву при температурі 131 °С, при 0,15 МПа тривалістю 30 хв.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів для стадії інокулятору на 100 л

Тож, за підрахунками кількість солей на цій стадії (пораховано по об'єму поживного середовища на стадії) є наступним: Na_2SiO_3 - 0,2 г, NaF - 0,1, $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ - 0,1 та Na_2HPO_4 - 0,4. Пропонується передбачити 200 мл зазначеного розчину, для того, щоб внести 100 мл до кінцевого поживного середовища, тому врахуємо розбавлення (в 2 рази).

На технічних вагах зважують 0,4 г Na_2SiO_3 , 0,2 г NaF , 0,2 г та 0,8 г Na_2HPO_4 . Наважки переносять до колби об'ємом 0,5 л, доливають 200 мл води водопровідної. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та передають на

стерилізацію до автоклаву при температурі 131 °С, при 0,15 МПа тривалістю 30 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадії одержання інокуляту в колбах на качалках

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 2,7 г пептону, 0,54 г дріжджового екстракту та 0,054 г Fe(III) цитрату. Порошки пересипають до термостійкої конічної скляної колби об'ємом 500 мл. За допомогою скляного мірного циліндру наливають 200 мл води водопровідної та ретельно перемішують для повного розчинення зазначених компонентів. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та передають на стерилізацію до автоклаву при температурі 120 °С, при 0,075 МПа тривалістю 20 хв.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 10,5 г NaCl, 1,75 г Na₂SO₄, 0,3 г KCl, 0,09 г NaHCO₃, 0,04 г KBr, 0,02 г SrCl₂, 0,01 г H₃BO₃, 3,19 г MgCl₂ та 0,97 г CaCl₂. Наважки солей пересипають до термостійкої конічної скляної колби об'ємом 1 л. За допомогою скляного мірного циліндру наливають 330 мл води водопровідної та ретельно перемішують для повного розчинення зазначених компонентів. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та передають на стерилізацію до автоклаву при температурі 131 °С, при 0,15 МПа тривалістю 30 хв.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадії одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 27 г пептону, 5,4 г дріжджового екстракту та 0,54 г Fe(III) цитрату. Порошки пересипають до термостійкої конічної скляної колби об'ємом 2 л. За допомогою скляного мірного циліндру наливають 1300 мл води водопровідної та ретельно перемішують для повного розчинення зазначених компонентів. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та

передають на стерилізацію до автоклаву при температурі 120 °С, при 0,075 МПа тривалістю 20 хв.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 105 г NaCl, 17,5 г Na₂SO₄, 3 г KCl, 0,9 г NaHCO₃, 0,4 г KBr, 0,2 г SrCl₂, 0,1 г H₃BO₃, 31,9 г MgCl₂ та 9,7 г CaCl₂. Наважки солей пересипають до реактору-змішувачу (Р-1) об'ємом 5 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-2) наливають 3650 мл води водопровідної та вмикають мішалку для повного розчинення зазначених компонентів. Композиція самоплином подається до інокулятора (І-3), в якому буде відбуватись процес культивування. Кришка апарату закривається та встановлюється наступний режим стерилізації: 131 °С, при 0,15 МПа тривалістю 30 хв.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадії одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 270 г пептону, 54 г дріжджового екстракту та 5,4 г Fe(III) цитрату. Порошки пересипають до реактору-змішувачу (Р-4) об'ємом 15 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-5) наливають 12,6 л води водопровідної та вмикають мішалку для повного розчинення зазначених компонентів. Реактор закривають кришкою та встановлюється наступний режим стерилізації: 120 °С, при 0,075 МПа тривалістю 20 хв.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1050 г NaCl, 175 г Na₂SO₄, 30 г KCl, 9 г NaHCO₃, 4 г KBr, 2 г SrCl₂, 1 г H₃BO₃, 319 г MgCl₂ та 97 г CaCl₂. Наважки солей пересипають до реактору-змішувачу (Р-6) об'ємом 50 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-7) наливають 36,4 л води водопровідної та вмикають мішалку для повного розчинення зазначених компонентів. Композиція самоплином подається до інокулятора (І-8), в якому буде відбуватись процес культивування. Кришка апарату закривається та встановлюється наступний режим стерилізації: 131 °С, при 0,15 МПа тривалістю 30 хв.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадії одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 2700 г пептону, 540 г дріжджового екстракту та 54 г Fe(III) цитрату. Порошки пересипають до реактору-змішувачу (Р-9) об'ємом 150 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-10) наливають 91 л води водопровідної та вмикають мішалку для повного розчинення зазначених компонентів. Реактор закривають кришкою та встановлюється наступний режим стерилізації: 120 °С, при 0,075 МПа тривалістю 20 хв.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі (Д-12) зважують 10500 г NaCl, 1750 г Na₂SO₄, 300 г KCl, 90 г NaHCO₃, 40 г KBr, 20 г SrCl₂, 10 г H₃BO₃, 2 г Na₂SiO₃, 1 г NaF, 1 г (NH₄)NO₃ та 4 г Na₂HPO₄. Наважки солей пересипають до реактору-змішувачу (Р-13) об'ємом 500 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-14) наливають 364 л води водопровідної та вмикають мішалку для повного розчинення зазначених компонентів. Композиція подається відцентровим насосом (Н-15) до інокулятора (І-19), в якому буде відбуватись процес культивування. Кришка апарату закривається та встановлюється наступний режим стерилізації: 131 °С, при 0,15 МПа тривалістю 30 хв.

ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

На ваговому дозаторі (Д-16) зважують 3190 г MgCl₂ та 970 г CaCl₂. Наважки солей пересипають до реактору-змішувачу (Р-17) об'ємом 50 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-18) наливають 36,5 л води водопровідної та вмикають мішалку для повного розчинення зазначених компонентів. Реактор закривають кришкою та встановлюється наступний режим стерилізації: 131 °С, при 0,15 МПа тривалістю 30 хв.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадії виробничого культивування в ферментері об'ємом 10 м³

ДР 4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-20) зважують 27 кг пептону, 5,4 кг дріжджового екстракту та 0,54 кг Fe(III) цитрату. Порошки пересипають до реактору-змішувачу (Р-21) об'ємом 1500 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-22) наливають 910 л води водопровідної та вмикають мішалку для повного розчинення зазначених компонентів. Реактор закривають кришкою та встановлюється наступний режим стерилізації: 120 °С, при 0,075 МПа тривалістю 20 хв.

ДР 4.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі (Д-24) зважують 105 кг NaCl, 17,5 кг Na₂SO₄, 3 кг KCl, 0,9 кг NaHCO₃, 0,4 кг KBr, 0,2 кг SrCl₂, 0,1 кг H₃BO₃, 0,02 кг Na₂SiO₃, 0,01 кг NaF, 0,01 кг (NH₄)NO₃ та 0,04 кг Na₂HPO₄. Наважки солей пересипають до реактору-змішувачу (Р-25) об'ємом 5000 л. За допомогою об'ємно-вагового дозатору (Д-26) наливають 3640 л води водопровідної та вмикають мішалку для повного розчинення зазначених компонентів. Композиція відцентровим насосом (Н-27) подається до ферментера, в якому буде відбуватись процес культивування. Кришка апарату закривається та встановлюється наступний режим стерилізації: 131 °С, при 0,15 МПа тривалістю 30 хв.

ДР 4.5.3. Приготування та стерилізація композиції В

На об'ємно-ваговому дозаторі (Д-28) зважують 31,9 кг MgCl₂ та 9,7 кг CaCl₂. Наважки солей пересипають до реактору-змішувачу (Р-29) об'ємом 500 л. За допомогою об'ємно-вагового (Д-30) дозатору наливають 365 л води водопровідної та вмикають мішалку для повного розчинення зазначених компонентів. Реактор закривають кришкою та встановлюється наступний режим стерилізації: 131 °С, при 0,15 МПа тривалістю 30 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *Geobacillus* sp. ID17 зберігають на скошеному МПА при 4°С. Пересів роблять кожні 1-3 місяці. Всі роботи з культурою виконують в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають петлею на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 55 °С упродовж 48 год.

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках

Отримані ізолювані колонії (від ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним поживним агаром (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). Тривалість вирощування – 24 год. Засіяні пробірки ставлять у термостат з температурою 55 °С. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У стерильну колбу об'ємом 1 л зливають 200 мл розчину композиції А (від ДР 4.1.1) в асептичних умовах вносять 330 мл розчину композиції Б (від ДР 4.1.2). Семплером вносять 10 мл розчину мікроелементів (від ДР 3.1). Перемішують і розливають по 135 мл в 4 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Geobacillus* sp. ID17, вирощеною на МПА, вносять 15 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), стерильною піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалках. Умови культивування наступні: температура – 55 °С, частота обертання – 150 об/хв, час вирощування – 48 год. Після вирощування культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 10 л

До простерилізованого охолодженого інокулятора (І-3) на 10 л, що містить простерилізовану композицію Б (від ДР 4.2.2.) в асептичних умовах вносять 1,3 л композиції А (від ДР 4.2.1). Стерильним мірним циліндром вносять 100 мл розчину мікроелементів (від ДР 3.2). В сорочку інокулятора подають

холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 55 °С.

Посівний матеріал (від *ТП 5.4*) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 55 °С, швидкість перемішування – 150 об/хв, час вирощування – 24 год. Через барботер подається стерильне повітря від ДР 1.7, а також відводяться відпрацьовані гази.

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 100 л

До простерилізованого охолодженого інокулятора (І-8) на 100 л, що містить простерилізовану композицію Б (від *ДР 4.3.2.*) самоплином подається 13,9 л композиції А (від *ДР 4.3.1.*). Стерильним мірним циліндром вносять 100 мл розчину мікроелементів (від *ДР 4.3.*). В сорочку інокулятора подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 55 °С.

Посівний матеріал (від *ТП 5.5*) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах за допомогою труби перетискування. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 55 °С, швидкість перемішування – 150 об/хв, час вирощування – 24 год. Через барботер подається стерильне повітря, а також відводяться відпрацьовані гази.

ТП 5.7. Вирощування посівного матеріалу в посівного апарату на 1 м³

До простерилізованого охолодженого інокулятора (І-19) на 1000 л, що містить простерилізовану композицію Б (від *ДР 4.4.2.*) за допомогою перистальтичного насосу (Н-11) подають 100 л композиції А (від *ДР 4.4.1.*), а самоплином подається 40 л композиції В (від *ДР 4.4.3.*). В сорочку інокулятора подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 55 °С.

Посівний матеріал (від *ТП 5.6*) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах за допомогою труби перетискування. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 55 °С, швидкість перемішування

– 150 об/хв, час вирощування – 24 год. Через барботер подається стерильне повітря, а також відводяться відпрацьовані гази.

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез

До простерилізованого та охолодженого ферментеру (Ф-32) на 10 м³, що містить простерилізовану композицію Б (від ДР 4.5.2.) за допомогою перистальтичного насосу (Н-23, Н-31) подають 1000 л композиції А (від ДР 4.5.1), а також 40 л композиції В (від ДР 4.5.3). В сорочку ферментера подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 55 °С. До апарату під'єднують колбу з натрій-фосфатним буфером від ДР 2 для коригування рН під час процесу культивування в межах 7,0.

Посівний матеріал (від ТП 5.7) переносять у ферментер в строго асептичних умовах за допомогою труби перетискування. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 55 °С, швидкість перемішування – 150 об/хв, час вирощування – 24 год. Через барботер подається стерильне повітря, а також відводяться відпрацьовані гази.

Культивування ведуть до досягнення активності лаккази 400 Од/мл. Отриману культуральну рідину передають далі на отримання ферменту.

РОЗДІЛ 8

ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛАККАЗИ

Оскільки лакказу у даного штаму є позаклітинним ферментом, первинним етапом обробки було відокремлення клітинної біомаси від культуральної рідини шляхом центрифугування. Культуральний бульйон центрифугували при 13 000×g протягом 15 хвилин за температури 10 °С. Зниження температури на цьому етапі є критично важливим для збереження нативної структури ферменту та запобігання його термічній і протеолітичній деградації. Після центрифугування клітинний осад відокремлювали, а надосадову рідину використовували як сирий ферментний препарат (Umar, & Ahmed, 2022).

Наступним етапом проводили часткове очищення лаккази методом фракційного осадження сульфатом амонію, який є класичним та економічно доцільним способом концентрування ферментів у біотехнологічній практиці. До охолодженого надосаду поступово додавали тонкоподрібнений $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ за постійного перемішування до досягнення заданого ступеня насичення — спочатку 60%, а згодом 80%. Такий підхід дозволяє селективно осаджувати білки залежно від їхньої розчинності та ізоелектричних властивостей, водночас зменшуючи кількість супутніх домішок (Umar, & Ahmed, 2022).

Після внесення необхідної кількості сульфату амонію суміш інкубували протягом ночі при 4 °С для повного формування білкових преципітатів. Отримані осади відокремлювали шляхом центрифугування при 12 000×g упродовж 35 хвилин. Осад, що містив ферментну активність лаккази, акуратно відбирали, тоді як надосадову рідину відбраковували (Umar, & Ahmed, 2022).

Осаджені білки розчиняли у 20 мМ цитратно-фосфатному буфері (рН 5,0), який відповідає оптимальному діапазону стабільності та активності лакказ. Використання даного буфера дозволяє зберегти каталітичні властивості ферменту та запобігти його денатурації (Umar, & Ahmed, 2022).

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Бабіна Ю.С.				РОЗДІЛ 8 ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЛАККАЗИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Стабніков В.П.						67	85
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Зазвичай наступним етапом є діаліз ферменту для видалення залишків сульфату амонію, проте ми готуємо технічний фермент, тому можна проігнорувати даний етап в цьому випадку (Umar, & Ahmed, 2022).

Після осадження білків сульфатом амонію та розчинення ферментного осаду у 20 мМ цитратно-фосфатному буфері (рН 5,0) препарат лаккази піддавали стадії сушіння з метою отримання стабільної ферментної форми, придатної для зберігання та подальшого використання у процесах біовідбілювання макулатури (Umar, & Ahmed, 2022).

З огляду на технологічне призначення препарату, а також на високу термостабільність бактеріальної лаккази, застосування ліофілізації не є доцільним. Ліофільне сушіння є енергозатратним, потребує спеціалізованого обладнання та зазвичай використовується для отримання ферментів високої чистоти або препаратів медичного й аналітичного призначення. У випадку технічних ферментів для целюлозно-паперової промисловості така ступінь збереження структури є надлишковою (Liu et al., 2016).

Вибір розпилювального сушіння є технологічно обґрунтованим, оскільки даний метод широко застосовується для одержання технічних ферментних препаратів, призначених для промислового використання. Розпилювальна сушарка забезпечує швидке видалення вологи за рахунок короткочасного контакту дрібнодисперсних крапель із гарячим сушильним агентом, що мінімізує теплове навантаження на білкову молекулу. З огляду на високу термостабільність бактеріальної лаккази, збереження ферментативної активності під час сушіння є технологічно досяжним навіть за підвищених температур повітря (Liu et al., 2016).

Розпилювальне сушіння проводили в умовах, що забезпечують стабільність ферменту (середньо – 60 °С), із температурою повітря на вході у сушарку в межах 80–70 °С та температурою на виході 40–30 °С. При цьому фактична температура ферментного препарату залишається значно нижчою за температуру сушильного агента, що запобігає термічній денатурації лаккази.

Цитратно-фосфатний буфер, у якому знаходився фермент, додатково виконує функцію стабілізатора під час процесу дегідратації (Liu et al., 2016).

У результаті розпилювального сушіння отримували дрібнодисперсний порошкоподібний препарат лаккази, який не потребує додаткового подрібнення та є безпосередньо придатним для дозування і внесення у водну целюлозну пульпу під час процесу біовідбілювання макулатури (Liu et al., 2016).

Сухий препарат лаккази фасували у герметичні контейнери, виготовлені з вологонепроникних матеріалів, з метою захисту від впливу навколишнього середовища. З огляду на гігроскопічність білкових препаратів та наявність у складі буферних солей, до пакування додатково включали осушувач (силікагель) для адсорбції залишкової вологи.

Використання силікагелю дозволяє:

- стабілізувати вологість усередині упаковки;
- запобігти злежуванню порошку;
- мінімізувати ризик гідролітичної деградації ферменту під час зберігання.

Пакування проводили таким чином, щоб осушувач не контактував безпосередньо з ферментним препаратом, а виконував виключно функцію регуляції вологості повітря в упаковці.

Отриманий у такий спосіб сухий ферментний препарат лаккази є зручним для транспортування, тривалого зберігання та подальшого використання у процесах біовідбілювання макулатури, де ключовими вимогами є стабільність, відтворюваність дії та простота технологічного застосування.

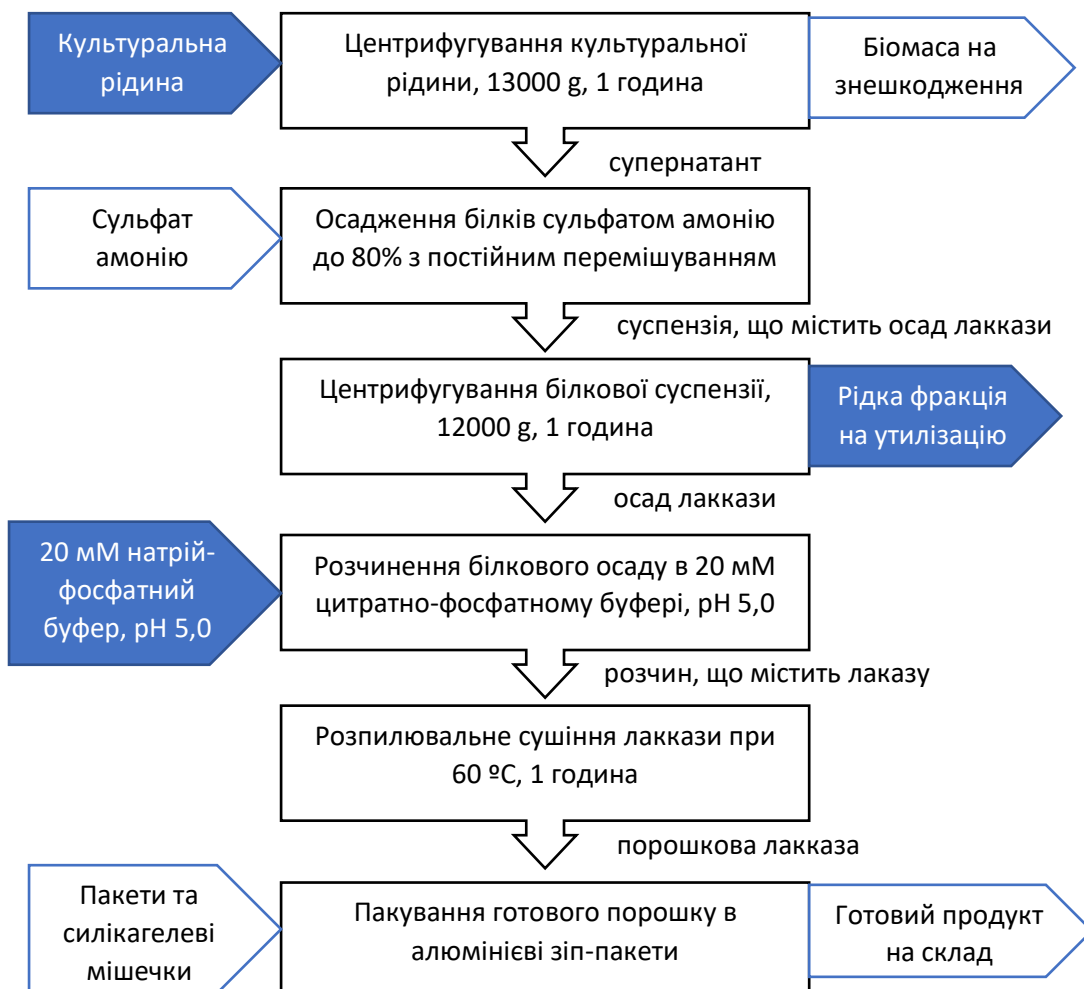


Рис.8.1. Блок-схема виділення та очищення лаккази

РОЗДІЛ 9

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Мікробіологічний контроль

Культивування бактерій *Geobacillus* sp. ID17 з метою одержання лаккази проводиться в асептичних умовах. Мікробіологічний контроль здійснюють для контролю стерильності поживних середовищ для вирощування інокуляту і середовищ для біосинтезу цільового продукту, а також для виявлення сторонньої мікробіоти у посівному матеріалі і культуральній рідині під час біосинтезу. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби поживного середовища, готового посівного матеріалу і культуральної рідини на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем і подальшим мікроскопуванням колоній, які вирости на середовищі після інкубування (Красінько, Сулейко, & Удимович, 2022).

Пробу стерилізованого поживного середовища відбирають в об'ємі 50 мл і роблять прямий висів на стерилізовані чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем, інкубують (Красінько, Сулейко, & Удимович, 2022).

Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єму проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА (сусло-агар) – для виявлення грибів і дріжджів і МПА (м'ясо-пептонний агар) – для виявлення бактерій. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають поміщають у термостат за температури 30-34 °С. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6...8 години. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів (Красінько, Сулейко, & Удимович, 2022).

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини можна здійснювати прямим висівом на агаризовані поживні середовища і/або

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.01 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Бабіна Ю.С.</i>			РОЗДІЛ 9 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>					71	85
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

мікроскопіюванням (Красінько, Сулейко, & Удимович, 2022).

Контроль чистоти культури *Geobacillus* здійснюють шляхом висіву проби культуральної рідини або готового посівного матеріалу на чашки Петрі з твердим поживним середовищем методом виснажувального штриха з метою отримання ізольованих колоній. Після інкубування колоній, що вирости, проводять їх мікроскопічне дослідження для підтвердження морфологічної відповідності мікроорганізму. Для культивування термофільних бактерій роду *Geobacillus*, зокрема штаму *Geobacillus* sp. ID17, як правило, використовують поживні середовища, придатні для термофілів: поживний агар (Nutrient agar), термостабільний триптиказо-соевий агар (TSA), агар на основі дріжджового екстракту і пептону (наприклад, LB-агар з підвищеним рН), а також спеціалізовані середовища з підвищеним вмістом мінералів або вуглеводів (наприклад, агар з крохмалем, агар з глюкозою чи целобіозою). Інкубацію проводять при температурах, оптимальних для *Geobacillus* (переважно 55–65 °С), зазвичай протягом 24–48 годин (Красінько, Сулейко, & Удимович, 2022; Novik, Savich, & Meerovskaya, 2018; <https://www.tgw1916.net/Bacillus/stearothermophilus.html>).

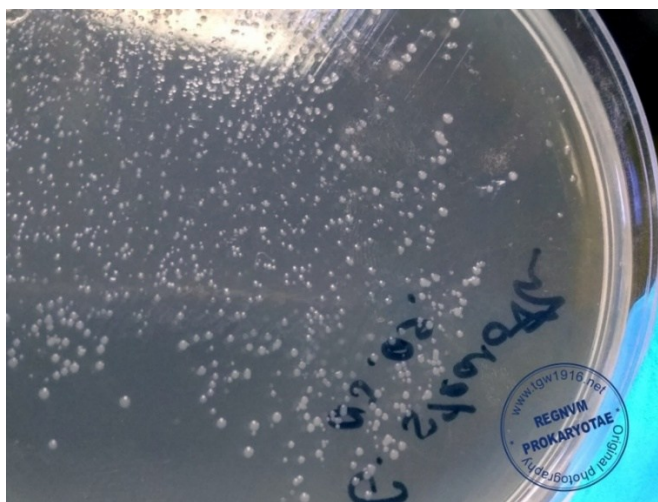


Рис.9.1. Колонії *Geobacillus stearothermophilus* на ВНІ агарі, інкубовані при 56 °С (<https://www.tgw1916.net/Bacillus/stearothermophilus.html>)

Мікроскопіювання проводять світловим мікроскопом з імерсійною системою. Під час мікроскопіювання за відсутності сторонньої мікробіоти,

можна спостерігати видовжені палички, іноді з ендоспорами. При фарбуванні за грамом палички набувають синього кольору, оскільки обраний біологічний агент є грампозитивною бактерією (<https://www.tgw1916.net/Bacillus/stearothermophilus.html>).

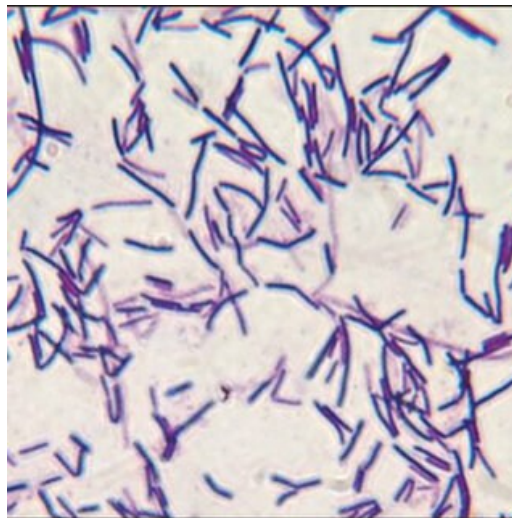


Рис.9.2. Клітини *Geobacillus* sp. KP43 зафарбовані за грамом (збільшення не вказано) (Khadka et al, 2022)

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

9.2.1. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси в процесі культивування визначали спектрофотометричним методом за оптичною густиною культуральної рідини при довжині хвилі 600 нм (OD_{600}) із використанням спектрофотометра Genesys 20 (Thermo Scientific). Перед вимірюванням зразки культуральної рідини розводили фізіологічним розчином (0,9 % мас./об. NaCl) до значень OD_{600} у діапазоні 0,06–0,25, що забезпечує лінійність залежності між оптичною густиною та концентрацією клітин (Ljungqvist, Daga-Quisbert, van Maris, & Gustavsson, 2024).

Для калібрування спектрофотометричних вимірювань та переведення значень OD_{600} у концентрацію сухої біомаси визначали суху масу клітин (cell dry weight, CDW). У біореакторних культиваціях аналіз CDW проводили в триплікатах у чотирьох часових точках протягом процесу культивування. Для цього відбирали по 10 мл культуральної рідини, які центрифугували при 4500

об/хв на центрифугі Z206A (Hermle, Gosheim, Німеччина). Отриманий клітинний осад промивали демінералізованою водою для видалення залишків поживного середовища, після чого висушували до сталої маси в сушильній шафі при температурі 110 °C протягом ночі (Ljungqvist, Daga-Quisbert, van Maris, & Gustavsson, 2024).

На основі отриманих експериментальних даних визначали коефіцієнт перерахунку між оптичною густиною та сухою масою клітин. Значення співвідношення OD₆₀₀ : CDW становило 2,7, яке надалі використовували для переведення всіх експериментально вимірених значень OD₆₀₀ у концентрацію сухої біомаси (г/л) (Ljungqvist, Daga-Quisbert, van Maris, & Gustavsson, 2024).

9.2.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

Для визначення загального вмісту карбону (C) та азоту (N) у пептоні та дріжджовому екстракті було використано органічний елементарний аналіз, який дозволяє якісно та кількісно оцінити вміст основних елементів у складі органічної речовини. Аналіз проводився за допомогою елементарного аналізатора Thermo Scientific Flash 2000, оснащеного термокондуктометричним детектором (Silva-Castro et al, 2015).

Метод базується на повному окисленні зразка в умовах високої температури (близько 900–1000 °C) у присутності кисню, що призводить до утворення простих газоподібних продуктів — вуглекислого газу (CO₂) та азоту у вигляді молекулярного азоту (N₂) або його оксидів. Після цього газу транспортуються інертним носієм (гелієм) через систему очищення та хроматографічну колонку до термокондуктометричного детектора, де фіксується їх кількість. Отримані дані дозволяють обчислити масову частку карбону та азоту у зразку (https://www.spectro-lab.pl/wp-content/uploads/2017/04/HR_BR11007_E_FLASH2000_ProductBrochure03_11C.pdf).

Обладнання та матеріали (https://www.spectro-lab.pl/wp-content/uploads/2017/04/HR_BR11007_E_FLASH2000_ProductBrochure03_11C.pdf):

- Елементарний аналізатор Thermo Scientific Flash 2000;
- Тиглі (олов'яні або срібні капсули);
- Аналітичні ваги з точністю до 0,1 мг;
- Сухі зразки пептону та дріжджового екстракту для порівняння;
- Кисень високої чистоти (як окислювач);
- Гелій високої чистоти (як носій газу);
- Окислювальні каталізатори (вольфрамовий триоксид або мідь з оксидом хрому);
- Засоби для очищення газів (наприклад, магнієвий пероксид, вапно, тощо).

Для проведення аналізу вмісту загального карбону та азоту у складових поживного середовища (пептоні, дріжджовому екстракті) використовували культуральну рідину, а саме — її надосадову фракцію (супернатант), отриману після центрифугування біомаси мікроорганізмів. Центрифугування здійснювали при 9000 g протягом 10 хв для відокремлення клітинного осаду. Отриманий супернатант містив розчинені компоненти середовища, включно з органічними сполуками, джерелами карбону та азоту, які не були засвоєні мікроорганізмами або є продуктами їх метаболізму (Atalah et al, 2022).

Перед подачею до аналізатора зразки супернатанту необхідно було підготувати. Для цього брали аліквоту об'ємом 50–100 мкл, яку висушували на попередньо зважених пористих носіях або у відкритих капсулах у сушильній шафі при температурі 60–70 °C до сталої маси. Висушування забезпечує усунення води, яка може заважати точності аналізу, адже вміст карбону та азоту визначається у відсотках до сухої речовини. Після висушування зразки подрібнювали (при необхідності) до однорідної консистенції та зважували навіску масою 2–3 мг для подальшого аналізу (Capezza, 2020; https://www.spectro-lab.pl/wp-content/uploads/2017/04/HR_BR11007_E_FLASH2000_ProductBrochure03_11C.pdf).

У якості контрольних зразків та для калібрування приладу використовували стандартні сухі речовини з відомим вмістом карбону та азоту, наприклад, L-цистеїн або аспарагінову кислоту. Вони дозволяли скоригувати точність вимірювань та забезпечити достовірність отриманих результатів (https://www.spectro-lab.pl/wp-content/uploads/2017/04/HR_BR11007_E_FLASH2000_ProductBrochure03_11C.pdf).

Елементарний аналіз вмісту карбону та азоту здійснювали з використанням приладу Thermo Scientific Flash 2000, який працює за методом високотемпературного окиснення з подальшим термокондуктометричним виявленням газів. Отримані гази транспортуються потоком інертного газу (гелію) через систему колонок до термокондуктометричного детектора. Величина сигналу, який реєструє детектор, прямо пропорційна концентрації відповідного елемента в зразку. Для кожного зразка проводився як мінімум подвійний аналіз, щоб забезпечити повторюваність та точність вимірювань (https://www.spectro-lab.pl/wp-content/uploads/2017/04/HR_BR11007_E_FLASH2000_ProductBrochure03_11C.pdf).

З метою уникнення похибок, перед вимірюванням кожної серії зразків проводили автоматичне очищення колонок та контрольну перевірку стабільності сигналу на стандартному зразку. Після завершення аналізу програма обробки даних приладу автоматично розраховувала відсотковий вміст карбону та азоту у кожному зразку, з урахуванням маси навіски та калібрувальних коефіцієнтів (https://www.spectro-lab.pl/wp-content/uploads/2017/04/HR_BR11007_E_FLASH2000_ProductBrochure03_11C.pdf).



Рис.9.3. Термокондуктометр FLASH 2000 CHNS/O (https://www.spectro-lab.pl/wp-content/uploads/2017/04/HR_BR11007_E_FLASH2000_ProductBrochure03_11C.pdf)

9.2.3. Визначення концентрації та активності лаккази

Для визначення ферментативної активності лаккази використовували спектрофотометричний метод з гуаяколом як субстратом. Принцип методу ґрунтується на здатності лаккази каталізувати окиснення гуаяколу до хінону, що супроводжується появою забарвлення, яке вимірюється при довжині хвилі 470 нм (Bibi, Yasmin, Blanford, & Safdar, 2023).

Підготовка реакційної суміші (Bibi, Yasmin, Blanford, & Safdar, 2023):

До кювети або реакційної пробірки додавали:

- 50 мкл гуаяколу, розчиненого в 500 мкл абсолютного етанолу;
- 1,5 мл ферментного зразка (супернатант культуральної рідини);
- 1,5 мл 20 мМ фосфатного буфера (рН 5,0).

Отриману суміш інкубували при температурі 80 °С протягом 10 хвилин. Після інкубації поглинання вимірювали при довжині хвилі 470 нм (A_{470}) на спектрофотометрі відносно бланку, що містив усі компоненти реакції, крім ферментного зразка (Bibi, Yasmin, Blanford, & Safdar, 2023).

Для обчислення активності лаккази використовували наступну формулу (Bibi, Yasmin, Blanford, & Safdar, 2023):

$$\text{Активність (Одиниць/мл)} = (\Delta A / \Delta t \times V) / \epsilon \times v \times t$$

де:

$\Delta A/\Delta t$ — зміна оптичної густини за хвилину (градієнт лінії);

V — загальний об'єм реакційної суміші в кюветі (мл);

ϵ — молярний коефіцієнт екстинкції для гуаяколу при 470 нм, що дорівнює $26\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$;

v — об'єм зразка ферменту, внесений у реакцію (мл);

t — час інкубації (хвилини).

Одна одиниця активності ферменту (U) визначається як така кількість ферменту, яка каталізує утворення 1 мкмоль окисненого гуаяколу за 1 хвилину при зазначених умовах (Bibi, Yasmin, Blanford, & Safdar, 2023).

Визначення концентрації білка в зразках лаккази здійснювали за методом Бредфорда, що базується на утворенні комплексу між білками і барвником Coomassie Brilliant Blue G-250, який має максимум поглинання при 595 нм у зв'язку з білком (Bibi, Yasmin, Blanford, & Safdar, 2023).

Порядок проведення аналізу (Bibi, Yasmin, Blanford, & Safdar, 2023):

Готували стандартну криву з використанням розчинів бичачого сироваткового альбуміну (BSA) у діапазоні концентрацій (наприклад: 0,05–0,5 мг/мл). До кожної пробірки додавали 200 мкл робочого розчину барвника Бредфорда і 20 мкл зразка або стандартного розчину BSA. Інкубували при кімнатній температурі 10 хвилин. Вимірювали оптичну густину при 595 нм. Побудовували калібрувальну криву і визначали концентрацію білка в зразках лаккази (Bibi, Yasmin, Blanford, & Safdar, 2023).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Agrawal, K., & Verma, P. (2019). Laccase: addressing the ambivalence associated with the calculation of enzyme activity. *3 Biotech*, *9*(10), 365. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1895-1>

Ansari, M. K. A., Lastochkina, O., Iqbal, M., Ansari, A. A., Fatma, T., Rodriguez-Couto, S., & Owens, G. (2021). Laccase-The wonder enzyme for a variety of industries. *Acta Scientific MICROBIOLOGY* (ISSN: 2581-3226), *4*(12). [https://www.researchgate.net/publication/360147888_Laccase -
The Wonder Enzyme for a Variety of Industries](https://www.researchgate.net/publication/360147888_Laccase_-_The_Wonder_Enzyme_for_a_Variety_of_Industries)

Atalah, J., & Blamey, J. M. (2022). Isolation and characterization of a novel laccase from an Antarctic thermophilic *Geobacillus*. *Antarctic Science*, *34*(4), 289-297. <http://dx.doi.org/10.1017/S0954102022000074>

Atalla, M. M., Zeinab, H. K., Eman, R. H., Amani, A. Y., & Abeer, A. A. E. A. (2013). Characterization and kinetic properties of the purified *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. *Saudi journal of biological sciences*, *20*(4), 373-381. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.001>

Aytaç, A., & Korkmaz, M. (2022). An analysis of the World paper industry with a focus on Europe and trade perspective. *Studia Universitatis Vasile Goldiș Arad, Seria Științe Economice*, *32*(2), 24-40. <http://dx.doi.org/10.2478/sues-2022-0007>

Aza, P., & Camarero, S. (2023). Fungal laccases: Fundamentals, engineering and classification update. *Biomolecules*, *13*(12), 1716. <https://doi.org/10.3390/biom13121716>

Bibi, M., Yasmin, A., Blanford, C., & Safdar, N. (2023). Production and characterization of a highly stable laccase from extreme thermophile *Geobacillus stearothermophilus* MB600 isolated from hot spring of Gilgit Balitistan (Pakistan). *Journal of Taibah University for Science*, *17*(1), 2268903. <https://doi.org/10.1080/16583655.2023.2268903>

Capezza, A. J. (2020). *Sustainable Biobased Protein Superabsorbents from Agricultural Co-Products* (Doctoral dissertation, KTH Royal Institute of Technology).

Chauhan, P. S., Goradia, B., & Saxena, A. (2017). Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*, *7*(5), 323. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0955-7>

Conigliaro, P., Portaccio, M., Lepore, M., & Delfino, I. (2023). Optical Properties of Laccases and Their Use for Phenolic Compound Detection and Quantification: A Brief Review. *Applied sciences*, *13*(23), 12929. <https://doi.org/10.3390/app132312929>

Costa, J. B., Lima, M. J., Sampaio, M. J., Neves, M. C., Faria, J. L., Morales-Torres, S., ... & Silva, C. G. (2019). Enhanced biocatalytic sustainability of laccase by immobilization on functionalized carbon nanotubes/polysulfone membranes. *Chemical Engineering Journal*, *355*, 974-985. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.178>

Couto, S. R., & Herrera, L. T. (2006). Inhibitors of laccases: a review. *Current Enzyme Inhibition*, *2*(4), 343-352. <http://dx.doi.org/10.2174/157340806778699262>

Fernández-Remacha, D., González-Riancho, C., Lastra Osua, M., González Arce, A., Montánchez, I., García-Lobo, J. M., ... & Kaberdin, V. R. (2022). Analysis of laccase-like enzymes secreted by fungi isolated from a cave in northern Spain. *MicrobiologyOpen*, *11*(2), e1279. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1279>

Ferraroni, M., Westphal, A. H., Borsari, M., Tamayo-Ramos, J. A., Briganti, F., Graaff, L. H. D., & Berkel, W. J. V. (2017). Structure and function of *Aspergillus niger* laccase McoG. *Biocatalysis*, *3*(1), 1-21. <http://dx.doi.org/10.1515/boca-2017-0001>

Gałązka, A., Jankiewicz, U., & Szczepkowski, A. (2023). Biochemical characteristics of laccases and their practical application in the removal of xenobiotics from water. *Applied Sciences*, *13*(7), 4394. <https://doi.org/10.3390/app13074394>

Govil, T., Saxena, P., Samanta, D., Singh, S. S., Kumar, S., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2020). Adaptive enrichment of a thermophilic bacterial isolate for enhanced enzymatic activity. *Microorganisms*, *8*(6), 871. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060871>

Jaiswal, N., & Jaiswal, P. (2024). Thermostable α -Amylases and Laccases: Paving the Way for Sustainable Industrial Applications. *Processes*, 12(7), 1341. <https://doi.org/10.3390/pr12071341>

Jones, C. K., McKilligan, D., Tokach, M. D., Goodband, R. D., Nelssen, J. L., DeRouchey, J. M., & Dritz, S. S. (2009). An evaluation of peptone as a specialty protein source in diets for nursery pigs. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*, (10), 80-89. <http://dx.doi.org/10.4148/2378-5977.6779>

Kaczmarek, M. B., Kwiatos, N., Szczesna-Antczak, M., & Bielecki, S. (2017). Laccases—enzymes with an unlimited potential. *Biotechnology and Food Science*, 81(1), 41-70.

Kenealy, W. R., & Jeffries, T. W. (2003). Enzyme processes for pulp and paper: a review of recent developments. In *Wood deterioration and preservation: advances in our changing world*. Washington, DC: American Chemical Society: Distributed by Oxford University Press, 2003. ACS symposium series; 845: Pages 210-239. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2003-0845.ch012>

Khadka, S., Khadka, D., Poudel, R. C., Bhandari, M., Baidya, P., Sijapati, J., & Maharjan, J. (2022). production optimization and biochemical characterization of cellulase from *Geobacillus* sp. KP43 Isolated from hot spring water of Nepal. *BioMed Research International*, 2022(1), 6840409. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/6840409>

Khaswal, A., Chaturvedi, N., Mishra, S. K., Kumar, P. R., & Paul, P. K. (2022). Current status and applications of genus *Geobacillus* in the production of industrially important products—a review. *Folia Microbiologica*, 67(3), 389-404. <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-022-00961-w>

Kudanga, T., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M., & Burton, S. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme and microbial technology*, 48(3), 195-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.007>

Lin, H., Yu, Z., Wang, Q., Liu, Y., Jiang, L., Xu, C., & Xian, M. (2023). Application of laccase catalysis in bond formation and breakage: A review. *Catalysts*, 13(4), 750. <https://doi.org/10.3390/catal13040750>

Liu, J., Yu, Z., Liao, X., Liu, J., Mao, F., & Huang, Q. (2016). Scalable production, fast purification, and spray drying of native *Pycnoporus* laccase and circular dichroism characterization. *Journal of Cleaner Production*, *127*, 600-609. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.03.154>

Ljungqvist, E., Daga-Quisbert, J., van Maris, A., & Gustavsson, M. (2024). Insights into the rapid metabolism of *Geobacillus* sp. LC300: unraveling metabolic requirements and optimal growth conditions. *Extremophiles*, *28*(1), 6. <https://doi.org/10.1007/s00792-023-01319-x>

Loi, M., Glazunova, O., Fedorova, T., Logrieco, A. F., & Mulè, G. (2021). Fungal laccases: The forefront of enzymes for sustainability. *Journal of Fungi*, *7*(12), 1048. <https://doi.org/10.3390/jof7121048>

Lokko, Y., Heijde, M., Schebesta, K., Scholtès, P., Van Montagu, M., & Giacca, M. (2018). Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development. *New biotechnology*, *40*, 5-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.06.005>

Mar, W. W., Rohman, A., Muwafiqi, N. H., Laras, G. A., Agustina, D., & PUSPANINGSIH, N. N. T. (2020). Preliminary phylogenetic analysis of bacteria producing laccase isolated from Gunung Pancar, Bogor, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *21*(5). <http://dx.doi.org/10.13057/biodiv/d210539>

Mate, D. M., & Alcalde, M. (2017). Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial biotechnology*, *10*(6), 1457-1467. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>

Mboowa, D. (2024). A review of the traditional pulping methods and the recent improvements in the pulping processes. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *14*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01243-6>

Mojsov, K. (2014). Biotechnological applications of laccases in the textile industry. *Advanced Technologies*, *3*(1), 76-79. <http://dx.doi.org/10.5937/savteh1401076M>

Novik, G., Savich, V., & Meerovskaya, O. (2018). *Geobacillus* Bacteria: potential commercial applications in industry, bioremediation, and bioenergy

production. In *Growing and handling of bacterial cultures*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76053>

Paraschiv, G., Ferdes, M., Ionescu, M., Moiceanu, G., Zabava, B. S., & Dinca, M. N. (2022). Laccases—versatile enzymes used to reduce environmental pollution. *Energies*, *15*(5), 1835. <https://doi.org/10.3390/en15051835>

Ren, Y., Strobel, G., Sears, J., & Park, M. (2010). *Geobacillus* sp., a thermophilic soil bacterium producing volatile antibiotics. *Microbial ecology*, *60*, 130-136. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9630-9>

Scheibel, D. M., Gitsov, I. P. I., & Gitsov, I. (2024). Enzymes in “Green” synthetic chemistry: Laccase and Lipase. *Molecules*, *29*(5), 989. <https://doi.org/10.3390/molecules29050989>

Sharma, N., Bhardwaj, N. K., & Singh, R. B. P. (2020). Environmental issues of pulp bleaching and prospects of peracetic acid pulp bleaching: A review. *Journal of Cleaner Production*, *256*, 120338. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120338>

Shraddha, N., Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., & Kumar, A. (2011). Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme research*, *2011*(1), 217861. <https://doi.org/10.4061/2011/217861>

Silva-Castro, G. A., Uad, I., Gonzalez-Martinez, A., Rivadeneyra, A., Gonzalez-Lopez, J., & Rivadeneyra, M. A. (2015). Bioprecipitation of calcium carbonate crystals by bacteria isolated from saline environments grown in culture media amended with seawater and real brine. *BioMed research international*, *2015*(1), 816102. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/816102>

Singh, A. K., Abellanas-Perez, P., de Andrades, D., Cornet, I., Fernandez-Lafuente, R., & Bilal, M. (2025). Laccase-based biocatalytic systems application in sustainable degradation of pharmaceutically active contaminants. *Journal of Hazardous Materials*, *485*, 136803. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136803>

Singh, G., & Arya, S. K. (2019). Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology. *International journal of biological macromolecules*, *134*, 1070-1084. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.168>

Singh, G., Kaur, K., Puri, S., & Sharma, P. (2015). Critical factors affecting laccase-mediated biobleaching of pulp in paper industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(1), 155-164. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6219-0>

Su, J., Fu, J., Wang, Q., Silva, C., & Cavaco-Paulo, A. (2018). Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 294-307. <http://dx.doi.org/10.1080/07388551.2017.1354353>

Umar, A., & Ahmed, S. (2022). Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. *Scientific Reports*, 12(1), 2416. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06111-z>

Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. K. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, 6(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>

Välimets, S., Pedetti, P., Virginia, L. J., Hoang, M. N., Sauer, M., & Peterbauer, C. (2023). Secretory expression of recombinant small laccase genes in Gram-positive bacteria. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 72. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-023-02075-5>

Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P., & Narasimha, G. (2014). Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme research*, 2014(1), 163242. <https://doi.org/10.1155/2014/163242>

Wikee, S., Hatton, J., Turbé-Doan, A., Mathieu, Y., Daou, M., Lomascolo, A., ... & Record, E. (2019). Characterization and dye decolorization potential of two laccases from the marine-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1864. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20081864>

Zeigler, D. R. & The Bacillus Genetic Stock Center. (2001). *The Genus Geobacillus Introduction and Strain Catalog*. https://bgsc.org/_catalogs/Catpart3.pdf

Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: методичні рекомендації до вивчення

дисципліни, проведення практичних занять та виконання контрольної роботи для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр», спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. та заоч. форм навч. / уклад. В.О. Красінько, Т.Л. Сулейко, В.М. Удимович, К.: НУХТ, 2022. – 45 с.