

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)
Грегирчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

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

«__» _____ 20__ р.

«__» _____ 20__ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: «Одержання глюкоамілази культивуванням *Aspergillus awamori*»

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

Афанасьєв Ілля Дмитрович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

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

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Івасюк А.В.
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2021р.

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 «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“ 28 ” 10 2021 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Афанасьєва Іллі Дмитровича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Одержання глюкоамілази культивуванням *Aspergillus awamori*»

керівник роботи Скροцька О.І., доц., к.б.н.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “27” жовтня 2020 року № 875

2. Строк подання здобувачем роботи 31.01.2021 р.

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 10м³,
коефіцієнт заповнення ферментера становить 0,6,

цільовий продукт глюкоамілаза, виробничий штам *Aspergillus awamori*,

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) _____

Характеристика цільового продукту

Характеристика біологічного агента

Техніко-економічне обґрунтування

Обґрунтування вибору технологічної схеми

Специфікація обладнання

Опис технологічної схеми

Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва глюкоамілази формату А1- аркушів 2

Апаратна схема виробництва глюкоамілази формату А1 - аркушів 1

РЕФЕРАТ

Амілолітичні ферментні препарати застосовуються в харчовій промисловості. Широкого застосування вони набули для покращення харчових якостей кормів в сільському господарстві..

Дипломний проект присвячено розробленню ділянки до ферментаційних робіт та виробничого культивування штаму гриба *Aspergillus awamori* аму Ху1 Т-15 (ВКМ F-4278D) – продуцента глюкоамілази. Культивування *A. awamori* аму Ху1 Т-15 (ВКМ F-4278D) на економічно вигідному для промислових масштабів поживному середовищі на основі екструдату пшеничного борошна дає можливість отримати активність глюкоамілази в культуральній рідині до 700 од/мл.

Технологія виробництва глюкоамілази складається з допоміжних робіт (приготування розчину соляної кислоти, приготування та стерилізація поживного середовища) та основних процесів (вирощування інокуляту в колбах на качалці, 10 л, 100 л та 1000 л інокуляторах та виробничого культивування у ферментері, об'ємом 10 м³), що наведені в технологічній схемі.

Дипломний проект викладений на 58 сторінках друкованого тексту містить 8 таблиць, 4 рисунка і складається з вступу, 7 розділів, списку використаної літератури (29 джерел) та графічної частини (4 креслення формату А 1).

Ключові слова: *Aspergillus awamori*, глюкоамілаза, амілолітичні ферменти, біосинтез.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	8
РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента.....	12
2.1. Вибір біологічного агенту та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	15
2.3. Таксономічний статус біологічного агенту.....	17
2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	18
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	19
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	19
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	21
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	22
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	23
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	27
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу....	27
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	27
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	28
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	30
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	34
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	35
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	38
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	47
7.1. Карта постадійного контролю.....	47
7.2. Мікробіологічний контроль.....	51
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	52
7.3.1. Концентрація біомаси.....	52
7.3.2. Концентрація цільового продукту.....	52
7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	53
ЛІТЕРАТУРА.....	56
ДОДАТОК.....	59

ВСТУП

Глюкоамілаза ГЗХ – ферментний препарат для поліпшення перетравлення кормів у сільськогосподарських тварин і птахів.

Препарат являє собою однорідний порошок, добре розчинний у воді. Містить у своєму складі глюкоамілазу, мальтазу, α -амілазу та інші ферменти.

Застосовують для підвищення перетравності та засвоєння поживних речовин в раціоні тварин [1,2].

Дніпропетровська область сьогодні перша в Україні за кількістю поголів'я свиней, а за об'ємом – входить у трійку кращих. Традиційно понад 50% поголів'я в нашій країні вирощується у домашніх господарствах. Так, Дніпропетровський регіон виділяється серед інших інтенсивним розвитком промислового сегменту. Лише 30% поголів'я вирощує населення, а 70% – середні та крупні господарства (саме така структура була до розпаду Радянського Союзу), серед яких досить міцні позиції займають ТОВ «Деміс-Агро», а також успішне і перспективне на рівні району приватне підприємство «Сігма»[3].

Біотехнологічним шляхом отримують такий важливий фермент, як глюкоамілаза.

Глюкоамілаза гідролізує α -1,4- і α -1,6-глюкановий зв'язку в молекулах декстринів і олігосахаридів, послідовно відщеплює залишки глюкози від нередукуючих кінців[4].

У нашій країні дозволені до застосування у тваринництві цілий ряд ферментних препаратів, що містять амілолітичні, протеолітичні, пектинолітичні, целюлозолітичні ферменти. Одним із шляхів вирішення цього важливого завдання є введення в раціон тварин ферментних препаратів мікробного походження [5].

					НУХТ БТЕК 05.01.11 ДП ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Афанасьєв І.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Скроцька О.І.				1	2
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
Вступ					6		

Фізіологічне значення глюкоамілази для вищих тварин полягає передусім у забезпеченні ефективного гідролізу крохмалевмісних речовин. Відомо, що нестача глюкоамілази в організмі спричинює розвиток серйозних захворювань. У цьому разі ензимна замісна терапія на ранніх стадіях може бути дуже ефективною [6].

Актуальність роботи. У зв'язку з нинішньою ситуацією в Україні попит на харчові добавки різко зростає. Традиційні компоненти стають все більше дороговартісними і постійно ведуть пошук альтернативних замінів. Один із таких джерел є крохмаль. Як відомо, крохмаль є високомолекулярною сполукою, що важко застосовується організмом ссавців. Тоді зростає попит на використання ферментних препаратів, що здатні розщеплювати його, тим самим роблячи доступним для засвоєння. У в'язку використання цих препаратів у тваринництві збільшується ефективність при наборі маси від тих самих кормів.

Новизною роботи є: використання штаму *Aspergillus awamori* Ху1 Т-15 (ВКМ F-4278D) при культивуванні протягом 168 ч на середовищі, що містить ескудат пшеничного борошна, забезпечує активність глюкоамілази в культуральної рідини від 500 до 550 од/мл, ксиланази 80-100 од / мл, при подовженні циклу зростання до 216 ч активність глюкоамілази зростає до 700-750 од/мл [16].

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

ФЕРМЕНТНИЙ ПРЕПАРАТ *ГЛЮКОЛЮКС-F*

Призначення:

ГлюкоЛюкс-Ф використовується в раціонах тварин і птахів з метою поліпшення перетравності і підвищення обмінної енергії раціону за рахунок вивільнення глюкози і мальтози з крохмалю.

Основні характеристики:

ГлюкоЛюкс-Ф - ферментний препарат, що продукується мікробної культурою *Aspergillus awamori*, стандартизується по глюкоамілазної активності.

Випускається у формі порошку.

Склад препарату:

Ферменти	Активність, од / г
глюкоамілаза	щонайменше 1000 становити не менше 3000
ксиланазу	до 600 до 1500
целлюлаза	до 40 до 100
β-глюканаза	до 50 до 125
α-амілаза	до 50 до 125

Біологічні властивості:

Основою фермент - глюкоамілаза, гідролізує вуглеводи кормів до мальтози і глюкози. Супутні целюлолітичні ферменти (ксиланазу, (β-глюканаза, целлюлаза), також містяться в добавці, гідролізують полісахариди рослинної клітини (ксилан, глюкани, целюлозу) до легко засвоюваних сполук.

					НУХТ БТЕК 05.01.11 ДП ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Афанасьєв І.			РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Скороцька О.І.					1	2
Реценз.						Кафедра БТМ 8		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Переваги ГлюкоЛюкса-Р:

- Сприяє збільшенню продуктивності тварин при незмінних раціонах, зниження витрат кормів на одиницю продукції ф підвищує перетравність поживних речовин і покращує їх всмоктування в тонкому відділі кишечника
- Покращує мікробіологічну середу кишечника за рахунок зниження в'язкості і підвищення рівня моноцукрів.
- Доповнює ензиматичний фон шлунково-кишкового тракту у молодняка свиней і ВРХ ф активує імунологічні процеси, що ведуть до підвищення резистентності організму.

Норми введення ГлюкоЛюкса-Р в комбікорм:

Препарат 1000 од/г у кількості 500 г/т

3000 165

Ефект застосування ГлюкоЛюкса-Р в птахівництві:

Збільшення середньодобових приростів до 4% ф зниження витрат кормів на одиницю продукції на 2-4%

Ефект застосування ГлюкоЛюкса-Р в свинарстві:

Збільшення приростів до 8-11%

Збільшення молочної продуктивності свиноматок і поліпшення якості молока

Збільшення збереженості поголів'я на 1-3%.

Ефект застосування ГлюкоЛюкса-Р в скотарстві:

Збільшення приростів молодняка на відгодівлі на 6-8% ф збільшення надоїв на 6-9%

Зниження витрат кормів на одиницю продукції на 5-6% ф збільшення збереженості поголів'я на 1-2%.

Амілази – групова назва ферментів, які каталізують гідролітичні розщеплення глікогену, крохмалю, а також продуктів їх часткового гідролізу– декстринів і мальтоолігосахарідів [6].

Відомі три види амілаз, що відрізняються за кінцевими продуктами ферментативної дії [6, 7]:

- 1) α -амілаза (α -D-1,4-глюканглюканогідролаза, КФ 3.2.1.1)
- 2) β -амілаза (α -D-1,4-глюканмальтогідролаза, КФ 3.2.1.2)
- 3) глюкоамілаза(α -D-глюканглюкогідролаза, КФ 3.2.1.3).

Характеристика та будова глюкоамілази

Глюкоамілаза є екзоамілазою, тобто ферментом, що діє на субстрат з нередукуючого кінця, каталізує перенесення функціональних груп (CH_3 , COOH , NH_2 , та ін) від однієї молекули до іншої відноситься до класу гідролаз [7].

Глюкоамілаза (α -1,4-глюканглюкогідролаза, КФ 3.2.1.3), відома також як амілоглюкозίδαза, γ -амілаза, лізосомальна α -глюкозίδαза, кисла мальтаза, матулаза, екзо- α -1,4-глюкозίδαза [7].

γ -Амілаза розщеплює сирий та розчинний крохмаль з утворенням переважно глюкози і невеликої кількості декстринів. Глюкоамілаза каталізує послідовне відщеплення α -1,4-зв'язаних кінцевих залишків D-глюкози з нередукуючих кінців субстрату, що супроводжується інверсією аномерної конфігурації і утворенням β -глюкози [7].

Глюкоамілаза являє собою добре розчинний у воді білок з молекулярною масою від 50000 до 100000 [6, 8].

Молекулярна маса глюкоамілази грибів роду *Aspergillus* становить 62 000 [8].

Залежно від того, в якій області рН глюкоамілази проявляють максимальну активність їх поділяють на кислі (оптимум рН 4,8–5,0, локалізована в лізосомах), і нейтральні (оптимум рН 6,0–6,5, локалізована в мікросомальній фракції клітини і в гіалоплазмі) [8].

Глюкоамілаза активна в широкому діапазоні рН– від 3,5 до 7,5 з оптимумом при рН 4,5–5,0; в діапазоні температури від 30 до 65°C з оптимумом при 60 – 62°C. Глюкоамілаза стабільна протягом 2 год при 45°C. Інкубування при температурі 55°C протягом 2 год призводило до зниження активності на 50 % [8].

Майже всі глюкоамілази є глікопротеїдами, що містять від 5 до 35% вуглеводів, які складаються з оліго-, ди- і моносахаридів. Вуглеводний

компонент може бути цілісним фрагментом або ж розбитими на індивідуальні сполуки, які прикріплюються до білка через треонін і серин [8, 9].

Біологічна роль та практичне застосування глюкоамілази

Глюкоамілаза гідролізує переважно високомолекулярний субстрат. Низькомолекулярні олігосахариди розщеплюються повільно. Фермент має виражену трансфертну здатність, яка проявляється тим більше, чим вище ступінь гідролізу субстрату і концентрація глюкози в реакційному середовищі. В результаті трансферазної реакції накопичуються такі цукри, як ізомальтоза, паноза, нігероза, ізмальтотріоза та інші. Поява цих продуктів знижує вихід глюкози [9].

У технології спирту при переробці зерна хлібних злаків і картоплі основне завдання – повністю перевести крохмаль в зброджування цукру. Для цього на спиртозаводах застосовують бактеріальну α -амілазу, а також глюкоамілазу. Останній фермент кислотнo-і термостабільний й здатний гідролізувати α -1,6-глікозидні зв'язки. Оскільки гідроліз декстринів в зброджуваний цукор є лімітуючою реакцією процесу бродіння, то висока активність глюкоамілази зумовлює істотне скорочення тривалості бродіння. При 72-х годинному бродінні витрата α -амілази повинна становити 1,5-2,0 од, глюкоамілази – 6,0-6,2 од ГЛА на 1 г перероблюючого крохмалю сировини. Дозування глюкоамілази (1,35– 2,1 кг/1 т крохмалю)[4].

Глюкоамілазна активність характеризується високою оцукруваною здатністю. Оцукрювальна здатність (ОЗ) – кількість редукуючих цукрів, які утворюються при ферментації 2% розчину розчинного крохмалю при рН – 5,5 і температури 45°C за 30 хвилин [10].

РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента

2.1. Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Здатність до синтезу ферменту не є видоспецифічною ознакою. Один і той же фермент може продукуватися організмами, що відносяться до різних видів, родів і навіть порядків. Основними продуцентами глюкоамілази являються штами грибів роду *Aspergillus* – *A.niger*, *A.oryzae*, *A.usamii*, *A.awamori*, *A.batatae*, *Endomycopsis sp.*, *Endomycopsis fibuliger*, *Rhizopus tritici*, *Streptomyces clavuligerus* та інші [9].

На основі даних щодоможливих продуцентиглюкоамілазибула складена узагальнююча таблиця (див. *табл.2.1*) в якій наведений склад поживного середовища та умови культивування продуцента для забезпечення високих показників синтезу ферменту.

Таблиця 2.1

Основні продуцентиглюкоамілази

<i>Продуцент Літ.джерело</i>	<i>Склад поживного середовища (г/л)</i>	<i>Глюкоамілазна активність (од/мл)</i>	<i>Тривалість культивуван ня (год)</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>Rhizopus Tritici</i> T ₁ [11]	картопляна мезга – 90 MgSO ₄ – 1,5 CaCl ₂ – 0,5 KCl – 5 (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 9	15 – 20	72
<i>Endomycopsis fibuliger</i> 21 [12]	гліцерин – 1,5; молочна кислота – 1,0; (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 0,7; KH ₂ PO ₄ – 0,8; MgSO ₄ •7H ₂ O – 0,05; CaCl ₂ – 0,05; ZnSO ₄ •7H ₂ O – 0,001; FeSO ₄ •7H ₂ O – 0,001; MnSO ₄ •4H ₂ O – 0,0005;	37–42	96 – 108

НУХТ БТЕК 05.01.11 ДП ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Афанасьєв І.		
Перевір.		Скороцька О.І.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Пирог Т.П.		

РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
	1	2	
Кафедра БТМ			12

<i>Endomycopsis fibuliger</i> R-574[13]	етанол – 20 ;(NH ₄) ₂ SO ₄ – 3,3 CaCl ₂ – 0,4; KH ₂ PO ₄ – 2; кукурудзяний екстракт – 10	100	8
<i>Aspergillus awamori</i> 466 [14]	солодові ростки – 3 крохмаль – 6 NaNO ₃ – 0,91 KCl – 0,05 MgSO ₄ – 0,05 KH ₂ PO ₄ – 0,1 FeSO ₄ – 0,001	117	72
<i>Aspergillus niger</i> ВКПМ F-501[15]	Житнє борошно – 542,6	180	120
<i>Aspergillusaw amori</i> Xyl T-15 [16]	Пшеничне борошно – 240	700	216
<i>A. awamori</i> amy R-T-19 [5]	Екструдат кукурудзяного борошна – 300	800	192
	Пшенична мука – 240	1040	
	Мальтодекстрин– 10 Пшенична мука – 240	1080	

З даних, наведених в табл. 2.1., видно, що найбільш перспективними штамми, що характеризуються високими показниками синтезу глюкоамілази є: *Aspergillus niger* штам ВКПМ F-501, *Aspergillus awamori* Xyl T-15, *A. Awamori* amy R-T-19.

Найвища глюкоамілазна активність в культуральній рідині – 1200од/мл, досягається при культивуванні *A. awamori*amy R-T-19. Найнища глюкоамілазна активність в культуральній рідині спостерігається у *Aspergillus niger* штам ВКПМ F-501 (180од/мл).

Тривалість культивування для *Aspergillusniger*штам ВКПМ F-501 становить 120 год , *Aspergillus awamori* Xyl T-15 – 168 год, а для *A. awamori*amy R-T-19 – 192 год.

Проте порівняльна характеристика продуцентів глюкоамілази за показниками синтезу та тривалістю культивування (див. *табл. 2.1*) є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість компонентів поживних середовищ, використовуваних продуцентами з найвищою глюкоамілазною активністю в культуральній рідині (див. *табл. 2.2*).

Таблиця 2.2.

Вартість компонентів поживних середовищ

<i>Продуцент</i>	<i>Склад поживного середовища (г/л)</i>	<i>Ціна за 1 кг(л)</i>	<i>Вартість грн/г</i>	<i>Посилання</i>
<i>Aspergillus niger</i> ВКПМ F-501	Вартість за 1 л середовища: 2,17 грн			[17]
	житнє борошно – 542,6	4	2,17	
<i>Aspergillus awamori</i> Хул Т-15	Вартість за 1 л середовища: 2,01 грн			[17]
	Пшеничне борошно – 240	6,50	1,56	
<i>A. awamori</i> amu R-T-19	Вартість за 1 л середовища: 1,35 грн			[18]
	екструдат кукурудзяного борошна – 300	8,50	2,55	

Примітка: Ціни вказано станом на 2020рік.

Аналіз вартості компонентів поживного середовища показує, що для культивування *A. awamori*amu R-T-19 – 2,17 грн/л, *Aspergillus niger* штам ВКПМ F-501 – 2,17 грн/л, а для *A. awamori*amu R-T-19 використовують найдешевше середовище – 1,56 грн/л.

Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент з найкращими характеристиками процесу культивування потрібно розрахувати умовну вартість одиниці активності ферменту (див. *табл. 2.3*).

Умовна вартість одиниці активності ферменту

Продуцент	Активність ферменту (од/мл)	Вартість за 1 л середовища	Умовна вартість одиниці активності (грн.)
<i>Aspergillus niger</i> штам ВКПМ F-501	180	2,17	0,01
<i>Aspergillus awamori</i> ХуІТ-15	700	1,56	0,002
<i>A. awamori</i> amu R-T-19	800	2,55	0,003

Виходячи із наведених даних таблиць можна сказати, що штам *Aspergillus awamori* ХуІТ-15, за умов культивування на вказаному поживному середовищі найкраще задовільняє ціна/якість, адже спостерігається максимальний синтез продукту за мінімальну вартість поживного середовища.

Узагальнивши всі дані, можна зробити висновок, що показники глюкоамілазної активності у *Aspergillus awamori* ХуІТ-15 (700 од/мл) з тривалістю культивування 192 год є вищі у два рази, порівняно з *A. awamori*amu R-T-19 (800 од/мл) та *Aspergillus niger* штам ВКПМ F-501 (180 од/мл). Даний показник є економічно вигідним для підприємства.

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

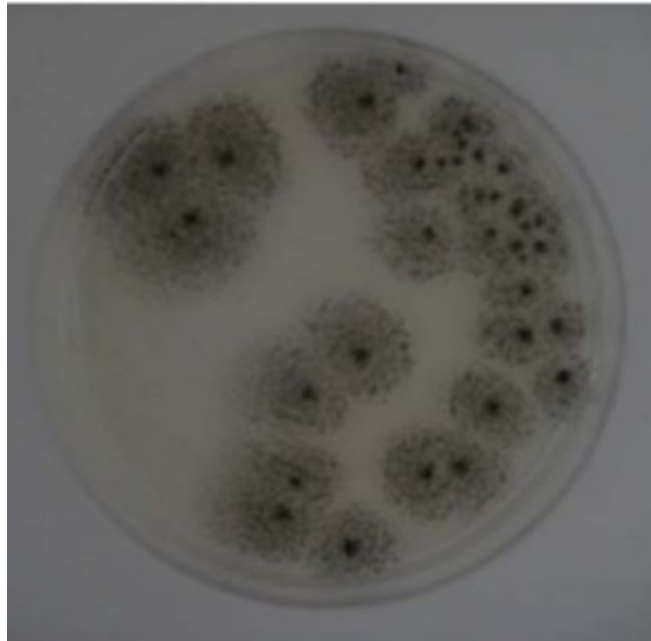
Морфолого-культуральні ознаки

Колонії на агарі Чапека з дріжджовим екстрактом (СҮА), 25°C, мають діаметр 30-35 мм за 7 діб, поверхня бархатиста, край тонкий (1-2 мм), конідіальна область темно-коричнева; ексудат відсутній, зворотна сторона тьмяно-жовта. Колонії на агарі Чапека з дріжджовим екстрактом (СҮА), 37°C (див *рис 2.1*), мають діаметр 26-30 мм за 7 діб, поверхня шорохувата, край тонкий (1мм), конідіальна область сірувато-коричнева; ексудат відсутній, зворотня сторона тьмяно-жовта [23, 24].

Колонії на агарі Чапека з дріжджовим екстрактом і 20 % сахарози (СҮ20S), 25°C, мають діаметр колонії 26-28 мм за 7 діб, гладкі, поверхня шорохувата, край

до 5 мм, конідіальна область темно-коричнева до чорної; ексудат відсутній, зворотна сторона тьмяно-жовта [23, 24].

Колонії на Мальц-агарі (МЕА), мають діаметр 35-40 мм за 7 діб, поверхня шорохувата, край нерівний, до 6 мм конідіальна область темно-сіра; ексудат відсутній, зворотна сторона тьмяно-жовта [23, 24].



*Рис. 2.1. Ріст *A. awamori* на агарі Чапека.*

Мікроскопічні характеристики: конідіальні головки кулясті, потім розпадаються на окремі колонки, конідієносці слабо пофарбовані в термінальній частині, гладкостінні $250-1200 \times 6-12$ мкм, апікальні розширення кулясті $20-45$ мкм в діаметрі, покриті стеригмами по всій поверхні. Стеригми переважно двоярусні, метула $6-16 \times 3,5-7$ мкм, фіалід $5-8 \times 2-4$ мкм. Конідії кулясті, $3,5-6$ мкм, гладкі [23, 24].

Фізіолого-біохімічні ознаки

Культура добре засвоює глюкозу, сахарозу, арабінозу, рафінозу, іслабо-мальтозу, лактозу, галактозу і рамнозу. Крохмаль гідролізується до глюкози. Добре асимілює амонійні солі неорганічних кислот. Споживає пептон, казеїн, амінокислоти. Пептонізує молоко. Температурний оптимум росту $34-35^{\circ}\text{C}$, рН $4,5-6,0$. Облігатний аероб [5, 24].

Даний вид міцеліальні гриба не числиться в якості патогенного в «Положенні про порядок обліку, зберігання, обігу, відпуску і пересилки культур бактерії, вірусів, рикетсій, грибів, найпростіших, мікоплазм, бактерійних токсинів, отрут біологічного походження» [5].

Штам може зберігатися в ліофілізованому стані протягом декількох років або на косяках з агаризованому середовищем Чапека або Мальц-агарі при +4 ° С з обов'язковим пересівом не рідше одного разу на 3 місяці. Для додаткової стабілізації активного посівного матеріалу рекомендується вносити в агаризоване середовище 1 % мальтодекстрину, що є індуктором гена Амуг і сприяючого збільшенню продуктивності штаму [5].

2.3. Таксономічний статус біологічного агенту

Розміщення *A. awamori* згідно філогенетичної систематики:

Відділ – *Ascomycota*

Клас – *Eurotiomycetes*

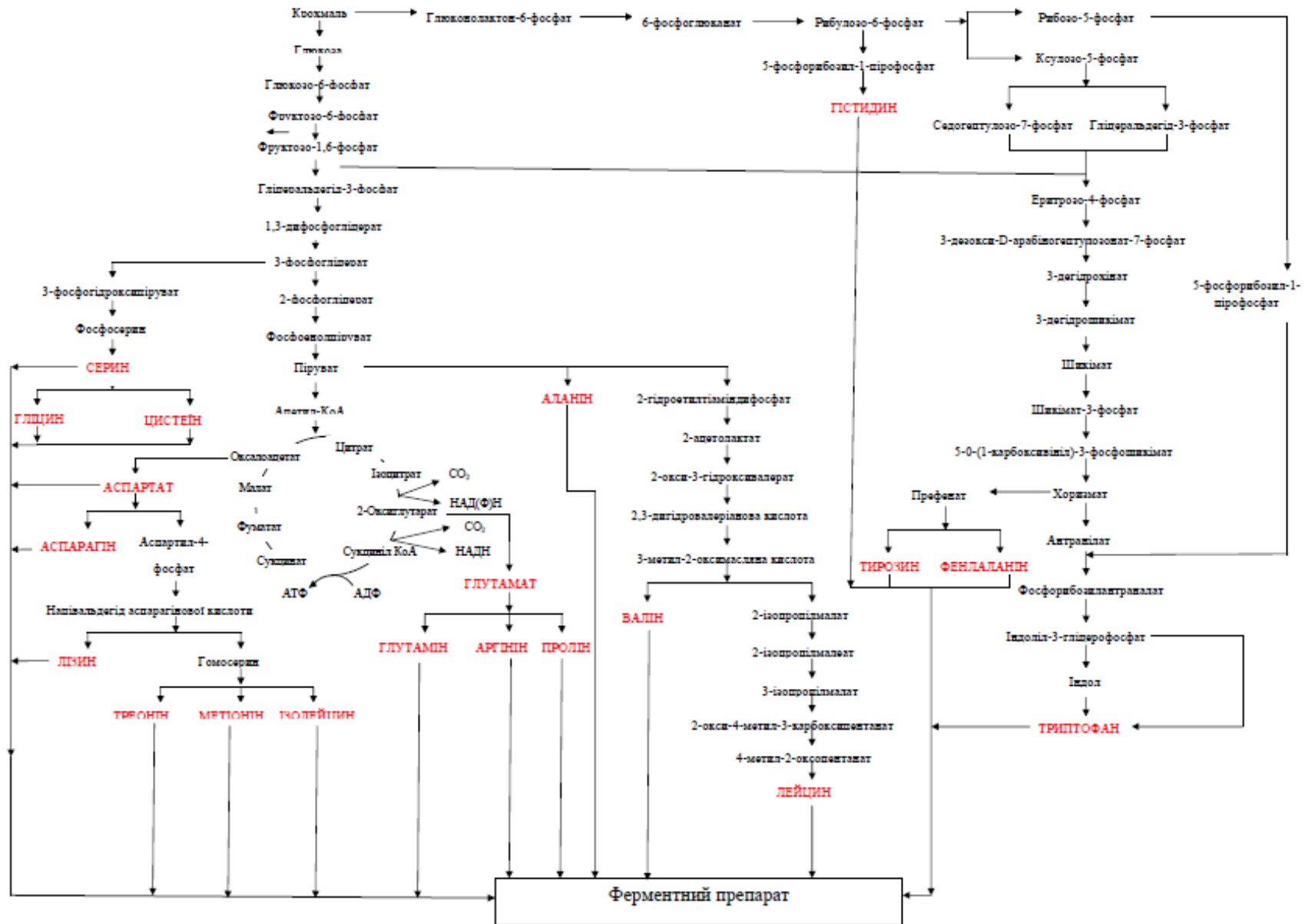
Порядок – *Eurotiales*

Сімейство – *Trichocomaceae*

Рід – *Aspergillus*

Вид – *awamori*[22].

2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт



РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

За останні роки інтерес до ферментних препаратів, які використовуються в якості кормових добавок до комбикормів для сільськогосподарських тварин, помітно зріс. У структурі комбикормів для свиней значну питому вагу займають пшениця, ячмінь, жито, овес, просо і інші корми з високим вмістом структурних вуглеводів. Негативна дія некрохмалистих полісахаридів на процеси травлення і інгібуючих речовин, що містяться в них, вдається значно послабити, а в деяких випадків і подолати. Завдяки використанню ферментних препаратів в дослідженнях вітчизняних і зарубіжних вчених щодо використання ферментних препаратів в годівлі тварин встановлено, що застосування ферментних препаратів дозволяє вводити до складу комбикормів до 10 – 25% жита і вівса, і до 60 – 70% ячменю і пшениці. При цьому продуктивність тварин збільшується. В даний час випускається ферментний препарат Глюкоамілаза ГЗх, використання якого в раціонах молодняка свиней підтвердило високу ефективність його застосування [14].

Свинарство – друга за масштабами галузь тваринництва. Вона дає одну третину всього валового виробництва м'яса. На нього припадає 15% умовного поголів'я продуктивної худоби. Вона дає м'ясо, сало, шкури та іншу сировину для переробної промисловості. Залежно від типу годівлі в свинарстві розрізняють беконний, м'ясний, м'ясо-сальний і сальний типи. Висока плодючість, короткий ембріальний період розвитку, скороспілість і вигідність, висока оплата кормів і високий вихід м'яса при забої зумовлюють значні економічні переваги свинарства над іншими видами тваринництва [1].

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Афанасьєв І.			РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Скроцька О.І.					1	2
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
						Кафедра БТМ		19

Згідно Державної служби статистики України на даний час в Україні проживають близько 63 015 тис голів свиней. В *табл. 3.1.* наведено дані по областям України, як бачимо найбільша кількість свиней міститься Дніпропетровській області [2].

Дніпропетровський регіон виділяється серед інших інтенсивним розвитком промислового сегменту. Лише 30% поголів'я вирощує населення, а 70% – середні та крупні господарства (саме така структура була до розпаду Радянського Союзу), серед яких досить міцні позиції займає ТОВ «Деміс-Агро», а також успішне і перспективне на рівні району приватне підприємство «Сігма»[3].

Так як в Дніпропетровській області найбільше розвинуте свинарство зі всієї України та стрімко розвиваються підприємства, то свою увагу зосередимо саме на цій області. Оскільки найбільші потреби в кормах та ферментних препаратах буде потребувати саме ця область.

Глюкоамілаза ГЗх являє собою однорідний порошок, який добре розчиняється у воді. Складається він з глюкоамілази, декстринази, мальтази, α -амілази, целюлози та інших ферментів [4]. В 4 г препарату міститься 30% глюкоамілази, перерахуємо це в грамах:

$$4\text{г} - 100\%$$

$$X - 30\% \qquad x = 1,2 \text{ г} - \text{глюкоамілази}$$

Таблиця 3.1.

Статистичні дані свиней по областям

Адміністративно-територіальна одиниця (область)	Свіні, тис.голів на 1 січня 2020 року
Дніпропетровська	4703
Київська	4669
Тернопільська	4395
Львівська	4214
Полтавська	4093
Черкаська	4002
Вінницька	3071
Одеська	3503
Хмельницька	3339

Івано-Франківська	3132
Волинська	3071
Запорізька	3041
Харківська	2833
Закарпатська	2749
Кіровоградська	2538
Чернігівська	1939
Житомирська	1757
Херсонська	1660
Чернівецька	1483
Сумська	1395
Миколаївська	1146
Рівненська	282
Всього	63 015

Примітка* 1 - Без урахування тимчасово окупованої території Автономної Республіки Крим, м. Севастополя та зон АТО.

Зазвичай в раціон свиней складається із кукурудзи, ячменю, пшениці, висівок та рибної муки, домішок (ПКК-51-1а), а також ферментного препарату Глюкоамілаза ГЗх [5].

Молодим свиням віком з 2 до 4 місяців додають в раціон 4 г Глюкоамілаза ГЗх на добу. Вже пораховано вище, що в 4 г даного препарату міститься 1,2 г глюकोамілази. Отже, потреба Дніпропетровської області в глюкоамілазі становить:

$$1,2 \text{ г препарату} \times 60 \text{ днів} = 72 \text{ г} \text{ – потреба для відгодування 1 свині}$$

$$72 \text{ г глюкоамілази} \times 4\,703\,000 \text{ голів свиней} = 338\,616 \text{ кг} \text{ – потреба глюкоамілази на Дніпропетровську область на 1 рік.}$$

3.2. Розрахунок потужності виробництва

В тваринництві, зокрема свинарстві використовують ферментні препарати: Глюкоамілаза ГЗх та Глюколюкс-Ф. Основний компонент даних препаратів є глюкоамілаза [6].

На сьогоднішній день в Україні найчастіше використовують глюкоамілазу, яка імпортується з Китаю.

Імпорт з Китаю задовольняє 46 % потреб Дніпропетровської області.

На жаль, ферментний препарат Глюколюкс-Ф [8], який виробляється на підприємстві «Сиббіофарм» в Росії, в Україну не імпортується.

Відповідно, необхідно розробити виробництво для забезпечення 54% потреби, що залишилися. Для цього необхідно виготовляти:

$$G_{\text{гп}} = 338\,616 \times 0,54 = 186\,000 \text{ кг глюкоамілази}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення сільськогосподарських тварин (свиней) в Дніпропетровській області в ферментованих кормах за рік необхідно виготовити= 186 000 кг глюкоамілази з стандартною активністю готового продукту $A_{\text{ст}} = 500$ од/г [4]. Дану кількість ферменту потрібно отримати за $T_{\text{рд}} = 300$ днів, оскільки 30 днів на рік відводиться на ремонтні роботи.

Відомо, що приблизна активність глюкоамілази, яка утворюється при культивуванні *A. awamori* M-2002 (ВКМ F-3771D) складає $A_{\text{кр}} = 400$ од/мл на середовищі наступного складу, г/л: Крохмаль – 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 3,8; KH_2PO_4 – 3,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; дріжджовий екстракт – 0,1 [7].

Кількість абсолютно сухого фермента на добу з урахуванням втрат при виділенні готового продукту за виробничий цикл :

$$G_{\text{гпд}} = G_{\text{гп}} (1 - W_{\text{в}}) / T_{\text{рд}} (1 - E_{\text{в}}) = 186\,000 \times (1 - 0,03) / 300 (1 - 0,25) = 481 \text{ кг/добу.}$$

Кількість абсолютно сухого фермента за цикл

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{гпд}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 481 \cdot 130 / 24 = 2\,605 \text{ кг/цикл}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (120 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год).

Кількість одиниць активності фермента за виробничий цикл з урахуванням втрат активності при виділенні готового продукту (25 %):

$$A_{\text{стц}} = G_{\text{цк}} \times A_{\text{ст}} \times 10^3 / (1 - E_{\text{аф}}) = 2\,605 \cdot 10^3 \times 500 / (1 - 0,25) = \\ = 1,74 \cdot 10^9 \text{ од.}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за цикл будескладати:

$$V_{\text{кр}} = K_1 \cdot A_{\text{стц}} / A_{\text{кр}} \times 10^6 = 1,1 \cdot 1,74 \cdot 10^9 / 400 \times 10^6 = 4,78 \approx 4,8 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливості нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

4,8 м³ культуральної рідини можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити :

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 4,8 / 0,55 = 8,7 \text{ м}^3$$

де $K_{\text{зап}} = 0,55$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Обираємо найближчий за геометричним об'ємом ферментер

$$V_{\Phi} = 10 \text{ м}^3.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}} / V_{\Phi} = 4,8 / 10 = 0,5, \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

Таблиця 3.2

Тривалість операцій циклу біосинтезу глюкоамілази

Процес	Час операції, год
Мийка та огляд апарату	2
Перевірка на герметичність	2
Стерилізація апарату	2
Охолодження апарату	1
Завантаження середовища	1,5
Засів культури	0,5
Ферментація	120
Звільнення ферментера від культуральної рідини	1
РАЗОМ	130

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 4,8 \text{ м}^3$.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\Phi}) = 4,8 / (1 - 0,1) = 5,3 \text{ м}^3$$

де E_{ϕ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 5,3 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,55$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить

$$V_{\phi} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 5,3 / 0,55 = 9,6 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 5,3 / 10 = 0,53$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданого значення.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\phi}) = 5,3 / (1 + 0,1) = 4,8 \text{ м}^3$$

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

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 5,3 - 4,8 = 0,5 \text{ м}^3.$$

Для одержання $0,5 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пс1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 0,5 / (1 - 0,1) = 0,55 \text{ м}^3.$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 0,55 / (1 + 0,1) = 0,5 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{па}} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{пс2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 0,55 - 0,5 = 0,05 \text{ м}^3 \text{ або } 50 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб2} = 0,55 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування грибів у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{па2} = V_{роб2} / K_{зап} = 0,55 / 0,55 = 1 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 1 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап. 1.} = V_{роб.2.} / V_{сф} = 0,55 / 1 = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданого значення.

Для одержання 50 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{па}) = 50 / (1 - 0,1) = 55,5 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 55,5 / (1 + 0,1) = 50,4 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить

$$V_{пс3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 55,5 - 50,4 = 5,1 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб3} = 55,5 \text{ л}$ можна одержати під час культивування грибів у посівному апараті геометричним об'ємом $V_{ін} = V_{роб3} / K_{зап} = 55,5 / 0,55 = 100 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0,1 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап. 1.} = V_{роб.3.} / V_{сф} = 55,5 / 100 = 0,55$$

Для одержання 5,1 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед

культивуванням в інокуляторі становитиме

$$V_{роб.4} = V_{пм2}/(1-E_{па}) = 5,1/(1-0,1) = 5,7 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{пс4} = V_{роб.4}/(1+X_{ін}) = 5,7/(1+0,1) = 5,2 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить

$$V_{пс4} = V_{роб4} - V_{пс4} = 5,7 - 5,2 = 0,5 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб4} = 5,7$ л можна одержати під час культивування грибів у посівному апараті геометричним об'ємом $V_{ін} = V_{роб4}/K_{зап} = 5,7/0,55 = 10$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0,01 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап. 1.} = V_{роб.3}/V_{сф} = 5,7/10 = 0,57$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пс4} = 0,5$ л можна одержати культивуванням грибів у колбах на качалках. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнт заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{колб} = V_{пм4}/(V_{колб} \times K_{зк}) = 500/(750 \times 0,2) = 4$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби +1 резервну.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу глюкоамілази у ферментурі об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,55 буде проходити у чотири етапи [9].

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Aspergillus awamori – аеробний мікроорганізм, для якого оптимальна температура росту 35 °С. Культура активно розвивається при рН 6,5 [1].

Культивування *A. awamori* здійснюють глибинним способом [2]. Підставою для вибору цього способу культивування слугують наступні параметри біосинтезу: легкість регулювання температури, рН середовища, ступіть аерації, а також досягти високого рівня стерильності процесу. Завдяки цьому методу культивування, культура-продуцент синтезує максимальну кількість цільового продукту.

За таких параметрів існує великий ризик контамінації сторонніми мезо- та нейтрофілами. Отже, для запобігання забруднення сторонніми мікроорганізмами необхідно забезпечити асептичні умови процесу культивування, чого неможливо досягти при поверхневому культивуванні.

Оскільки максимальний синтез фермента відбувається у кінці експоненційної фази росту, є недоцільним використання безперервного процесу культивування, що підтримує продуцент у фазі експоненційного росту.

Отже, для забезпечення максимального біосинтезу глюкоамілази використовують періодичний спосіб культивування штаму-продуцента. Щоб отримати посівний матеріал – культура-продуцент, спочатку вирощують на агаризованих середовищах, а потім для засівання інокулятора культивують в колбах на качалці. Так, як продуцент є аеробом – то необхідно забезпечити доступ кисню до поживного середовища в середині ферментера. Тому потрібно забезпечити апарат аераційною та перемішувальною системою.

					НУХТ БТЕК 05.01.11 ДП ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Афанасьєв І.			РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми					
Перевір.		Скроцька О.І.						Літ.	Арк.	Акрушів
Реценз.									1	2
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						27		

Отже, культивування *A. awamori*, продуцента глюкоамілази, здійснюють глибинним періодичним способом з дотриманням всіх умов асептики, за допомогою перемішувальної та аераційної системи.

Процес культивування *A. awamori* у виробництві здійснюється в біореакторах з нержавіючої сталі в стерильних умовах при безперервному перемішуванні і аерації середовища. Ферментер, в якому росте *A. awamori* забезпечений сорочкою для нагрівання і охолодження, з аеруючими пристроями, форсунки для подачі пари, інокуляції і зливних ліній, втулка для манометрів і термометрів, вибірки вузлів, антипінні баки і індивідуальний повітряний фільтр. Мікробіологічний і біохімічний контроль проводиться для спостереження розвитку культури з дотриманням всіх умов стерильності [3].

Ферментер обов'язково має бути оснащений барботером, оскільки саме за допомогою барботера в ферментер потрапляє достатня кількість повітря, яке так необхідне для нашого мікроорганізма.

Ферментер також має бути оснащений перемішувальною системою. Так як, *A. awamori* має септований міцелій, використовують лопатеве перемішування. Перевагою такого перемішування є невелика інтенсивність перемішування, щоб не відбулося пошкодження міцелію. Також однією з переваг є простота конструкції та невисока вартість виготовлення [4].

Також апарат обладнаний портами для внесення та перекачування рідин, оглядовим віконечком з освітленням, клапаном для відбору проб, рН-метром, датчиками подачі рідин (луг, кислота тощо), датчиками температури, тиску та рівня аерації.

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Оскільки штам-продуцент є аеробний мікроорганізм, то його культивування необхідно забезпечити чистим аераційним повітрям. Якщо є потреба отримати чисте аераційне повітря для ферментера – то необхідно пропустити його через низку фільтрів, починаючи від фільтрів грубої

очистки і закінчуючи фільтрами тонкої очистки та індивідуальним фільтром, що стоїть перед входом у апарат. Щоб уникнути контамінації під час біосинтезу – необхідно забезпечити стерильність повітря на 99%. Щоб досягти такої стерильності зазвичай використовують для індивідуальних фільтрів набивні або тефлонові гідрофобні фільтри [5].

Важливою умовою для вибору фільтра є його стійкість перед перепадом тисків та температур. Також дотриматися умов стерилізації (гострою парою). Тому, якості фільтрувального матеріалу для подачі чистого аераційного повітря розглянемо 2 фільтри ЄПМ.Ф4-020 (PTFE) та ЕПМ.Ф4.

Для стерилізуючої фільтрації газів рекомендують тефлонові гідрофобні стерилізуючі фільтри ЄПМ.Ф4-020 (PTFE). Основною фільтруючих елементів є мембрана з політетрафторетилену з розміром пор 0,2 мкм, отримана методом розтягування. Патронні фільтри ЕПМ.Ф4 повністю відповідають вимогам до фільтрів даного класу. Безперечною перевагою ЕПМ.Ф4 є високі показники швидкості потоку, здатність до багаторазовим стерилізаціям паром в лінії при $t = 134\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100% контроль на цілісність у процесі виробництва гарантує стерильність газових середовищ [6].

Мембранні фільтруючі елементи ЕПМ.Ф4 виробляються на основі гідрофобної фторопластової (PTFE) мембрани з розміром пор 0,2 мкм. Гідрофобний патронний фільтруючий елемент з абсолютним рейтингом фільтрації призначений для стерилізуючої фільтрації повітря, стиснутих газів, агресивних рідин та неводних розчинів медичної, біофармацевтичної, харчової та інших галузях промисловості. Фільтроелементи володіють високою пропускною здатністю і широкою хімічною сумісністю [6].

Параметри експлуатації

- 1) Максимальний перепад тиску МПа – 0,5 при 20°C, 0,2 при 80°C;
- 2) Максимальний зворотній перепад тиску: Мпа – 0,2 при 20°C, 0,05 при 80°C;
- 3) Максимальна температура експлуатації, °C – 90°C;
- 4) Автоклавування – 121-135°C, 0,11 МПа, 30 хв, 100 циклів;

5) Стерилізація парою – 121°C, 0,11 МПа, 30 хв, не менше 100 циклів; 140°C, 0,05 МПа, 30 хв, 50 циклів;

Суцільнометалеві фільтроелементи ЕПНС.П розроблені для застосування в тих областях промислових процесів фільтрації, де використання фільтроелементів на полімерній основі неможливе або обмежене із-за високої температури, в'язкості, агресивності середовища і інших жорстких умов експлуатації [7].

Фільтруючі елементи ЕПНС.П є елементами патронного типу на основі гофрованого матеріалу з нержавіючої сталі. Елемент являє собою суцільнометалеву конструкцію. Гофрована конфігурація фільтроелемента порівняно з циліндричними металевими фільтрами, забезпечує збільшену площу поверхні, що підвищує показники швидкості потоку і термін служби ЕПНС.П [7].

Для дипломного проекту обрано фільтр ЕПМ.Ф4 через його стійкість до перепаду тиску та можливості роботи з високими температурами (під час автоклавовання та стерилізації паром). Обов'язково фільтри оснащують манометрами за для фіксації різниці тисків. Тому що при забрудненні фільтра різниця тисків зростає і таким чином можна виявити непридатність фільтра. Або ж відсутність різниці тисків також свідчить про те, що фільтр вийшов з ладу, а точніше пошкодився чи порвався. Тому, щоб не допустити розмноження грибів на фільтрі або його абсолютного зносу – необхідно змінювати фільтр не менш як 3 – 4 рази на рік [2].

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів

Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено ферментер (10 м³), посівний апарат (1 м³), інокулятор (100 л), малий інокулятор (10 л), збірники, автоклав та інше обладнання становить 81 м² (9x9). Висота стін – 6 м (ГОСТ 20680-2002).

Загальна площа стін становить $((9 \times 6) + (9 \times 6)) \times 2 = 216 \text{ м}^2$. Площа підлоги – 81 м^2 . Дані щодо площі поверхонь, яка підлягає миттю та дезинфекції, наведені у *таблиці 3*.

Щоб розрахувати кількість дезрозчину, яким будуть митись обладнання інвентар та комунікації – треба визначити загальну площу обладнання, яке буде дезинфікуватись:

1) Загальний об'єм ферментерів:

$$10\ 000\text{л} + 1\ 000\ \text{л} + 100\ \text{л} + 10\text{л} = 11\ 110\ \text{літрів};$$

2) Загальний об'єм збірників та ферментерів:

$$11\ 110 + 3\ 090 = 14200\ \text{літрів};$$

3) Приблизно приймаємо загальний об'єм усіх комунікацій = 300 л;

Сумарний об'єм обладнання та комунікацій $V_{\text{оік}} =$

$$14200 + 300 = 14500\ \text{літрів}$$

Оскільки дезинфекцію обладнання необхідно проводити перед кожним виробничим циклом, тому кількість миття буде дорівнювати кількості циклів, а саме 38. Тому щоб розрахувати загальну площу миття за весь період виробництва $V_{\Sigma\text{оік}}$, необхідно:

$$V_{\Sigma\text{оік}} = V_{\text{оік}} \times N_{\text{ц}}$$

де $V_{\text{оік}}$ Сумарний об'єм обладнання та комунікацій

$N_{\text{ц}}$ – кількість виробничих циклів

$$14500 \times 38 = 551\ 000\ \text{літрів};$$

**Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції оброблюваного
об'єкту за весь період виробництва ферменту глюкоамілази**

Об'єкт миття та дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкта, м ²	Кількість процесів миття та дезінфекцій за весь період виробництва	Загальна площа миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ²
Обладнання, інвентар, комунікації	14,5	38	460 м ³
Підлога	81	300	24 300 м ²
Стіни, двері, вікна	216	10	2 160 м ²

Площа підлоги становить 81 м². Підлога повинна дезінфікуватись кожного робочого дня. Так як кількість трудоднів становить 300 днів – то миття підлоги буде здійснюватися 300 разів за весь період виробництва. Сумарна площа миття та дезінфекції підлоги за весь період становить: $81 \times 300 = 24\,300 \text{ м}^2$

Площа вікна, дверей та стін становить 216 м². Стіни, двері та вікна необхідно мити та дезінфікувати 1 рази на місяць, то кількість дезінфекцій складатиме 10 разів (кількість трудоднів – 300). Таким чином загальна площа миття за весь період виробництва складатиме $216 \times 10 = 2\,160 \text{ м}^2$.

Для проведення розрахунку витрат миючих та дезінфікуючих засобів, на одиницю поверхні, приймаємо, що обладнання і комунікації підлягають очищенню перед кожним виробничим циклом, тобто 38 разів, підлога миється кожен робочий день, тобто 300 разів, а стіни вікна та двері раз на місяць (10 разів).

На 1 м² робочої поверхні приблизно витрачається 100 мл робочого розчину дезінфектанта або миючого засобу (згідно з методичними

рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Якщо на одне миття підлоги, вікон та дверей площею 297 м² витратиметься 30 л миючого засобу (у розрахунку 100 мл на 1м²), то за весь період виробництва об'єм деззасобу складатиме: 30×38=1 140 літрів.

Проаналізовані дані щодо мийно-дезинфікуючих розчинів доцільно та економічно вигідно використовувати мийний засіб Сурфаніос лемон фреш через його широкий спектр антимікробної дії та здатність до біологічного розкладання – що свідчить про екологічність деззасобу [8].

Для миття обладнання та комунікацій доцільно також використовувати мийний засіб Біомой. Деззасіб Біомой – багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезинфікуючим ефектом. Біомой має широкий спектр дії та не несе небезпеки для персоналу [9].

Для дезинфекції та миття стін, вікон, підлоги та дверей найдоцільніше та економічно вигідніше використовувати мийний засіб Біоконтакт Плюс. Дезинфекційний засіб "Біоконтакт" містить в своєму складі глютаровий альдегід, гліоксалевий альдегід, четвертинні амонієві сполуки, полігексаметиленгуанідин гідрохлорид [10, 11].

Згідно даних наведених вище, можна зробити такі висновки:

1) для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати як мийний засіб Сурфаніос лемон фреш, так як він є більш дешевим у порівнянні із Біомий.

2) для миття та дезинфекції стін, підлоги, вікон та дверей можна використати: Біоконтакт Плюс. Мийні засоби варто міняти кожна 2–3 місяці, з метою уникнення розвитку резистентності у штамів мікроорганізмів до цих миючих засобів.

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Поживне середовище для одержання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу глюкоамілази культивуванням *Aspergillus awamori* складається лише з одного компонента – екструдату кукурудзяного борошна. Для того, щоб якісно провести стерилізацію даного компонента, необхідний час після додавання води до екструдату для набухання і гомогенізації одержаного поживного середовища. Орієнтовний час набухання екструдату складає 30 хв[21].

Оскільки екструдат кукурудзяного борошна в своєму складі не містить сполук, які при реагуванні між собою, не стануть не доступними для споживання *Aspergillus awamori* та можуть витримувати температуру 121°C, то для стерилізації поживного середовища на основі екструдату обираємо наступний режим: температура 121°C, тиск 0,1 МПа, тривалість 40 хв.

Розглянемо способи стерилізації поживного середовища на різних стадіях процесу:

Для качалочних колб поживне середовище готується та стерилізується безпосередньо в колбах.

Для 10 л інокулятора підготовка і стерилізація поживного середовища буде відбуватись безпосередньо в інокуляторі.

Для 100 л та 1000 л інокуляторів підготовка поживного середовища (замочування і набухання) буде відбуватись в 50 л і 500 л збірниках, а стерилізація - буде відбуватись безпосередньо в інокуляторах.

Оскільки об'єм поживного середовища для виробничого культивування буде становити приблизно 5 м³, то його підготовку і стерилізацію слід проводити в установці безперервної стерилізації, продуктивністю 5 м³/год (УБС-5).

РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металеву сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр першого ступеня очистки типу ФЯУ, Фільтруючий матеріал – мати з скловолокна, Е = 80 %, продуктивність – 1530 м ³ /год
К-3	Компресор	1	Гвинтові компресори з орбітальною спіраллю Atlas Copco GX 11 7,5, максимальний тиск 7,5 бар, продуктивність 1,62 м ³ /хв.
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії Swegon фірми «Parasol», (Німеччина) продуктивність 63 м ³ /год.
Р-5	Ресивер	1	Ресивер "VSOP-CLUB" фірми «Parasol» (Німеччина), робочий тиск 10 бар.
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	2	Теплообмінник нагрівач з спуском конденсату "Sulzer", продуктивність 60 м ³ /год.
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтруючий матеріал – складений гармошкою поліестер ВІА-С, ВІА-М, ВІА-Н, з обґрунтовкою на металевому або пластиковому фланці з 3-ма або 4-ма фіксаторами. Е=99 %, продуктивність – 2000 м ³ /год
Др-8	Об'ємно-рідинний дозатор	1	ДРК-ІМ – дозатор об'ємно-рідинний автоматичний. Напруга електромережі – 220 В, номінальна потужність 0,4 кВт.

НУХТ БТЕК 05.01.11 ДП ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.		Афанасьєв І.			
Перевір.		Скроцька О.І.			
Реценз.					
Н. Контр.					
Затверд.		Пирог Т.П.			
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання			Літ.	Арк.	Акрушів
				1	2
			Кафедра БТМ		
			35		

Продовження таблиці 5.1

ЗБ-9	Збірник для соляної кислоти	1	Реактор. Циліндричний апарат з сорочкою нагріву і днищем з нижнім спуском. Об'єм 100 л.
Н-10	Насос	7	Відцентровий, тип KRSH 32/160 Продуктивність 30 м ³ /год, потужність двигуна 2,5 кВт
Д-11	Об'ємно-ваговий дозатор	5	ДРК-ІМ – дозатор об'ємно-ваговий автоматичний. Напруга електромережі – 220 В, номінальна потужність 0,4 кВт. Габаритні розміри автоматичного вагового дозатора – 935 x 800 x 1950 мм
ЗБ-12	Збірник для миючого засобу	1	Реактор. Циліндричний апарат з сорочкою нагріву і днищем, з нижнім спуском. Об'єм 10м ³
ЗБ-13	Збірник для змішування компонентів поживного середовища	1	Реактор. Циліндричний апарат з мішалкою і днищем з нижнім спуском. Об'єм 25 л
М-14	Мірник для соляної кислоти	4	Циліндричний апарат з нижнім спуском. Об'єм 10 л
НП-15	Насос	4	Насос перистальтичний з одностороннім рухом рідини. Продуктивність 1 м ³ /год, потужність двигуна 2,5 кВт
ПБ-16	Посівний бачок	1	Циліндричний апарат з нижнім спуском.
ФР-17	Інокулятор 1	1	Інокулятор BioFlo/CelliGen100 фірми «Eppendorf» (Німеччина), потужність приводу 0,25-0,75 кВт, частота обертання 25-1500 хв ⁻¹ , геометричний об'єм 100л
Ф-18	Фільтр індивідуальної очистки	4	Фільтри типу ХР4 фірми «ZANDER», фільтр складається з корпусу і фільтруючого матеріалу (фторопласту), який дає змогу уловлювати частинки розміром 0,04–0,06 мкм.
ЗБ-19	Збірник для змішування компонентів поживного середовища	1	Реактор. Циліндричний апарат з мішалкою і днищем з нижнім спуском. Об'єм 250 л
ФР-20	Інокулятор 2	1	Інокулятор BioFlo/CelliGen100 фірми «Eppendorf» (Німеччина), потужність приводу 0,25-0,75 кВт, частота обертання 25-1500 хв ⁻¹ , геометричний об'єм 400л

Продовження таблиці 5.1

Закінчення таблиці 7.1

ЗБ-21	Збірник для змішування компонентів поживного середовища	1	Реактор. Циліндричний апарат з мішалкою і днищем з нижнім спуском. Об'єм 2500л
ФР-22	Інокулятор 3	1	Інокулятор BioFlo/CelliGen100 фірми «Eppendorf» (Німеччина), потужність приводу 0,25-0,75 кВт, частота обертання 25-1500 хв ⁻¹ , геометричний об'єм 3200л
ЗБ-23	Збірник для поживного середовища	1	Реактор. Циліндричний апарат з сорочкою нагріву і днищем, з нижнім спуском. Об'єм 3,2м ³
Т-24	Теплообмінник витримувач	1	Теплообмінник-витримувач серії AFR 11 фірми «Уралкомпресмаш», продуктивність 10 м ³ /год.
УБС-25	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації УБС-5. Продуктивність 5 м ³ /год, потужність двигуна 3 кВт.
Ф-26	Ферментер	1	Ферментер типу «Ока- МФ-100», даний ферментер забезпечений турбінною мішалкою з магнітним приводом, яка забезпечує гомогенне перемішування, потужність приводу 11-132 кВт, частота обертання 5-250 хв ⁻¹ , об'єм 32 м ³

РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми

Технологічний процес отримання глюкоамілази рекомбінантним штамом *Aspergillus awamori* ХуІТ-15 складається з допоміжних та основних робіт. До допоміжних робіт (ДР) відносять санітарну підготовку виробництва, підготовку аераційного повітря, підготовку допоміжних речовин для стабілізації поживного середовища. До основного технологічного процесу (ТП) належать стадії приготування та вирощування посівного матеріалу, виробниче культивування.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Для санітарної обробки застосовують миючі, дезінфікуючі та миючо-дезінфікуючі засоби, які в установленому порядку зареєстровані в Україні і дозволені для застосування при митті та дезінфекції приміщень, тари, інвентарю, технологічного обладнання та інших об'єктів у хіміко-фармацевтичній промисловості.

ДР 1.1. Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів

Розчини готують у спеціальній кімнаті, що прилягає до санвузла. Посуд, де зберігаються розчини, обов'язково повинен бути щільно прикритим кришкою або корком.

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину каустичної соди

Для циркуляційного промивання технологічного обладнання та комунікацій використовується 8925л ($\approx 9\text{м}^3$) 2% розчин каустичної соди за температури 50°C . Розчин готується у нержавіючому збірнику (ЗВ-12) (недопустимо використання збірників з алюмінію, оскільки каустична сода викликає його корозію). Для приготування 9м^3 робочого розчину беруть 180 кг сухого концентрату.

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину «Хлорантоїну»

Для миття та дезінфікації поверхонь приміщень використовують 0,2 % робочий розчин Хлорантоїну. На приготування 10 л такого розчину,

					НУХТ БТЕК 05.01.11 ДП ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрюшів</i>
<i>Розроб.</i>		Афанасьєв І.					1	2
<i>Перевір.</i>		Скороцька О.І.						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Пирог Т.П.						
						Кафедра БТМ		38

беруть 2 г сухого концентрату. Приготований розчин зберігають у герметично закритому скляному посуді в прохолодному місці.

ДР 1.1.3. Приготування робочого розчину «Гембара»

Дезінфекцію поверхонь, інвентарю посуду проводять 1% робочим розчином "Гембара" методами протирання. Для приготування 10 л робочого розчину, беруть 100 мл концентрату.

ДР 1.2. Підготовка виробничих та лабораторних приміщень

Підготовка виробничих приміщень включає комплекс заходів, що складається з вологого прибирання, дезінфекції поверхонь приміщень та обладнання. Миючі та дезінфікуючі робочі розчини готують у ємкості об'ємом 10л, заміна яких відбувається через кожні 30 м².

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

При щоденному прибиранні виконують миття підлоги та витирання пилу водопровідною водою з додаванням розчинів дезінфектантів. Миття проводять за допомогою приготовленого робочого розчину Хлорантоїну (від ДР 1.1.2) в наступній послідовності:

- 1) в процесі роботи в разі необхідності видаляють виробничі відходи;
- 2) вносять в приміщення необхідний прибиральний інвентар (швабри, відра), матеріали і теплу воду з мийним засобом в кількості, що необхідна для одного прибирання;
- 3) миють підлогу теплою водою з використанням Хлорантоїну (мити поверхні слід поступовими рухами, захоплюючи щоразу 1/3 частини раніше протертої площі). Для миття підлоги слід використовувати ганчірки з сурових тканин із закладеними краями, світлих тонів.

Після прибирання відпрацьований розчин Хлорантоїну передається на знешкодження відходів.

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання приміщень

Генеральне прибирання проводять 1 раз на місяць 1% мийно-дезінфікуючим робочим розчином «Гембара» (від ДР 1.1.3).

Крім миття та дезінфекції підлоги (наведено в ДР 1.2.1) проводять вологе прибирання стін, дверей, столів та інших поверхонь приміщення за допомогою поролонової губки, яка добре змочена розчином мийно-дезінфікуючого засобу «Гембар» із розрахунку 100-150 мл/м². Вікна миють теплою водою з мийним засобом, потім промивають водою і витирають досуха. На поверхні виробничих приміщень безпосередньо після дезобробки не повинно бути життєздатних мікроорганізмів.

Після генерального прибирання відпрацьований розчин «Гембар» передається на знешкодження відходів.

ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій

Обладнання, яке використовується для виробництва глюкоамілази, має гладку поверхню, виготовлене з нетоксичного, стійкого до корозії матеріалу, який стійко витримує зіткнення з використовуваною сировиною і витримує обробку дезрозчином.

Обладнання розміщено так, щоб в процесі виробництва запобігти забруднення продукту, а по закінченню виробничого процесу полегшити його миття, обробку, експлуатацію і обслуговування.

ДР.1.3.1 Миття та ополіскування обладнання.

Для миття обладнання використовують 2% робочий розчин каустичної соди (підігрітий гострою парою в апараті (ЗБ-12) до 50°C) який пропускається по каналам протягом 10 хв. Далі здійснюють перемішування за допомогою мішалки упродовж 15 хв. після закінчення миття, обладнання промивають водою. За зміною показника рН (має бути близьким до рН промивної води) проводять контроль повноти відмивання технологічного обладнання від мийного засобу. Розчин каустичної соди передають на повторне використання.

ДР 1.3.2. Перевірка на герметичність

Перевірку обладнання на герметичність проводять після проведення всіх ремонтних та перевірочних робіт. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють за допомогою стисненого повітря при тиску 0,2 МПа, а фланцеві

з'єднання та зварні шви – з використанням мильної води при повітряному тиску 0,2 МПа. Якщо упродовж 30 хв. знижується тиск (за манометром) та в певних місцях спостерігаються мильні бульбашки обладнання вважають не герметичним. Знайдені пропуски ліквідують і проводять повторну перевірку.

ДР 1.3.3. Стерилізація обладнань та комунікацій

Стерилізацію обладнання проводять кожного разу перед початком технологічного процесу і після перевірки на герметичність. Стерилізацію проводять при температурі 131°C, протягом 30 хв подачею глухої пари в сорочку та гострої пари безпосередньо в апарат через нижній патрубок та через барботер. Разом з ферментаційним обладнанням стерилізують фільтри і комунікацію. Після закінчення стерилізації обладнання гострою парою обов'язково відводять конденсат на знешкодження відходів та оформляють відповідний протокол, який підписується відповідальними особами за підготовку цього обладнання. Якість підготовки обладнання контролюється представником відділу контролю якості. Обладнання маркують, вказуючи його готовність до роботи.

ДР 2. Підготовка очищеного аераційного повітря

ДР. 2.1. Забір атмосферного повітря

Повітрозабірник (ПЗ-1), через який здійснюється забір атмосферного повітря розташовується у зоні чистого повітря (на висоті $\approx 7-10\text{м}$), віддаленої від зон технологічних викидів Повітря через повітрозабірну шахту потрапляє до фільтру грубого очищення (Ф-2).

ДР. 2.2 Грубе очищення повітря

Для попереднього очищення повітря від грубого пилу використовують ячeyкові фільтри (ФЯУ) (Ф-2). В якості фільтрувального матеріалу використовують один із типів скловолокна, а саме – склозрізи, які призначені для очищення повітря від грубодисперсних частинок розміром більше 6 мкм, ефективність очистки – 90,0%, швидкість фільтрування – 0,01м/с;

ДР 2.3. Компресування повітря

Стадія компресування повітря відбувається у турбокомпресорі (К-3) в якому повітря стискається до 0,5 мПа

ДР 2.4. Охолодження повітря

Охолодження повітря проводять в теплообміннику-охолоджувачі апараті (Т-4) до температури 30 °С подачею холодної води.

ДР 2.5. Видалення вологи

Для стабілізації термодинамічних показників повітря подають у ресивер (Р-5), де відбувається стабілізація вологості повітря ($W = 60 \%$) та знижуються турбулізаційні завихрення.

ДР 2.6. Нагрівання повітря

Після стабілізації термодинамічних показників повітря нагрівають у теплообміннику-нагрівачі (Т-6) повітря нагрівається до температури, вищої від температури культивування на 5 – 10 °С, тобто до 40 °С для виключення утворення конденсату на фільтрувальних поверхнях.

ДР 2.7. Очищення повітря в головному фільтрі

Щодо фільтрів тонкого очищення (Ф-7), пропонують використовувати модель FM, з імпульсною регенерацією стисненим повітрям. Даний фільтр використовують для уловлювання і збирання промислових забруднень, але в основному для уловлювання сухого пилу різного роду. Ефективність очищення до 98% для часток розміром до 0,5 мікрон. Очищене повітря можна повертати назад у приміщення – взимку зменшуються витрати на підігрів холодного повітря.

ДР 2.8. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Для індивідуального очищення повітря будемо використовувати фільтри типу ХР4 (Ф-13), які встановлені над кожним ферментером для подачі стерильного аераційного повітря. Здатність уловлювати частинки розміром 0,04 – 0,06 мкм, ступінь очистки 99,9 %.

ДР 3. Підготовка допоміжних речовин для стабілізації поживного середовища

ДР 3.1. Приготування розчину соляної кислоти

Готуємо 6 % розчин соляної кислоти для підтримання оптимального значення $pH = 5,5$ при виробничому біосинтезі глюкоамілази шляхом

підтитрування. Розведення концентрованої соляної кислоти робимо для того, щоб не було зон перепідкислення.

Розчин соляної кислоти готують у збірнику (ЗБ-9), з'єднаний трубопроводами з ферментером та інокуляторами .

За допомогою розведення, попередньо простерилізованою водою з 35% концентрованої соляної кислоти готують 6% розчин соляної кислоти. 6% розчину соляної кислоти має густину 1,028. Відповідно 6 % її розчин буде важити $1,028 \times 1000 = 1028$. В цій кількості міститися 61,68 г чистого хлористого водню.

35 % соляна кислота має густину 1,174. Тому для приготування 1 л розчину 6 % соляної відміряємо 850 мл води, обережно невеликими порціями доливаємо 150 мл 35 % соляної кислоти.

Отже, для приготування 100л 6% соляної кислоти потрібно 85 л води та 15 л 35 % соляної кислоти.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

Для приготування поживного середовища усі компоненти готуються у певній кількості для кожного апарату та перед вирощуванням посівного матеріалу стерилізуються при температурі 120°C протягом 40 хв.

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.

Для отримання 1,584 л поживного середовища (з урахуванням 10 % посівного матеріалу) на технічних вагах у технічному стакані місткістю 1 л зважують 240 г екструдату пшеничного борошна та за допомогою мірного циліндра відміряємо 1,211 л водопровідної води.

Поживне середовище підтитрують 6% соляної кислоти, що надходить від ДР 3.1. Готове поживне середовище розливають у вісім качалочних колб місткістю 750 мл, по 200 мл середовища у кожній, та стерилізують в автоклаві при температурі 120° С протягом 40 хв .

ДР 4.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора $V_3 = 10$ л.

Для одержання посівного матеріалу в інокуляторі (ФР-17) об'ємом 10 л необхідно приготувати 50 л поживного середовища (з урахуванням 10 % конденсату, що утворюється під час стерилізації та 10 % посівного матеріалу). Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-11) в збірник (ЗБ-13) подаємо 1,2 кг екструдату пшеничного борошна, а через трубопровід 4,8 л водопровідної води. Змішування компонентів поживного середовища проводять в збірнику (ЗБ-13) протягом 30 хв., далі за допомогою насоса (Н-10). Витримують до повного розбухання екструдату протягом ще 30 хв. Нестерильне поживне середовище відправляємо на стерилізацію до інокулятора (ФР-17).

Стерилізацію поживного середовища в інокуляторі (ФР-17) проводимо за температури 120°C протягом 40 хв. шляхом подачі пари в барботер та в парову сорочку.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища в інокуляторі
 $V_3 = 100 \text{ л}$

Для одержання посівного матеріалу в інокуляторі (ФР-20) об'ємом 400 л необхідно приготувати 50 л поживного середовища (з урахуванням 10 % конденсату, що утворюється під час стерилізації та 10 % посівного матеріалу). Через об'ємно-ваговий дозатор в збірник подаємо 12 кг екструдату пшеничного борошна, а через трубопровід 48 л водопровідної води. Змішування компонентів поживного середовища проводять в збірнику (ЗБ-19) протягом 30 хв. Витримують до повного розбухання екструдату протягом ще 30 хв. Далі за допомогою насоса (Н-10) нестерильне поживне середовище подаємо в інокулятор (ФР-20), де проводять стерилізацію при температурі 120°C, протягом 40 хв., шляхом подачі пари в барботер та в парову сорочку.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища в посівному апараті $V_3 = 1 \text{ м}^3$

Для приготування поживного середовища об'ємом 1584 л через об'ємно-ваговий дозатор (Д-12) подають 120 кг екструдату пшеничного борошна в збірник (ЗБ-21), а 974,4 л водопровідної води через трубопровід.

Змішування компонентів поживного середовища проводять в збірнику (ЗБ-21) протягом 30 хв. Витримують до повного розбухання екструдату протягом

ще 30 хв. Потім за допомогою насоса (Н-10) нестерильне поживне середовище подаємо в інокулятор (ФР-22), де проводять стерилізацію при температурі 120°C, протягом 40 хв., шляхом подачі пари в барботер та в парову сорочку.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера $V_3 = 10 \text{ м}^3$

Для приготування поживного середовища через об'ємно-ваговий дозатор (Д-12) подають 1200 кг екструдату пшеничного борошна в збірник (ЗБ-23), а 4800 л водопровідної води через трубопровід, перемішування компонентів здійснюють протягом 30 хв.

Стерилізацію проводять при температурі 131°C, протягом 40 хв. в УБС-5 (УБС-25), після чого готове поживне середовище перекачують в ферментер $V_3 = 10 \text{ м}^3$ (ФР-26).

ТП 5. Приготування та вирощування посівного матеріалу

На кожній стадії приготування та вирощування посівного матеріалу проводять мікробіологічний контроль наявності сторонньої мікробіоти.

ТП 5.1 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

В асептичних умовах в кожну попередньо простерилізовану та охолоджену колбу з поживним середовищем від ДР 4.1. вносимо біологічний агент – *A. awamori* амуR-Т-19, змиванням його з пробірки фізіологічним розчином. За допомогою 6% соляної кислоти, що надходить від ДР 4.1 контролюємо рН середовища (рН=5,5). Під час вирощування протягом 72 годин на качалці з інтенсивністю перемішування 240 об/хв.

ТП 5.2. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі $V_3 = 10 \text{ л}$

Вирощування посівного матеріалу здійснюється в попередньо простерилізованому та охолодженому інокуляторі (ФР-17) оснащеному посівним бачком (ПБ-16), мірником для соляної кислоти (М-14), мішалкою для інтенсивного перемішування (240 об/хв.) та барботером для подачі стерильного повітря $60 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{год}$. Подача посівного матеріалу від ТП 3.2, поживного середовища від ДР 4.2 та 6% розчину соляної кислоти від ДР 4 для підтримки

pH = 5,5, здійснюється з дотриманням усіх правил асептики через стерильні комунікації. Вирощування проводять протягом 72 год.

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі $V_3 = 100\text{л}$

Вирощування посівного матеріалу здійснюється в попередньо простерилізованому та охолодженому інокуляторі (ФР-20) оснащеному мірником для соляної кислоти (М-14), мішалкою для інтенсивного перемішування (240 об/хв.) та барботером для подачі стерильного повітря $60\text{м}^3/\text{м}^3\cdot\text{год}$. Подача посівного матеріалу від ТП 5.3, поживного середовища від ДР 4.3 та 6% розчину соляної кислоти від ДР 3 для підтримки pH = 5,5, здійснюється з дотриманням усіх правил асептики через стерильні комунікації. Вирощування проводять протягом 72 год.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі $V_3 = 1000\text{л}$

Вирощування посівного матеріалу здійснюється в попередньо простерилізованому та охолодженому інокуляторі (ФР-22) оснащеному мірником для соляної кислоти (М-14), мішалкою для інтенсивного перемішування (240 об/хв.) та барботером для подачі стерильного повітря $60\text{м}^3/\text{м}^3\cdot\text{год}$. Подача посівного матеріалу в ТП 3.4, поживного середовища від ДР 2.4 та 6% розчину соляної кислоти від ДР 1 для підтримки pH = 5,5, здійснюється з дотриманням усіх правил асептики через стерильні комунікації. Вирощування проводять протягом 72 год.

ТП 6. Виробниче культивування

Застосовують періодичне глибинне культивування і дотримуються таких параметрів: температура 35°C , контролюється подачею пари в сорочку ферментера; подача повітря ($60\text{ м}^3/\text{м}^3\cdot\text{год}$) здійснюється через барботер, pH середовища – 5,5, що підтримується за допомогою підтитрування 6% розчину соляної кислоти. Культивування мікроорганізму проводять протягом 168 годин у ферментері об'ємом 10 м^3 і середовищем наступного складу: кукурудзяний екструдат – 1410 кг, вода водопровідна – 3390 л підготоване та на стадії ДР 2.5. Для засівання використовують посівний матеріал приготовлений та вирощений

на стадії *ТІІ 3.6*. Відпрацьоване технічне повітря та конденсат з ферментеру передаємо на знешкодження відходів.

РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

7.1. Карта постадійного контролю

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю і показник, що визначається</i>	<i>Метод контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та порядок відбору проб</i>	<i>Нормативна характеристика показника, що визначається</i>
Кх, Кт 1.1.1 Приготування робочого розчину Каустичної соди	Концентрація розчину каустичної соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 2 %
Кх 1.1.2 Приготування робочого розчину Хлорантоїну	Концентрація розчину Хлорантоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,2 %
Кх 1.1.3 Приготування робочого розчину Гембара	Концентрація розчину Гембара	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 1 %
Кх 1.2.1, Кх 1.2.2 Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
бКт 1.3.1 Миття та обполіскування обладнання	З'ємні частини обладнання, мийний розчин, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник.	Під час проведення операції обробки	t = 50 °C, τ = 25хв
Кт 1.3.2 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	P = 0,2 МПа τ = 30 хв
Кт 1.3.3 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	Термометр технічний, годинник	Температура визначається безперервно під час стерилізації	t = 131 °C, τ = 40 хв

НУХТ БТЕК 05.01.11 ДП ПЗ				
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розроб.</i>		Афанасьєв І.		
<i>Перевір.</i>		Скροцька О.І.		
<i>Реценз.</i>				
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>
			1	2
			Кафедра БТМ	
			48	

Кт 2.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 90 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, тиск	Манометр технічний,	Після компресування повітря	P=0,5 МПа
Кт 2.4 Охолодження повітря	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 30 °C
Кт 2.5 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W = 60 %
Кт .2.6 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 40 °C
Кт 2.7 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в головному фільтрі	E = 98 %
Кт 2.8 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	E = 99 %
Км.3.1 Підготовка та стерилізація розчину соляної кислоти	Концентрація розчину соляної кислоти	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6 %

Кт, Км, Кх 4.1 Приготування та стерилізація ПС для вирощування інокуляту в колбах на качалці	Компоненти поживного середовища, температура, час, рН, стерильність	Термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 120 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, рН =5,5
Кт, Км, Кх 4.1 Приготування та стерилізація ПС для вирощування інокуляту в колбах на качалці	Компоненти поживного середовища, температура, час, рН, стерильність	Термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 120 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, рН =5,5
Кт, Км, Кх 4.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора V ₃ =10л	Компоненти поживного середовища, температура, час, рН, стерильність	Термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 120 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, рН =5,5
Кт, Км, Кх 4.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора V ₃ =100л	Компоненти поживного середовища, температура, час, рН, стерильність	Термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 120 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, рН =5,5
Кт, Км, Кх 4.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора V ₃ =1000л	Компоненти поживного середовища, температура, час, рН, стерильність	Термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 120 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, рН =5,5
Кт, Км, Кх 4.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора V ₃ =10000л	Компоненти поживного середовища, температура, час, рН, стерильність	Термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 120 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, рН =5,5
Кт, Км 5.2 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі в V ₃ =10л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в малому ферментері і в кінці процесу	t = 35 °С, τ = 72 год. Відсутність сторонньої мікрофлори

Кт, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі в $V_3=100\text{л}$	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в малому ферментері і в кінці процесу	$t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 72\text{ год.}$ Відсутність сторонньої мікрофлори
Кт, Км 5.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі в $V_3=1000\text{л}$	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в малому ферментері і в кінці процесу	$t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 72\text{ год.}$ Відсутність сторонньої мікрофлори
Кт, Км, Кх 6 Виробничий біосинтез	Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, непрямий метод визначення біомаси за оптичною густиною	Під час вирощування культури у ферментері Відбір проби культуральної рідини відбувається кожні 4-6 год	$t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 72\text{ год.}$ Відсутність сторонньої мікрофлори

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація біомаси

Концентрацію визначають ваговим методом шляхом висушування до постійної маси[25].

Мицелій грибів відокремлюють фільтруванням. Паперовий фільтр розміщують у фарфорову воронку Бюхнера, під'єднують воронку до конічної колби Бунзена(колбу в свою чергу під'єднують до насоса) й фільтрують через неї точно вимірний обсяг культуральної рідини (5 - 10 мл). Осад на фільтрі промивають підкисленою дистильованою водою. Осад кілька разів промивають підкисленою дистильованою водою.

Щоб визначити масу сухих клітин, фільтр із осадом клітин мікроорганізмів розміщують у сушильну шафу, висушують при температурі 105°C і зважують. Режим висушування й зважування той же, що використовується й при визначенні маси фільтрів. Суху біомасу визначають за формулою:

$$M = (A - B) \cdot \frac{1000}{V}$$

де М - суха біомаса в г/л; А - маса фільтра з осадом у г; В - маса фільтра без осаду в г; V - обсяг культуральної рідини, узятий для фільтрування у мл.

7.3.2. Концентрація цільового продукту

Метод заснований на визначенні глюкози, що утворюється при гідролізі розчинного крохмалю ферментом глюкоамілази[26, 27].

Глюкоамілазна активність (ГлС) характеризує здатність ферментного препарату каталізувати розщеплення розчинного крохмалю до глюкози і виражається числом одиниць активності в грамі препарату.

За одиницю глюкоамілазної активності прийнята здатність ферменту каталізувати гідроліз розчинного крохмалю при умовах температури і рН, вивільняючи за 1 хвилину 1 мкмоль глюкози.

Проведення аналізу: Відміряють два паралельні об'єми аналізуючої вихідної культуральної рідини та готового ферментного препарату. Далі із кожної проби роблять не менше двох розведень у першому випадку і не менше чотирьох у другому. Кожні розведення дослідного розчину аналізують не менше двох раз.

В пробірку наливають 10 мл розчину крохмалю (субстрату) і ставлять в термостат або водяну баню з температурою (30,0±0,2)°С на 5 – 10 хв. Потім доливають до вмісту пробірки 5 мл розчину супернатанту і інкубують суміш протягом 10 хв при цій самій температурі.

Потім 1 мл суміші переносять в іншу пробірку, поміщену в киплячу водяну баню, витримують протягом 2 хв (для інактивації фермента) і охолоджують холодною водою. Далі до суміші додають 3 мл розчину С, перемішують і залишають на 45 хв при кімнатній температурі.

Одночасно готують контрольну пробу. Для цього 5 мл розчину аналізуючого продукту витримують в киплячій водяній бані протягом 10 хв (для інактивації ферменту). Далі розчин охолоджують і додають 10 мл розчину крохмалю. Всі дослідні операції з контрольними пробами проводять так як із дослідними. Крім вказаної контрольної проби на інактивованій фермент

ставлять контрольну пробу на робочий розчин С. Для цього до 3 мл цього розчину доливають 1 мл дистильованої води.

Інтенсивність забарвлення визначають на фотоелектроколориметрі в діапазоні довжини хвилі 390 – 414 нм в кюветах з товщиною поглинаючого світлового шару 10 мм [21].

Якщо контрольні проби на інактивованій фермент маю значне забарвлення, тоді необхідно дослідний розчин проколориметрувати, взявши в якості розчину порівнюючий розчин. Значення оптичної густини повинно бути в межах, що відповідають масі глюкози від 50 до 150 мкг.

Обробка результатів:

Глюкоамілазна активність (ГЛС) в од/г обчислюють за формулою:

$$\text{ГЛС} = \frac{m}{m_1 \times 180 \times 10},$$

де m – маса глюкози, утворена в 1 мл гідролізату за рахунок дії ферменту, знайдена за калібрувальним графіком, мкг;

m – маса ферменту, що міститься в 1 мл гідролізату, взятого для досліду, г;

10 – час гідролізу, хв;

180 – молекулярна маса глюкози, г/мкмоль.

* Глюкоамілазна активність в од/см³ обчислюється за даною формулою, тільки замість маси ферменту береться об'єм (V) [26, 27].

7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації вуглецю

Концентрацію джерел вуглецю здійснюється шляхом вимірювання кількості редукуючи цукрів. Метод заснований на здатності редукуючихцукрів відновлювати в лужному розчині червону кров'яну сіль $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в жовту $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ при нагріванні [28].

Методика визначення

У мірну колбу на 250 мл за допомогою бюретки наливають 25 мл попередньо відцентрифугованої культуральної рідини. Залишки змити дистильованою водою об'ємом не більше 150 мл. Колбу поставити на водяну баню при 60°C на 15 хвилин і періодично перемішуючи. Потім колбу охолодити і

для осадження білків додати 3-4 мл розчину сульфату цинку і 1,5-2 мл розчину гідроксиду натрію. Суміш струснути, довести об'єм розчину водою до мітки, перемішати, дати осаду відстояти 10-15 хвилин і відфільтрувати через складчастий фільтр в суху колбу. Розчин готовий для аналізу.

У бюретку налити розчин глюкози. У конічну колбу на 100 мл за допомогою мірного циліндра налити 10 мл розчину $K_3[Fe(CN)_6]$, 2,5 мл лугу і одну краплю метиленової сині. Суміш поставити на електроплитку і нагріти до кипіння. Підтримуючи слабе кипіння, суміш відтитрувати досліджуваним розчином, додаючи його приблизно по 1 краплі в секунду, до переходу зеленого забарвлення (через фіолетове) у світло-жовту.

При охолодженні розчин набуває фіолетового забарвлення через окиснення безбарвної форми метиленового синього киснем повітря.

Масова частка редуруючи цукрі розраховується за формулою:

$$w = \frac{0,012 \times V_1}{V_2 \times m} \times 100\%$$

де 0,012 – маса глюкози, необхідної для відновлення 10 мл 1 %-ного розчину $K_3[Fe(CN)_6]$, г.

V_1 – загальний об'єм випробуваного розчину, рівний 250 мл;

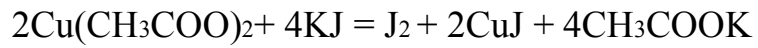
V_2 – об'є випробуваного розчину, який пішов на титрування 10 мл розчину $K_3[Fe(CN)_6]$;

m – маса культуральної рідини (25 г) [28].

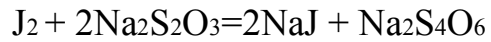
Визначення концентрації джерел азоту

Основним методом визначення азоту в органічних з'єднаннях є мідний метод. В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $Cu_3(PO_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді [29].

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину додають йодид калію:



В результаті реакції виділяється йод кількості, еквівалентній кількості міді, відповідно, і азоту амінокислот, який відтитрують розчином тіосульфату натрію:



1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту [29].

ЛІТЕРАТУРА

1. Синицын А. П., Марков А. В., Семенова М. В. Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК. — М., 2004. — 95 с.

2. *Enzymes in Industry. Production and Applications* / ed. by W. Aehle. — 3-d edition. — Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007. — 517 p.

3. Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Industrial Enzymes, Specialty Enzymes), By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases), By Source, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027 [electronic resource] – Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry/segmentation>

4. *Ферменты в пищевой промышленности* / Р. Дж. Уайтхерст, М. ван Оорт (ред.) – Пер. с англ. д.х.н. С.В. Макарова. – СПб: Профессия, 2013. – 408 с.

5. Пат. № 2457247. Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *A. awamori* – продуцент глюкоамилазы / Л.В. Римарева, Н.В. Цурикова. – Оpubл. 27.07.2012, Бюл. № 21.

6. *Галич И.П.* Амилазы микроорганизмов. – Киев: Наук. Думка, 1987. – 192 с.

7. *Борзова Н.В., Гудзенко О.В., Варбанець Л.Д.* Глюкоамілаза мікроорганізмів. Біосинтез, властивості, механізм дії та практичне застосування // Біотехнологія. – 2009. – Т. 2, – № 1. – С. 9–23.

8. *Marin-Navarro J., Polaina J.* Glucoamylases: Structural and Biotechnological Aspects // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2011. – Vol. 89. – No 5. – P. 1267-1273.

9. *Kumar P., Satyanarayana T.* Microbial glucoamylases: characteristics and applications // *Critical Reviews in Biotechnology.* – 2009. – Vol. 29. – No 3. – P. 225-255.

10. *Грачова И.М.* Технология ферментных препаратов. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 335 с.

11. Пат. № 737456 Штамм *Rhizopus tritici* T₁ – продуцент глюкоамилазы / А. Я. Панкратов, Г. П. Шуваева, В. С. Григоров, В. В. Щеголев. – Оpubл. 30.05.1980.

12. Пат. № 665690, Синтетическая среда для выращивания дрожжей *Endomycopsis fibuliger* 21 – продуцент глюкоамилазы / Л. Д. Волкова, Н. С. Егоров, В. Л. Яровенко. – Оpubл. 07.10.1983.

13. Пат. № 512237. Штамм дрожжей *Endomycopsis fibuliger* R-574 – продуцент глюкоамилазы / М. Е. Бекер, М. А. Дреймане, А. Ф. Апсите. – Оpubл. 29.06.1976.

14. Слепакурова Ю.И. Глюкоамилаза *A. awamori* 466: Автореф. дис. техн. наук. – Москва, 2006. – 33 с.

15. Пат. № 2366712. Способ получения лимонной кислоты, альфа-амилазы и глюкоамилазы / Н.Ю. Шарова, Т.А. Позднякова, Т. А. Выборнова, Д. Х. Кулев. – Оpubл. 20.01.2009.

16. Пат. № 2457246 Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Aspergillus awamori* – продуцента комплекса ферментов глюкоамилазы и ксиланазы / Л. В. Римарева, Н. В. Цурикина, Е. В. Костылева, А. С. Середа. – Оpubл. 27.07.2012.

17. Борошно фасоване [Электронный ресурс]/ Офіційний сайт ТОВ «Зерноsvіт». – 2020. – Режим доступа: <http://zernosvit.com.ua/tsiny/>. – заголовок з екрану.

18. Традиційний справжній смак // Офіційний сайт ПрАТ «Вінницька харчосмакова фабрика». – 2020. – Режим доступа: http://www.vhsvin.com.ua/ua/o_kompanii/. – заголовок з екрану.

19. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. – Москва.: Колос, 2004. – 296 с.

20. Грачева И. М., Кривова Н.П. Технология ферментных препаратов: Учебник – 3-е изд., переп. и доп. – М.: Агропромиздат, 2000. – 512 с.

21. Подобей, Л.И. Общая характеристика жмыха кукурузного зародыша, кормовой кукурузный концентрат: Автореф. дис. ... канд. сельскохоз. наук. – Москва, 2014. – 16 с.

22. Kirk P.M., Cannon P.F., Winter D.W. Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi. – 10 Edition. – UK, CAB International, 2010. – 771 p.

23. Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы. Определитель. Научное издание. – К.: Наукова думка, 1988. – 204 с.

24. *ArshadAnwerMd.Aspergillus* as a noble biological control agent. – Scholars' Press, 2014. – 392 с.
25. *Грачёва И.М., Грачёв Ю.П. Мосичев М.С.* Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов: Учебное пособие для вузов. – М.: Лёгкая и пищевая пром-сть, 1982. – 124 с.
26. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии: Справочник. – К.: Наукова думка, 1982. – 550 с.
27. ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения амилолитической активности. – Введ. – 01.07.89.
28. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа: – 2-е вид., доп. і перероб. - Л.: Химия, 1986. – 432 с.
29. Волынец В.Ф., Волынец М.П. Аналитическая химия азота. – М.: Наука, 1977. – 307 с.