

**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)

« » лютого 2022 р.

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

« » лютого 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

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

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Біотехнологічні аспекти одержання ферментів фітаз медичного призначення

Виконав: здобувач II курсу, групи 02

РОЗДОБУДЬКО Василь Вікторович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович

(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

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 03 ” листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

РОЗДОБУДЬКА Василя Вікторовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологічні аспекти одержання ферментів фітаз медичного призначення

керівник роботи РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович к.т.н., доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “02” листопада 2021 року № 863-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи продуценти фітази мікробного походження

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

Літературний огляд

Обґрунтування біологічного агента

Техніко-економічне обґрунтування

Параметри культивування біологічного агента

Способи виділення цільового продукту

Точки контролю

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема (1 лист формату А1, 1 лист формату А3)

Технологічна схема(2 листа формату А2)

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Літературний огляд	10.11.2021	
	Опис цільового продукту	20.11.2021	
	Обґрунтування виробу біологічного агенту	25.11.2021	
	Техніко-економічне обґрунтування	30.11.2021	
	Біосинтез цільового продукту	10.12.2021	
	Виробничий біосинтез	15.12.2021	
	Апаратурна схема	20.12.2021	
	Технологічна схема	25.12.2021	
	Специфікація	10.01.2022	
	Матеріальний баланс	15.01.2022	
	Опис технологічної схеми	20.01.2022	
	Контроль виробництва	23.01.2022	
	Список літератури. Вступ. Зміст. Реферат	25.01.2022	
	Оформлення роботи	01.02.2022	

Здобувач

_____ (підпис)

Василь РОЗДОБУДЬКО

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Юрій РЕЗНІЧЕНКО

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної схеми біосинтезу ферменту фітази з використанням штаму *Neurospora sitophila*. В даній роботі викладено огляд продуцентів даного ферменту, складу поживних середовищ для їх культивування та проведено їх порівняння. Обрано штам, який є найкращим продуцентом фітази – *Neurospora sitophila*, який у порівнянні з іншими буде прийнятним для використання у фармацевтичній сфері. Загальний активність ферменту складає 8,3ОД/мл. Технологічна схема біосинтезу фітази включає допоміжні роботи (стерилізація поживних середовищ), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу). Процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу ферменту у ферментері об'ємом 6,3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5 проходить у п'ять етапів. Технологія отримання фітази передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним методом періодичним способом.

Дипломна робота складається з вступу, дев'яти розділів, списку використаних джерел та технологічної схеми (формат А3). У роботі використано 11 таблиць та 4 рисунки. Загальний обсяг роботи – 121 аркуш.

Ключові слова: фермент, фітаза, *Neurospora sitophila*, активність ферменту.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ФІТАЗИ БАКТЕРІЙ, ГРИБІВ ТА ДРІЖДЖІВ	9
РОЗДІЛ 2. УДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНИХ ФІТАЗ	14
2.1. Створення рекомбінантних продуцентів	17
2.2. Глибинне культивування	20
2.3. Поверхнєве культивування	21
2.4. Особливості виділення та очистки	32
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ФІТАЗА	36
3.1 Передумови виробництва ЛЗ	36
3.2 Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ	41
3.3 Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.	41
3.4 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	42
3.5 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	43
4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	47
4.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	47
4.2 Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментеру	58
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ	60
5.1 Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва .	60
5.2 Обґрунтування методу виділення фітази	68
5.3 Обґрунтування методу очистки фітази	70
5.4 Осадження ферментів	72
5.5 Діаліз	73
5.6 Обґрунтування методу концентрування продукту	74
5.7 Обґрунтування вибору лікарської форми	76
РОЗДІЛ 6. Підбір сучасних методів контролю виробництва	81
Визначення активності ферменту	81
Визначення концентрації глюкози	84
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	85

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	90
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	99
<i>9.1. Карта постадійного контролю</i>	<i>99</i>
<i>9.2. Методи контролю.....</i>	<i>105</i>
<i>9.2.1 Визначення концентрації біомаси.</i>	<i>105</i>
<i>9.2.2 Визначення активності ферменту</i>	<i>105</i>
<i>9.3 Визначення концентрації азоту</i>	<i>108</i>
<i>9.4 Визначення концентрації глюкози</i>	<i>109</i>
<i>9.5 Опис.....</i>	<i>109</i>
<i>9.6 Час розчинення.</i>	<i>109</i>
<i>9.7 Ідентифікація</i>	<i>109</i>
<i>9.8 Активність фітази</i>	<i>110</i>
<i>9.9 Виявлення білка.....</i>	<i>110</i>
<i>9.10 рН</i>	<i>110</i>
<i>9.11 Втрата в масі при висушуванні.</i>	<i>110</i>
<i>9.12 Мікробіологічна чистота.</i>	<i>111</i>
<i>9.13 Однорідність маси.</i>	<i>112</i>

ВСТУП

Гострою проблемою біосфери в даний час є поновлення вичерпаних і невідновлюваних ресурсів неорганічного фосфату. У ґрунті органічна форма фосфору представлена в основному у вигляді солей фітінової кислоти. Вони складають до 50% від загального органічного фосфору ґрунтів і запасаючими речовинами фосфору в насінні рослин в процесі їх дозрівання. Солі фітінової кислоти, будучи сильними хелатуючими агентами, пов'язують катіони двовалентних металів, а також залишки амінокислот з утворенням важкодоступних сполук. Їх гідроліз в природі здійснюється ферментами - фітаз, що є основою для створення інноваційної біотехнології на основі мікробних ферментів.[1]

Фітинова кислота заслуговує особливу увагу вчених протягом століття, тому що вона також не засвоюється в організмі людини. Фітати містяться в рослинній їжі, використовуваної в харчуванні людини, особливо в зернових, насінні, горіхах, бобових, і навіть сирих неферментованих какао-бобах і какао-порошку, а також кавових зернах утворюючи нерозчинні сполуки з мінеральними речовинами, перешкоджаючи їх всмоктуванню в кишечнику.

Існує думка, що фітинова кислота при її надходженні в організм людини є шкідливим з'єднанням. Шкода людині фітіновою кислотою полягає в тому, що вона здатна пов'язувати фосфор, магній, кальцій, залізо та інші мінерали в травному тракті за допомогою ефірних зв'язків. Через це надходження корисних мікро- та макроелементів в організм значно зменшується, що негативно позначається на здоров'ї.

Навіть невелика кількість фітінової кислоти, що надходить з рослинною їжею, вступає у взаємодію з кальцієм і утворює нерозчинні комплекси. У довгостроковій перспективі, коли в харчуванні людини постійно не вистачає мінеральних компонентів, сповільнюються обмінні процеси, і організм переходить в режим «мінерального голодування». Для дорослих людей це може проявлятися в формі руйнування зубів, остеопорозу, інсулінорезистентності та надмірної ваги. У дітей

може проявлятися уповільненням енергії росту, рахіт, деформацією і ламкістю кісток.

Ще одна з властивостей фітінової кислоти - це здатність пригнічувати дію травних ферментів, наприклад, пепсину і трипсину, внаслідок чого з'являється тяжкість в шлунку і газоутворення.[2]

РОЗДІЛ 1. ФІТАЗИ БАКТЕРІЙ, ГРИБІВ ТА ДРІЖДЖІВ

Фітаза мікроорганізмів - це особлива група ферментів фосфатаз, що володіють здатністю каталізувати послідовний гідроліз фітатів[3]. Ці ферменти можуть бути внутрішньо-і позаклітинними. В результаті дії мікробних фітаз від молекул фітати відщеплюються в послідовні неорганічні фосфату, що утворює молекулу інозитола.

В процесі мікробної деструкції фітатні залишки фосфорної кислоти вивільняються в різній послідовності і з різною швидкістю.

На різних стадіях гідролізу утворюються набори інтермедіатів в залежності від молекулярної активності і специфічності бактеріальних ферментів.

Мікробні фітази грають стратегічну роль в процесі звільнення неорганічних фосфатів з нерозчинних комплексів і є критичними білками для виживання багатьох організмів.

Всі відомі фітази поділяють на дві великі групи білків: фітази мікроорганізмів (3-фітаза), які вивільняють фосфор в С3-положенні, і фітази рослин (6-фітаза), які вивільняють фосфор в С6-положенні [4].

Фітази мають широке поширення в рослинах, мікроорганізмах та деяких тканинах тварин. Постійні дослідження показують, що мікробні фітази є найбільш перспективними для біотехнологічних застосувань. В світі було охарактеризовано фітази багатьох видів бактерій, дріжджів та грибів, але комерційне виробництво в даний час зосереджується на ґрунтовому грибі *Aspergillus*. Однак завдяки деяким властивостям, таким як специфічність субстрату, стійкість до протеолізу та каталітична ефективність, бактеріальні фітази є реальною альтернативою грибковим ферментам.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ФІТАЗИ БАКТЕРІЙ, ГРИБІВ ТА ДРІЖДЖІВ	Літ.	Аркушів	Арк.
Розроб.		Роздобудько В.В.					121	9
Перевір.		Резніченко Ю.М.						
Консультант								
Н. Контр								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

Фітази були виявлені у різних бактерій, таких як *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Raoultella* sp., *Escherichia coli*, *Citrobacter braakii*, *Enterobacter* та анаеробні бактерії, особливо *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella* sp., *Mitsuokella multiacidus* та *Mitsuokella jalaludinii*. У випадку молочнокислих бактерій результати є суперечливими; декілька штамів, мають досить низьку активність фітази, але з більшістю штамів виявлення значної активності фітази не вдалося. Лише зовсім недавно було показано, що молочнокислі бактерії, виділені з заквасок, мають значну здатність до розкладання фітатів. Серед різних штамів молочнокислих бактерій, виділених із заквасок, найкращим продуцентом фітази було визнано *Lactobacillus sanfranciscensis*, який вважається ключовою бактерією молочнокислої закваски.

Як правило, фітази, що виробляються грибами, є позаклітинними, тоді як ферменти бактерій здебільшого пов'язані з клітинами. Єдиними бактеріями, що виявляють активність позаклітинної фітази, є бактерії родів *Bacillus* та *Enterobacter*. Повідомляється, що фітази кишкової палички є периплазматичними ферментами і виявлено, що активність фітази у *Selenomonas ruminantium* та *Mitsuokella multiacidus* пов'язана із зовнішньою мембраною[5].

Фітазу виявляли в різних бактеріях та ізолятах дріжджів не тільки з ґрунту або кишкового тракту, але й з різних джерел їжі. Харчові продукти, що ферментують природним шляхом, можуть бути одним із джерел виділення непатогенних мікроорганізмів, що руйнують фітат. Вчені [6] виділили декілька штамів молочнокислих бактерій, що продукують кашу з пшеничного проса, під назвою «бен-саалга». Вони виявили два ізоляти *Lactobacillus plantarum* і *Lactobacillus fermentum* з високою фітазною активністю. Кілька штамів дріжджів було виділено з продуктів харчування та пива на основі злаків [7]. Штами зернових продуктів, що виявляють хорошу фітазну активність: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. bayanus*, *Kazachstania exigua*, *Candida krusei* та *Arxula adenivorans*. Штами, пов'язані з пивом, *S. pastorianus* та *S. cerevisiae* також були зареєстровані як фітаз-позитивні та були зареєстровані з високим рівнем позаклітинних фітаз, що

припускає, що вони є штамми для виробництва цільнозернового хліба з високим вмістом біодоступних мінералів.

Усі комерційні препарати фітази містять мікробні ферменти, що утворюються в процесі ферментації. Останні дослідження в цій галузі зосереджені на технічному вдосконаленні харчової промисловості та кращому засвоєнні мінеральних речовин. Багато дослідників намагалися безпосередньо використати мікроби, що продукують фітазу, шляхом бродіння харчових продуктів [8].

На підставі вивчення біохімічних властивостей білків і вирівнювання послідовностей амінокислотних залишків фітази поділені на два великі класи: кислі і лужні. Більшість фітаз бактерій, грибів і рослин відносяться до кислих фосфатаз. Всі ферменти цього класу мають консервативний мотив активного центру - RHGXRXP, що є унікальним для даного класу білків. За присутності консервативного гістидина в цій послідовності ферменти відносять до гістидинової кислої фосфатази. Представники цієї групи ферментів мають широку субстратну специфічність розщеплюють фітат, непов'язаний з металами, продукуючи інозитол монофосфат в якості кінцевого продукту при рН <6.0. На відміну від них, лужні фітази виявляють сувору субстратну специфічність до кальційвмістних фітатних комплексів і в якості кінцевого продукту виробляють інозитол трифосфати. Лужні фітази також широко поширені в природі.

Оптимальні значення рН і температури для здійснення каталітичної активності фітаз залежать від властивостей білків, які секретуються різними видами мікроорганізмів. Оптимальні значення рН фітаз варіюють у різних мікроорганізмів в інтервалі від 4 до 8. Бактеріальні фітази представників родів *Bacillus* і *Enterobacter* мають оптимальні значення рН в діапазоні від 6.0-8.0, а їх оптимальні температурні значення варіюють в межах від 40 ° С до 70 ° С. Молочнокислі бактерії *Lactobacillus sanfranciscensis*, адаптовані до умов кислого середовища, є продуцентами фітаз з рН 4.0 при 50 ° С. Грибні фітази є стабільно кислими білками і їх оптимальні значення рН розташовані в інтервалі від 5.0 до 5.5.

Всі фітази є мономерними білками, окрім фітази *Asp. niger*, яка є тетрамером. Молекулярна маса ферментів варіабельна і знаходиться в межах 38-100 кДа. Висока молекулярна маса фітаз грибів і дріжджів пов'язана з глікозилюванням ферментів в організмі господаря. Встановлено, що глікозилювання білків не впливало на специфічність і термостабільність фітаз. В основному фітази мають оптимум температур від 44 ° С до 60 ° С. На відміну від них, фітаз *Asp. fumigatus* і *B. amyloliquefaciens* мають оптимальне значення температури, що дорівнює 70 ° С [9].

Всі досліджувані фітази міцеліальних грибів являють собою мономерні білки з різнимим степенями глікоелірування. Фітази синтезують різні представники *Aspergillus sp.*: *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ficuum*, *A. fumigatus*, *A. terreus*.

У *A. niger* одного із перших було виявлено два типи фітаз - PhyA і PhyB. Синтез обох фітаз в диких штаммах пригнічується підвищенням концентрації фосфату. Сьогодні найрозповсюдженішим джерелом і продуцентом фітаз є вид *A. niger*, а саме дикий штам типу *A. niger*, з якого було виділено ген *phyA*, що кодує кислу фосфатазу з фітатдеградуючою активністю. Однак продукція фітази в них проходить в недостатній кількості для використання в промислових масштабах, тому їхні гени часто експресують в інші роди бактерій та грибів[10].

Фітаза А (PhyA) являє собою секретований мономерний глікопротеїн з молекулярною масою приблизно 85 кДа, який, як припускають, має два оптимуму рН реакції (2.5 і 5.0) і температурний оптимум приблизно 58 ° С. Білок має 10 потенційних сайтів N-глікозилювання. Ступінь глікозилювання білка залежить від системи експресії. Однак після деглікозилювання рекомбінантна фітаза зберігає 95% своєї вихідної активності.

Фітаза В (PhyB) є тетрамером. Фермент здатний гідролізувати фітати тільки при значенні рН 2.0-2.5, а при рН 5.0 активність даної фітази відсутня. Дана фітаза є більш стійка до підвищення температури[11].

Ферменти, здатні гідролізувати фітинові кислоти, були виявлені у різних представників дріжджевих грибів. Було перевірено більшість відомих видів дріжджів, з яких приблизно 35 володіли помітною фітазною активністю. До них

відносяться *Schwanniomyces castellii*, *Arxula adenivorans*, *Candida sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae* та ін. Дріжджі *Pichia rhodanensis* і *Pichia spartinae* продемонстрували, крім того, дуже високий рівень секреції фітазою.

Активний пошук дріжджових фітаз почався в 1992 році, коли була виділені фітази з родів *S. castellii* і *S. occidentalis*. Виявлені фітази мають активність в області рН 4.5 і при 60-75 °С. Однак зустрічаються більш термостабільні фітази, наприклад, фітаза *P. spartinae*, яка зберігає активність при 80 °С [12].

Слід зазначити, що температурна стійкість фітаз залежить від наявності субстрату. За відсутності субстрату фітазні ферменти при такій температурі інактивуються протягом 30 хв.

Однак природна активність фітаз у дріжджів надто низька для того, щоб в процесі бродіння, наприклад, при приготуванні хліба, забезпечити розщеплення фітатів. Тому особливу цінність могли б мати штами дріжджів, що володіють підвищеною активністю фітази. На відміну від грибів та бактерій, структурні гени фітаз дріжджів не ідентифіковано, а дані, що стосуються їх регуляції і синтезу суперечливі.

РОЗДІЛ 2. УДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНИХ ФІТАЗ

Проблеми забруднення фосфором та його впливу на навколишнє середовище зумовили біотехнологічний розвиток фітаз. Фосфорна кислота, інозитолфосфат або інозитолі утворюються після гідролізу фосфату з фітату, ініційованого фітазою. Дослідження за останні два десятиліття мікробних фітаз поглибили наше розуміння їх виробництва, оптимізації та характеристики. Незважаючи на широку доступність мікроорганізмів, що продукують фітазу, комерційну експлуатацію отримали лише деякі з них. Нинішня висока вартість фітаз, нездатність протистояти високим температурам ($> 85^{\circ} \text{C}$), обмежений діапазон рН та погана стабільність при зберіганні є головним вузьким місцем при комерціалізації фітаз. Розробка нових фітаз з оптимальними властивостями для різних застосувань є основною науковою проблемою.[13]

Група вчених [14] використовуючи статистичну оптимізацію, посилили активність фітази за допомогою нового штаму *Saccharomyces cerevisiae*, культивованого в мінеральному середовищі. Концентрації джерела вуглецю та індуктора утворення фітази були оптимізовані за допомогою методу CCD та методології поверхневого відгуку (RSM). Сечовину використовували як джерело азоту в живильному середовищі (0,15%, мас.). Поживне середовище, складається з 2,5% сахарози та 0,5% фітату натрію, який оптимально підтримував максимальну активність фітази. Крім того, було виявлено, що культура дріжджів при температурі 35°C та при 150 об / хв підтримує максимальне утворення фітази. Дієвість цієї моделі була перевірена шляхом культивування організмів у колбах на шейкері. Використовуючи оптимізовані середовища та умови росту, вчені отримали 10-кратне покращення у виробництві фітази *S. cerevisiae*.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Роздобудько В.В.			РОЗДІЛ 2. УДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНИХ ФІТАЗ	Літ.	Аркушів	Арк.
Перевір.		Резніченко Ю.М.					121	14
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Виробництво фітази в оптимізованому середовищі вивчали в різних культуральних умовах. У всіх експериментах використовували один мілілітр дріжджового преінокуля. Аналізи проводились у трьох примірниках, і результати представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення. Тест Тукі був використаний для визначення суттєвих відмінностей середніх значень для різних компонентів. До оптимізації час експериментального бродіння визначали як 36 год. Експерименти проводились у центральній точці через 12, 24, 36 та 48 годин. Результати показали, що біомаса дріжджів збільшується із збільшенням часу бродіння. Однак активність фітази при культивуванні дріжджів в обох субстратах зростала лише до 36 год ($0,55 \pm 0,01$ ОД / мл та $0,051 \pm 0,004$ відповідно у фітаті натрію та 4-АЕС) і значно зменшувалася через 48 год.[15]

Група вчених [16] використовували комбінацію фізичного та хімічного мутагенезу для виділення штамів *Aspergillus niger* NCIM 563 зі збільшеною активністю фітази. Активність фітази мутантів N-1 і N-79 була приблизно на 17 і 47% вищою, ніж батьківський штам. У струшувальній колбі продуктивність фітази у батьківських та мутантних N-1 та N-79 становила 6181, 7619 та 9523 МО / л на добу відповідно. Було вивчено масштабування ферментації із струшуваної колби до 3 і 14 л ферментера.

Після оптимізації різних параметрів бродіння, таких як аерація, перемішування та джерело вуглецю у ферментаційному середовищі, час ферментації для досягнення найвищої активності фітази значно скоротився з 14 днів у колбі для струшування до 8 днів у ферментаторі 14 л. Найвища активність фітази - 80 МО / мл була отримана в 1% рисових висівок – 3,5% глюкози, де проводилась аерація 0,2 об. /хв та перемішування 550 об / хв при кімнатній температурі протягом 8-ми днів ферментації.

Додавання бавістину (0,1%), пеніциліну (0,1%), формаліну (0,2%) та хлориду натрію (10%) у ферментоване середовище ефективно зберігали 100% активність фітази протягом 8 днів при кімнатній температурі, тоді як ці реагенти разом з

метанолом (50%) і етанолом (50%) забезпечують 100% стабільність активності фітази при 4 ° С до 20 днів.

Дослідження термостабілізації показують 100%-ий захист активності фітази в присутності 12% знежиреного молока при 70 ° С, що буде корисно для подальшої обробки в розпилювальній сушарці.

Протягом досліджень, вчені успішно виділили мутантів (N-1 та N-79) шляхом поєднання фізичного (УФ) та хімічного (ЕМС) мутагенезу із збільшенням продуктивності батьківського штаму з 6 181 МО / л на добу до мутантного штаму (N-79) до 9523 МО / л на добу. Подальша робота щодо масштабування процесу до ферментатора на 100 л за допомогою мутанта гіперсекретаря N-79 триває.

Вчені [17] відібрали з п'яти різних ізолятів молочнокислих бактерій, продуцентів фітаз, отриманих із джерел фекалій тварин із лабораторного збору культур. З п'яти ізолятів С4 / 1А показав найвищу активність фітази (21,25 U / мл) порівняно з іншими і був ідентифікований як *Pediococcus pentosaceus* С4 / 1А шляхом секвенування генів 16S рРНК. Оптимізацію рецептури середовища та умов культури проводили звичайним методом з використанням методології поверхневої реакції (RSM). Під впливом чотирьох параметрів вивчали ріст бактерій, зменшуючи залишок невикористаного цукру.

Біосинтез фітази збільшився з 21,2 Од / мл до 42,3 Од / мл, використовуючи оптимізовану форму середовища та умови культивування.

Безперервне культивування проводили зі швидкістю розведення в діапазоні від 0,1 год⁻¹ до 0,4 год⁻¹, а рівноважний стан *P. pentosaceus*С4 / 1А був досягнутий після п'яти поколінь та трьох періодів перебування. Культивування проводили протягом 48 год, і найвищу продуктивність фітази та концентрацію клітин було отримано при швидкості розведення 0,3 год⁻¹, що дало 8,65 Од / мл / год та 0,894 г / л / год відповідно. Протягом процесу культивування виробництво фітази було поліпшено на 89,3% від експерименту зі струшуванням у 2-літровому біореакторі.

Результати цього дослідження продемонстрували, що дослідний штам зміг добре рости на середовищі MRS та виробляти фітазу. Найбільшу активність фітази показав *P. Pentosaceus* C4 / 1A із використанням модифікованого середовища MRS.

Група вчених [18] досліджувала вплив поживних речовин та фізичних умов на вироблення фітази з нещодавно виділеним штамом *Aspergillus tubingensis* SKA при поверхневому бродінні на пшеничних висівках. Досліджувані фактори поживних речовин включали джерело вуглецю, джерело азоту, джерело та концентрацію фосфатів, іони металів (солі), а також фізичні параметри, включали розмір посівного матеріалу, рН, температуру та тривалість бродіння. Дослідження показали, що оптимальна продуктивність фітази була досягнута з використанням пшеничних висівок з додаванням: 1,5% глюкози, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% фітату натрію. Крім того, оптимальними фізичними умовами була концентрація посівного матеріалу в 1×10^5 спор / г субстрату, початковий рН 5,0, температура бродіння 30 ° C і тривалість бродіння 96 год. Загалом поліпшення активності фітази було досягнуто на 34% та досягала 60,89 од. / мл завдяки використанню оптимальних умов.

2.1. Створення рекомбінантних продуцентів

У дослідженні вчених [19] ген, що кодує фітазу, клонували із залишків врожаю червоного рису та макухи рицини, використовуючи стратегію метагеноміки. Ідентичність амінокислот між цим геном та його найближчими аналогами нижче 60%. Фітаза отримала назву PhyRC001 і була біохімічно охарактеризована. Цей рекомбінантний білок проявляв активність до фітату натрію, вказуючи на те, що PhyRC001 є ферментом гідролази. Ферментативна активність була оптимальною при рН 7.0 і при температурі 35 ° C. β -гвинтові фітази мають великий потенціал як кормові добавки, оскільки це єдиний тип фітаз з високою активністю при нейтральному рН. Отже, дослідження та використання основного механізму функціонування β -гвинтової фітази може мати велику користь для біотехнології.

Фермент PhyRC001 показав свою основну активність при температурах від 25 до 70 ° C, а максимальна активність PhyRC001 була виявлена при його інкубації при

35 ° C. Коли температура була вище 35 ° C, ферментативна активність швидко втрачалася. Після однієї години інкубації при різних температурах PhyRC001 зберігав свою активність при 60 і 70 °.

Фітази з високою термостабільністю особливо бажані завдяки своїй здатності витримувати перехідні високі температури під час процедур гранулювання корму. Порівняння кристалічних структур широко використовуваної промислової фітази *Aspergillus niger* PhyA (AnP) з її близьким гомологом, термостабільною фітазою *Aspergillus fumigatus* (AfP), вченими [20] свідчить про 18 залишків у трьох сегментах, пов'язаних з термостабільністю. У цій роботі було проведено дослідження стосовно покращення термостабільності фітази за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу. Були виявлені сприятливі мутації на основі структурного порівняння гомологічних фітаз та моделювання молекулярної динаміки.

Рекомбінантна фітаза (AnP-M1) була створена шляхом заміщення 18 залишків в AnP їх аналогами AfP. AnP-M1 продемонстрував більшу термостабільність, ніж AnP при 70 ° C. Моделювання молекулярної динаміки припустило, що новоутворені взаємодії водневого зв'язку з дев'ятьма заміщеними залишками створюють поліпшену рухливість. Таким чином, була створена ще одна рекомбінантна фітаза (AnP-M2) з цими дев'ятьма точковими замінами. AnP-M2 продемонстрував найкращу термостабільність серед усіх AnP при ≥ 70 ° C: AnP-M2 підтримував 56% максимальної активності після інкубації при 80 ° C протягом 1 години; AnP-M2 зберігав на 30% більшу залишкову активність, ніж AnP та AnP-M1, після 1 години інкубації при 90 ° C.

Отриманий AnP-M2 є привабливим кандидатом у промислових застосуваннях, а варіант з дев'ятьма замінами у AnP-M2 є вигідними для промислових продукцій термостабільної фітази. Ця робота демонструє, що стратегія, що поєднує структурне порівняння гомологічних ферментів та обчислювальне моделювання для зосередження уваги на важливих взаємодіях, є ефективним методом отримання термостабільного ферменту.

В ході розробки літогляду, також були віднайдені рекомбінантні штами мікроорганізмів, які в ході модифікації отримали ген фітази, та мали спроможність до його продукції, які будуть наведені в таблиці 2.1:

Таблиця 2.1

Назва штаму	Введені гени	Джерело отриманих генів	Цільовий продукт та його концентрація	Особливості культивування	Література
<i>E. coli</i> BL21	phyL- ген ферменту фітази	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	Фітаза з активністю 316 U/mg, та розміром ферменту приблизно 42кДа	Культивували штам <i>E. coli</i> BL21 при 37 °C у бульйоні Хотінгера протягом 24 год	19
<i>Pichia pastoris</i> KM71	Ген фітази Nov9x	<i>Neosartorya spinosa</i> BCC 41923	Фітаза з активністю 38.62 U/mg розміром ферменту приблизно 52кДа	Культивували в дріжджовому екстракті пептон-декстрази (YPD) або в буферизованому середовищі з гліцериновим комплексом (BMGY: 1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 100 мМ фосфат калію, рН 6,0, 1,34% дріжджової азотної основи без амінокислоти, 4 × 10 ⁻⁵ % біотину та 1% гліцерин) при 30 ° C , та при 200 об / хв.	20
<i>Pichia pastoris</i> GS115	phyL- ген ферменту фітази	<i>Aspergillus fumigatus</i> WY-2	Фітаза з активністю 4,1 U/mg розміром ферменту приблизно 88 кДа	Рекомбінантні дріжджі культивували в оптимізованому середовищі наступного складу (4% глюкози, 0,2% дріжджового екстракту, 2% пептону, 2% NH ₂ SO ₄ , 0,05% KCl, 0,05% MgSO ₄ *7H ₂ O, 0,003% MnSO ₄ *7H ₂ O і 0,003% FeSO ₄ *7H ₂ O, рН 5,5) при °30 C і 200 об / хв протягом 36 год	21
<i>E. coli</i> B L21(DE 3)	Ген фітази appAs	<i>Shigella</i> sp. CD2	Фітаза з активністю 967 U/mg	Вирощували протягом 12 год в бульйоні Лурія при 37 ° C та 200 об / хв.	22

2.2. Глибинне культивування

На сьогоднішній день мікробна фітаза в основному виробляється поверхневим методом ферментації з незначними обсягами виробництва. У літературі є лише кілька досліджень, згідно з якими виробництво фітази проводилось глибинним методом в ферментері.

У дослідженнях вчених [25] були оптимізовані параметри росту (температура, рН та аерація) та важливі елементи середовища (глюкоза, натрій-фітат та CaSO_4). Це дослідження було проведено для подальшого посилення виробництва фітази з *Aspergillus ficuum* шляхом періодичної ферментації. Результати показали, що додавання 60 г глюкози та 10 г Na-фітату за 96 год ферментації збільшувало активність фітази до 3,84 та 4,82 ОД / мл відповідно. Максимальна активність фітази була додатково посилена додаванням глюкози та Na-фітату на 11 та 40% відповідно, порівняно із періодичними ферментаціями фітази. Також повідомлялося, що активність фітази зростала вище при додаванні глюкози та натрій фітату на початкових стадіях ферментації через більшу мікробну активність.

Дослідження вчених [26] мало на меті покращити поточну продукцію глибинної грибової фітази за допомогою нової техніки бродіння шляхом оцінки впливу різних мікрочастинок на вироблення фітази штамом *Aspergillus ficuum*. Було відмічено, що мікрочастинки запобігали підвищеному зростанню грибових гранул, зменшували їх середній розмір колоній та значно підвищували активність фітази.

Результати візуалізації мікробної структури показали, що середній радіус грибових колоній зменшився з 800 до 500 та 200 мкм шляхом додавання 15 г / л оксиду алюмінію та тальку при ферментації. Крім того, додавання тальку та оксиду алюмінію збільшило активність фітази до 2,01 та 2,93 ОД / мл відповідно порівняно з контрольним дослідження (1,02 ОД / мл). Активність фітази досягала 6,49 ОД / мл протягом 96 годин ферментації.

Слід зазначити, що мікрочастинки значно підвищили активність грибової фітази та врожайність продукції порівняно з контрольним бродінням, тоді як

максимальна активність фітази становила лише 3,45 Од / мл при 120 год ферментації в контрольному дослідженні у ферментері з робочим об'ємом 1 л.

Метою дослідження вчених [27] було підвищення активності фітази глибинним методом, шляхом скринінгу кількох штамів мікроорганізмів на основі літератури для вибору найбільш продуктивного продуцента фітази та оптимізації таких параметрів як ріст, температура, рН та рівень аерації за допомогою методології RSM. Як результат, серед чотирьох різних мікроорганізмів, що оцінювались, *Aspergillus ficuum* (NRRL 3135) було обрано найбільш продуктивним штамом. Оптимальні значення температури, рН та аерації становили відповідно 33 °С, 4,5 при 0,9 об. / хв. За цих умов активність фітази становила 2,27 Од / мл.

2.3. Поверхнєве культивування

Фітинова кислота заслуговує особливу увагу вчених протягом століття, тому що вона також не засвоюється в організмі людини. Фітати містяться в рослинній їжі, використовуюваної в харчуванні людини, особливо в зернових, насінні, горіхах, бобових, і навіть сирих неферментованих какао-бобах і какао-порошку, а також кавових зернах утворюючи нерозчинні сполуки з мінеральними речовинами, перешкоджаючи їх всмоктуванню в кишечнику. [25]

Фітаза продукується багатьма мікроорганізмами - бактеріями, грибами і дріжджами. Для комерційного виробництва фітазою застосовують високопродуктивні штами *Aspergillus niger*.

Мікроскопічні гриби найпоширеніші продуценти фітаз, так як синтезують позаклітинну кислотостійку фітазу (рН 4,0 - 7,3).

Фітаза була виявлена у різних бактерій: *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus amyloliquefaciens*. До позаклітинного синтезу ферменту здатні тільки бактерії родів *Bacillus* і *Enterobacter*. Бактеріальні штами-продуценти не представляють інтересу для промислового отримання фітазою, так як синтезують фермент, активний тільки

при нейтральних значеннях рН (6,5 - 7,5). Крім того внутрішньоклітинний синтез фітазою ускладнює процедуру очищення ферменту.

Для виробництва фітазою використовують методи глибинного та поверхневого культивування. Застосування твердофазного культивування найбільш підходить для синтезу ферменту грибними продуцентами, однак глибинне культивування є головним методом промислового отримання фітази.

У літературі розглядаються різні технології отримання фітази, проте вони не мають прикладного застосування. Використання різних агровідходів в якості сировини для отримання фітазою, вивчають дослідні центри Індії, Марокко, Таїланду.

В деяких роботах описується можливість використання глибинного культивування мікроорганізмів для продукції фітази з використанням оброблених агровідходів. Сутність обробки зводиться до промивання дистильованою водою подрібненого субстрату з метою видалення неорганічного фосфату - інгібітора синтезу фітази.

Для продукції фітази на агровідходах із застосуванням методів поверхневого культивування пропонується використовувати пшеничні та рисові висівки, шроти олійних культур, очеретяну бегасу і ін.

Культивування мікроорганізмів на суміші ростових субстратів дає змогу уникнути непродуктивних витрат вуглецю та енергії, які мають місце при використанні моносубстратів, а також підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у біомасу та інтенсифікувати синтез вторинних метаболітів. У даному розділі проаналізовано сучасну наукову літературу останніх років щодо синтезу фітази поверхневим методом культивування, його особливості та характеристики.

Грибні фітази зазвичай культивуються поверхневим методом, при яких сільськогосподарські відходи та інші дешеві природні субстрати використовуються як субстрати в процесі. Поверхнєве культивування визначається як процес бродіння

мікроорганізмів, вирощених на поверхні твердого матеріалу з відсутністю або майже відсутністю вільної води. Однак процес повинен мати достатню кількість вологи, щоб підтримувати ріст мікроорганізмів.

В основному поверхневе культивування грибів є більш ефективним через те, умови такого методу максимально схожі до природніх. Через це, даний метод культивування із залученням грибів забезпечує високу об'ємну продуктивність та високий рівень активності ферментів. У цьому методі ферменти можуть бути легко отримані в чистому виді, та і сам процес визнаний менш дорогим, простішим у використанні та менш трудомістким.

В основному поверхневий метод культивування застосовують до наступних штамів грибів: *A. flavus*, *A. ficuum*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *Ganoderma stipitatum*, *Grifola frondosa*, *M. racemosus*, *Penicillium purpurogenum*, *R. oligosporus*, *R. oryzae*, *S. commune*, *Thermomyces lanuginosus* та *Trametes versicolor*.

Деякі субстрати, які зазвичай використовуються для виробництва фітази, - це шкірки цитрусових, пшеничні висівки, солома пшениці, соєвий шрот, рисові висівки, макухи, качани кукурудзи, кукурудзяні висівки та коржі з кокосового масла[28].

Наприклад, в недавньому дослідженні групи вчених [29] в якості субстрату використовували пшеничні висівки та невелику кількість сахарози. Ферментацію проводили поверхневим методом, в аеробних умовах при 55% вологості, при рН 7,0, та температури 33 ° С. Підвищення продукування фітази проводилось за допомогою додавання до культуральної сировини по 1 мМ наступних речовин: (K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺). Завдяки такому культивуванню була досягнута досить непогана активність ферменту, а саме 113,7 ОД/г.

У дослідженні вчених[30] було проведено порівняння поверхневого та глибинного методу культивування для отримання фітази з *Aspergillus niger* CFR 335 та *Aspergillus ficuum* SGA 01. Було виявлено, що обидва гриби здатні продукувати

максимум фітази на 5-й день інкубації як у глибинному, так і у поверхневому середовищі культивування. *Aspergillus niger* CFR 335 та *A. Ficium* виробляли максимум 60,6 Од / г і 38 Од /г ферменту відповідно при поверхневому культивуванні у середовищі пшеничних висівок. Підвищення рівня активності ферментів до 76 і 50,7 Од / г було проведено при вирощуванні в комбінованому субстратному середовищі, що включало в себе пшеничні висівки, рисові висівки та арахісових відходів у співвідношенні 2: 1: 1. Глибинне культивування давало максимум 9,6 і 8,2 Од / мл ферментної активності у *A. niger* CFR 335 та *A.ficium* відповідно при вирощуванні на бульйоні декстрази та картоплі

Штам грибів *Neurospora sitophila* у дослідженні[31] продукував фітазу з активністю 195,66 Од/мл, поверхневим методом у середовищі наступного складу(г/л): Рисова солома – 187,5, Соєва пульпа-437,5, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ - 0,03, NaCl- 0,04 протягом 96 год, в аеробних умовах при 30 ° С та рН 6, 0. Після ферментації робочу сировину змочують в дистильованій воді та перемішують в колбах при 180 об/хв протягом години, потім суспензію центрифугували при 8000 об/хв протягом 20 хв при 4 ° С.

Вчені [32] досліджували вплив поживних речовин та фізичних умов на культивування *фітази* з виділеного штаму *Aspergillus tubingensis* SKA поверхневим методом на пшеничних висівках. Досліджувані фактори поживних речовин включали джерело вуглецю, джерело азоту, джерело та концентрацію фосфату, іони металів (солі), фізичні параметри, що досліджувались, включали розмір посівного матеріалу, рН, температуру та тривалість бродіння. Дослідження показали, що оптимальна продуктивність фітази була досягнута з використанням пшеничних висівок з додаванням: 1,5% глюкози. 0,5% $(NH_4)_2SO_4$, та 0,1% фітату натрію. Крім того, оптимальними фізичними умовами була концентрація мікроорганізмів 1×10^5 спор / г субстрату, початковий рН 5,0, температура бродіння 30 ° С та тривалість бродіння 96 год. Загалом поліпшення активності фітази було досягнуто на 34% завдяки використанню оптимальних умов.

Наступне дослідження вчених[32] мали на меті дослідити доцільність використання поверхневого методу та оптимізувати умови виробництва *фітази Aspergillus ficuum* з картопляних відходів. Під час дослідження оцінювались різні параметри, включаючи рН картопляних відходів, рівень посівного матеріалу, вміст вологи, інкубаційний період, температуру та додаткові джерела азоту та вуглецю. Результати показали, що рН, рівень посівного матеріалу та вміст вологи суттєво не змінювали вироблення фітази. Однак різні періоди інкубації, температури інкубації, джерела азоту та джерела вуглецю суттєво змінили активність фітази. Ідеальні та економічні умови для виробництва фітази полягали в нормальному вмісті вологи (79%) картопляних відходів, розмірі 1,0 мл посівного матеріалу та нормальному рН 6,1 при кімнатній температурі протягом 144 годин часу інкубації. Найвища активність фітази ($5,17 \pm 0,82$ Од /г) була отримана за вищезазначених оптимізованих умов. При використанні $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ як джерела азоту в субстраті, активність фітази зросла до $12,93 \pm 0,47$ Од / г, що було в 2,5 рази більше порівняно з контрольною обробкою. У цьому дослідженні запропоновано новий та економічний спосіб перетворення відходів харчової промисловості на високоцінні продукти та досліджено оптимальні умови виробництва фітази під час твердофазних відходів у картопляних відходах.

У статті[33] проводилось культивування фітази вивчалось трьома штамми *Mucor* та вісьмома штамми *Rhizopus* методом поверхневого культивування, на трьох загальноживаних природних інгредієнтах поживного серидовища (макуха ріпаку, кокосове масло, пшеничні висівки). *Mucor racemosus* NRRL 1994 (ATCC 46129) при культивуванні давав найбільш активну фітазу (14,5 Од / г активності фітази сухої речовини) на кокосовій олії. Оптимізуючи серидовище з кокосовою олією додаванням глюкози, казеїну та $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, активність фітази у було збільшено до 26 Од / г сухої речовини.

Культивування у статті[34] *фітази Penicillium purpurogenum* GE1, виділеного із ґрунту навколо бульбочок кореня квасолі, досліджували поверхневим методом із застосуванням змішаних субстратів, що складаються з качанів кукурудзи та

кукурудзяних висівок. Умови культивування були оптимізовані за допомогою стратегії "одна змінна за раз". Оптимальними умовами для отримання фітази були 27 ° С, рН 8 та 66% вмісту вологи. Дослідження різних джерел вуглецю та азоту показало, що глюкоза та пептон дають найвищу продуктивність ферментів ($92 \pm 5,6$ Од / г). Серед різних поверхнево-активних речовин максимальна продуктивність фітази спостерігалася при додаванні речовини Твін 80 в концентраціях 0,001 % та підвищувалась до $170 \pm 4,2$ Од / г. Для дослідження оптимізації найбільш значущих змінних, що впливають на вироблення ферментів, була застосована конструкція Вох-Вейнкен. Максимальна активність фітази було виявлено після додавання наступних речовин в серидовище в концентраціях (г/л): 0,75-глюкози, 0,375-пептону і 0,01-твін 80. Цей результат представляв збільшення активності фітази в 2,6 рази порівняно з тим, що раніше отримували з використанням базального середовища за однакових умов вирощування. Створена модель виявилася дуже адекватною для виробництва фітази (точність 90%), оскільки експериментальне значення становило $444 \pm 3,5$ Од / г порівняно з 401 Од / г для прогнозованого значення. Отже, виробництво фітази з використанням качанів кукурудзи та кукурудзяних висівок - це новий та дешевий спосіб виробництва цього важливого ферменту, який відкриває новий шлях для дослідників відкрити та дослідити цю арену.

Дослідження[35] стосується використання агропромислових відходів, а саме макухи арахісової олії, для виробництва фітази грибами *Aspergillus niger* NCIM 563. Для оцінки продуктивності культивування порівнювали 11 змінних процесу за конструкцією Плакетта-Бурмана.

На виробництво фітази суттєво впливали глюкоза, декстрин, дистильована вода та $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Оптимізація умов культивування та якісного та кількісного складу культурального серидовища збільшило активність фітази приблизно в 36,67 разів від початкових значень (15 МО / г) до 550 МО / г. Також фермент, виявляючи оптимальну активність в кислих умовах, виявив значну активність у широкому діапазоні значень рН (1,5–6,5).

Дослідження[36] включає дослідження впливу вмісту води, значення рН та різних інгредієнтів середовища, такі як вуглець, азот та поверхнево-активні речовини для отримання фітази грибом *Aspergillus ficuum* DSM 932 поверхневим методом культивування з використанням рисових висівок як субстрату. Виробництво фітази поверхневим методом включало наступні сприятливі умови: вміст води 60% і рН 7,0. В результаті активність фітази при такому культивуванні складає 5,2 Од / г сухого субстрату. Доповнивши рисові висівки сахарозою та екстрактом дріжджів при поверхневому методі культивування у лоткових біореакторах, активність фітази максимально складає 6,76 Од / г сухого субстрату.

Вирощування кишкової палички на субстраті з пшеничних висівок у роботі вчених[37] в різних умовах методом поверхневого культивування оцінювали за виходом фітази разом із профілем активності ферменту як потенційну, недорогу альтернативу ферментації глибинним методом. Максимальна активність фітази, досягнута *E. coli*, становила 350 ± 50 SPU на грам висівок, інкубованих протягом 96 год із вмістом води в шарі субстрату 70% (мас. / Об.) При 37°C з відносною вологістю повітря 90% та додаванням 10% порошку бульйону Лурія-Бертані, спостерігається збільшення активності фітази аж на 300% порівняно з культурою, що не оптимізується. Найбільші покращення активності фітази були пов'язані з додаванням поживних речовин та оптимізацією початкового вмісту води в субстраті. У цьому дослідженні показано, що виробництво фітази з використанням поверхневої технології культивування є можливим, використовуючи недорогі агрозалишкові пшеничні висівки як субстрат. Крім того, вплив рН та температури на активність фітази контролювали від рН 2,5 до рН 7,5, а також для температур від 20°C до 70°C . Оптимальна активність фітази була при рН 5,5 і 50°C .

Результати цього дослідження дозволяють припустити, що виробництво бактеріальної фітази з використанням *кишкової палички* поверхневою технологією культивування є технічно здійсненним, можливо, пропонуючи нову, недорогу можливість виробництва високостійкої фітази як альтернативи *Bacillus* sp.

У роботі[38] , було досліджено використання пшеничних висівок як субстрату для виробництва фітази при поверхневому методі культивування. Для того, щоб знайти найкращі умови культивування для отримання фітази за допомогою лабораторного штаму *Aspergillus niger*, проводились три різні попередні обробки культурального середовища: пшеничні висівки без промивання та автоклавовання; висівки пшеничні вимиті та автоклавовані; висівки пшеничні без промивання та впливу УФ протягом 2 год. Також використовувались два різні середовища для підготовки посівного матеріалу наступного складу (г / л): сахароза 5, $MnSO_4-0,1$, $MgSO_4-0,5$, $Fe_2(SO_4)_2-0,1$, $KCl-0,5$, екстракт дріжджів- 2; глюкоза-5, крохмаль -5, $MnSO_4-0,1$, $MgSO_4-0,5$, $Fe_2(SO_4)_2-0,1$, $KCl-0,5$, $CaCl_2-0,5$,

Ферментацію проводили за наступних умов: рН 6,5, 60% вологи при 30 ° С протягом 12 днів. Після обробки даних, було визначено, що оптимальні умови для культивування складають наступні умови: пшеничні висівки без промивання та ультрафіолетового впливу протягом 2 годин та пергий варіант культурального середовища. Максимальна активність фітази становила: $4,2 \pm 0,71$ Од / г за 96 год культивування. Отримані в цьому дослідженні умови бродіння можуть використовувати для пошуку найкращого штаму, що продукує фітазу, для майбутніх експериментів.

Дослідження[39] було проведено з метою оптимізації культуральних умов виробництва фітази *Aspergillus niger* USM АП1 з використанням макухи пальмових ядер як субстрату при поверхневому методі культивування. Оптимізовані умови культивування мають наступні характеристики: 10 г/л макухи пальмових ядер з розміром частинок $\leq 0,5$ мм, концентрація посівного матеріалу 1×10^5 спори / мл, вміст вологи 60% та частота перемішування середовища один раз на 48 годин дають активність фітази $4,91 \pm 0,17$ U / г у висушеному субстраті. Максимальне зростання, а також вироблення ферментів було зафіксовано на 4-й день вирощування при кімнатній температурі (30 ± 2 °С). Результати показали, що виробництво фітази збільшилось на 171,3% після оптимізації ($4,91 \pm 0,17$ Од / г) порівняно з результатом до оптимізації ($1,81 \pm 0,16$

ОД / г). Це дослідження показало, що макуха пальмових ядер є потенційним середовищем для виробництва фітази при поверхневому методі культивування.

У статті[40] було проведено дослідження для оцінки процесу виробництва фітази *Aspergillus niger* при поверхневому методі культивування із використанням відходів тритикале. Відходи, які в даний час не використовуються та є термінальними речовинами в промисловості, були використані для даного біотехнологічного процесу, та мають великий поживний потенціал. Процес проводився з використанням середовища, що не містить добавки, та доповнене лише одним джерелом азоту. За цих умов була отримана наступна активність фітази 7,45 ОД / г с. Даний процес був оптимізований з використанням різних добавок, таких як декстроза, лактоза та Твін 80, хлористий калій. Для максимізації ферментації використовувались дві експериментальні конструкції: 1) конструкція Плакетта-Бурмана (PBD) і 2) конструкція Вох-Behnken (BBD). PBD використовували для оцінки впливу пов'язаних змінних на продукцію фітази, а також рівня їх значущості в процесі, тоді як BBD використовувався для визначення оптимальних умов. Процес проводили з чашками Петрі та отримували максимальну активність ферменту 25,8 МО / г. Потім проводили поверхнєве культивування в піддоні для збільшення кількості ферментованого субстрату та отримали активність фітази 23,63 МО / г. Результати цього дослідження свідчать про мінімальне зменшення (8,4%) виробництва ферментів із масштабуванням.

На основі аналізу результатів цього дослідження можна зробити висновок, що використання тритикале як відходів для виробництва фітази є надзвичайно можливим як з економічної точки зору, так і з точки зору ефективності. Отримані результати є дуже значущими і можуть призвести до подальших досліджень через важливість фітази в кормі для промислових тварин. Ведення високоступного процесу та збільшення виробництва представляє великий інтерес на рівні промислового виробництва. Слід зазначити, що загальний процес поверхневого культивування - це стійкий процес, який демонструє важливість використання нульової вартості цього залишку при виробництві метаболітів. Шкала рівня

випробувань показала високу доцільність застосування цих відходів для виробництва промислових ферментів фітази при збереженні високих урожаїв, ефективності та низьких витрат на обробку.

У статті[41] було взято двадцять шість ізолятів грибів, які було виділено із зразків різних джерел. Ізоляти пройшли скринінг на виробництво фітази (фермента, що розщеплює фітат) шляхом розповсюдження ізолятів на середовищі для скринінгу фітази (PSM) та контролю за утворенням чистої зони навколо вирощених колоній. Тільки тринадцять ізолятів змогли сформувати чітку зону, що свідчить про їх здатність виробляти фермент фітази. Піддавши ізоляти кількісному скринінгу як під час поверхневого культивування, було встановлено, що найвизначнішим серед шатмів є грибовий ізолят (G1), який був ідентифікований як *Aspergillus tubingensis* і позначений як SKA шляхом надання ферментативної активності в обох методах із досягнутими значеннями (49,83 та 26,53 Од / мл).

У роботі [42] група вітчизняних вчених проводила вивчення фізико-хімічних та біохімічних властивостей фітази ладозим проксі з метою її модифікації та підвищення ефективності використання як кормової добавки.

Об'єктом дослідження була фітаза Ладозим проксі, одержана із фугату культуральної рідини бактерій та грибів (м. Ладижин). Визначення стабільності фітази проводили у відсутності активаторів та інгібіторів. Інкубацію ферменту проводили протягом 2 год за рН 3–6. Для підтримки рН використовували буферні системи: 0,2 М гліцин- HCl (рН 2,6 3,6), 0,1 М Na-фталат (рН 4,5), 0,1 М Na-ацетат (рН 5,0,- 5,8), Трис- HCl 0,2 М (рН 7,1). Під час виявлення функціональних груп, положення та особливостей функціонування активного центру фітази було проведено і встановлено:

– інкубація фітази з цистеїном та глутатіоном не призвела до змін активності ферменту, тому досліджувана фітаза або не має вільних та доступних сульфгідрильних груп, або ці вільні сульфгідрильні групи відіграють незначну роль в активності та структурі ферменту. Таким чином, досліджувана фітаза не потребує

модифікації носія цистеїном, який використовується для захисту активного центру сульфгідрильних ферментів під час їх іммобілізації.

Фітаза інактивується під час інкубації з диетилпірокарбонатом, що свідчить про наявність залишків гістидину, який відповідає за каталітичні функції ферменту.

В реакції гістидину з диетилпірокарбонатом (рН = 6) утворюється N-карбетокси похідне, яке має спектр з максимумом поглинання 240 нм.

– під час інкубації фітази в присутності ЕДТА (0,05 мМ) не відбувається змін активності ферменту, що свідчить про відсутність в молекулі ферменту катіона металу, який відіграє каталітичну функцію.

Отже, в ході роботи було встановлено, що досліджувана фітаза належить до групи гістидинових кислих фосфогідролаз. На основі структури біокаталізатора, ефекторів, що сприяють стабілізації його структури, вивчено дії інгібіторів та активаторів визначені оптимальні умови його функціонування.

Групою вітчизняних вчених у роботі [43] проводилось дослідження фітаз дріждів штаму *Debaryomyces castellii*. В даній роботі була приведена велика увага дослідженню поліпептидів, що володіють фітазною активністю.

Численні фітази мікроорганізмів вже досліджені і знайшли застосування в різних агропромислових областях. Проте зростаюче застосування фітаз як добавка в різних біотехнологічних застосуваннях, таких як, наприклад, корма для тварин, підвищує перевагу: 1) виділення нових ефективних мікроорганізмів, що продукують фітази; 2) отримання ефективних фітаз, тобто фітаз, які є ефективними при вивільненні фосфатів з корму в травному тракті, які проявляють термостійкість в процесі виготовлення кормів і при зберіганні, і для яких виробничі витрати є низькими.

Крім того, більшість фітаз, описаних до теперішнього часу, лише частково гідролізує фітинову кислоту, а деякі з дуже повільною кінетикою. Більш того, їх гідролітична активність значною мірою залежить від умов їх застосування.

Завданням даної роботи полягає в розробці фітази, яка гідролізує всі фосфатні групи фітата, і активність якої мало залежить від умов застосування ферменту.

Дріжджі *Debaryomyces castellii* CBS 2923 культивують в колбах Ерленмейєра, заповнених на 1/10 їх об'єму, в аеробних умовах при 28°C, впродовж 9 годин. Далі в даному дослідженні проводили екстракцію геномної ДНК, штам культивують у присутності 500 мл середовища YPD або 20 мл середовища MSA, для подальшої ампліфікації ДНК в Штам *E. coli* XL1-Blue MRF', та гетерологічної експресії гену, що кодує фітазу в штам дріжджів *Pichia pastoris* X33, для подальшого дослідження ферменту

В ході досліджень було виявлено, що фітаза *Debaryomyces castellii* CBS 2923 представлена в SEQ ID No.2. Перевага цієї фітази полягає в тому, що вона здатна гідролізувати всі фосфатні групи фітату аж до вивільнення міоїнозиту. Вона також володіє широким спектром активності і, отже, гідролізує різні субстрати. Переважно біосинтез цієї фітази індукується фітатами навіть у відсутність солей кальцію. Переважно ця фітаза активна в розширеному інтервалі рН (рН 3-6,5) і нечутлива до катіонів або рСМВ. Цей фермент також є термостійким аж до 66°C. Таким чином, фермент за даним винаходом є вельми надійним, що є сприятливим для його застосування в кормах для тварин, а також в інших промислових застосуваннях.

Також у роботі [44] при вивченні впливу фітину на обмін речовин *Pen. chrysogenum* насамперед було встановлено, що даний гриб виробляє руйнуючий фітин фермент фітазу, оптимум активності якого розташований в зоні рН 5,4-5,6. За дві години дії ферменту відбувається відщеплення 6-10% неорганічного фосфату фітину. При введенні фітину в якості єдиного джерела фосфору в середовище для культивування було показано, що при заміні фосфату калію рівною по фосфору кількістю фітину синтез антибіотика залишається приблизно на тому ж рівні.

2.4. Особливості виділення та очистки

Очищення ферментів необхідне для вивчення їх біохімічних властивостей, а також для розуміння їх структурних та функціональних взаємозв'язків. Для очищення відносно великої кількості білкових молекул використовувались різні методи, тоді як на поділ часто впливають відмінності цільового білка та властивості інших речовин, присутніх у зразку, такі як розчинність, осад, розмір, полярність та зв'язування спорідненість до осадження сульфату амонію / ацетону / етанолу з

наступною ультрафільтрацією, іонообміном та гель-фільтраційною хроматографією.

Для очищення фітаз зазвичай використовують комбінації двох або більше методів. Більшість фітаз активні в кислих умовах рН в оптимальному діапазоні рН 2,0–6,0, але деякі грибкові фітази, наприклад, *Agaricus biosporus* та *Rhizopus microsporus var. microsporus*, належать до 5,0–8,0 та 9,5 рН відповідно. Фітази в основному активні в оптимальному діапазоні температур 37–67 °С. Різні дослідження повідомляли, що різні грибкові фітази активні в різних оптимальних умовах з урахуванням рН та температури. Грибкова фітаза, отримана від *A. niger van Tieghem*, демонструвала високий ступінь специфічної активності при оптимальному діапазоні температур 52–55 °С разом з оптимальним значенням рН 2,5. Більше того, лише кілька досліджень підтвердили, що грибкові фітази - це білки з широкою молекулярною масою, які варіюють від 14 до 353 кДа, залежно від різних штамів грибів. Етапи очищення та біохімічні властивості грибових фітаз представлені в наступних роботах та статтях[45].

Групою вчених у статті[46] проводилось виділення та отримання чистого ферменту фітази. Всі стадії очищення проводили при 4 °С. Неочищений фермент піддавали осадженню сульфатом амонію 80% який повільно додавали до неочищеного екстракту протягом 30 хв при 4 °С при постійному повільному перемішуванні. Осаджений білок збирали центрифугуванням при 10000 об/хв протягом 15 хв на охолоджуючій центрифугі, потім супернатант відкидали і використовували відповідну кількість (0,02 М, рН 7,2) HCl-буфера для ресуспендування осаджувача. Ресуспендований білок нейтралізують за допомогою мішка для діалізу протягом 24 год, а потім завантажують на (1,5x30 см) очистну колонку зі швидкістю потоку 30 мл / год. Білки елюють з використанням градієнта 0,1-1,0 М NaCl у (0,02 М, рН 7,2) трис-HCl-буфері фракції, що виявляли активність до фітази, об'єднували та концентрували, використовуючи поліетиленгліколь ПЕГ 20000, і концентрат завантажували на (1,5x50 см) Сефакрил S-200, попередньо збалансований (0,2 М, рН 5,5) ацетатним буфером зі швидкістю потоку 30 мл / год.

Білки елюювали тим же буфером, фракції з активністю фітаз збирали і використовували для подальших експериментів.

Вчені[47] екстрагували фітазу в 0,25 моль/л ацетатного буфера, що містить 0,05% Тритон Х-100 (мас. / Об.) і 0,05% сироваткового альбуміну (мас. / Об.), проводиться осадження при рН 5,0 за горизонтального струшування протягом 30 хвилин у присутності льоду. Після екстракції зразок центрифугують при 2000 об/хв протягом 10 хвилин при 4 ° С і збирали супернатант для визначення ферментної активності.

У роботі вчених[48] супернатант, отриманий центрифугуванням культурального бульйону при 12000 об / хв протягом 20 хв, використовували як джерело ферменту. Очищення фітази послідовно проводили осадженням $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ потім, аніонообмінною колонковою хроматографією DEAE-сефароза та колоночною хроматографією Sephadex G-100. Ступінь очищення фітази з вищезазначених трьох етапів становили 2, 10 та 44 відповідно. Відповідні показники відновлення загальної активності фітази становили 49, 6 та 5,7% відповідно. Після етапу хроматографії виключення розмірів Sephadex G-100 була присутня лише одна білкова смужка з розрахунковою молекулярною масою 43 кДа. Цей результат вказує на те, що отримана фітаза є електрофоретично чистою і може бути використана для аналізу ферментативних властивостей.

У статті[49] екстракцію сирого ферменту проводили методом Гунашрі та Венкатесварана шляхом замочування запліснявілих висівок у 1: 5 мас. / Об. 0,2 М ацетатному буфері при рН 4,5. Колби витримували у роторному шейкері протягом 20 хвилин при 200 об / хв після ретельного змішування висівок з дистильованою водою. Тверді речовини відокремлювали від водного розчину фільтруванням через чисту муслинову тканину. Водний розчин центрифугували при 8944 об/хв протягом 20 хвилин при 4 ° С в охолодженій центрифугузі. Водний супернатант збирали і використовували для подальшого дослідження.

У роботі[50] подрібнений робочий матеріал вдавлювали між фільтрувальним папером та добавляли льодяну дистильовану воду для отримання тонкої суспензії. Потім центрифугували при 1200 об/хв при 15 хв. Прозорий супернатант охолоджували до 4 °С.

Групою вчених[51] суміш відокремлювали від твердої біомаси фільтруванням через фільтрувальний папір (ватман №4), потім фільтрат центрифугували при 10000 об / хв протягом 10 хв при 4 ° С.

Активність ферменту визначали в надосадовій рідині на основі реакції фітази з субстратом 7,5 ммоль L⁻¹ фітату натрію (C₆ H₆ O₂₄ P₆ Na₁₂ - Sigma-Aldrich) у забуференому середовищі та при контрольованій температурі протягом чотирьох різних інкубацій разів. Реакцію закінчували додаванням суміші трьох розчинів (21,67% азотної кислоти; 0,081 моль L⁻¹ молібдата амонію; і 0,02 моль L⁻¹ ванадата амонію) відповідно у співвідношенні 2: 1: 1 відповідно. Розроблений колір вимірювали при 415 нм. В якості еталону використовували стандартну криву фосфору (0,156-2500 мкмоль) [52]. Активність розраховували з використанням нахилу прямої лінії, отриманої в результаті аналізу з зразком (поглинання / хвилину) та нахилу прямої, що виникає із стандартної кривої (поглинання / мкмоль P). Одну одиницю активності фітази (FTU) визначали як кількість ферменту, який виділяв одну мкмоль неорганічного фосфату за одну хвилину реакції.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ФІТАЗА

3.1 Передумови виробництва ЛЗ

Фітаза (міо-інозитол гексакіс фосфат фосфо гідролази) - це особливий підклас кислих фосфатаз (КФ), що каталізує відщеплення фосфатів від фітінових кислот, основної запасної форми фосфору в рослинній їжі: злаках, бобах і горіхах[1]

Фітаза належить до групи нових органічних сполук, що містять фосфор, які широко поширені в природі. Вперше фітазна активність була виявлена в рисових висівках і в крові телят, тобто в складі різних живих організмів. Пізніше фітази були знайдені у бактерій та грибів, в тому числі дріжджів[2].

Протягом останніх років з'явилося значне поліпшення багатьох процесів, пов'язаних з фітазою та фітатом, що спричинило поглиблені дослідження нових конструкцій на основі ферментів та їх життєво важливого становища в сучасну епоху біотехнологій. Фітаза визнана потенційним кандидатом для цілого ряду біомедичних, фармацевтичних та нутрицевтичних застосувань. У цьому контексті багато вчених по всьому світу ілюструють різні біомедичні застосування фітази. Серед них багато біомедичних та біотехнологічних застосувань фітази, які ще не повністю розглянуті.

Фітинова кислота заслуговує особливу увагу вчених навпроти останніх років, через те що вона не може засвоюватись в організмі людини. Фітати містяться в рослинній їжі, особливо в зернових, насінні, горіхах, бобових, і навіть сирих неферментованих какао-бобах і какао-порошку, а також кавових зернах утворюючи нерозчинні сполуки з мінеральними речовинами, перешкоджаючи їх всмоктуванню в кишечнику [54].

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Роздобудько В.В.</i>			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ФІТАЗА	<i>Літ.</i>	<i>Аркушів</i>	<i>Арк.</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					121	36
<i>Консультант</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

За останні кілька років як фітаза, так і фітат зайняли особливе місце в біомедичному секторі. Багато моногастральних тварин страждають відсутністю або низьким рівнем активності фітази у своїх шлункових трактах, тому не можуть перетравити або мінералізувати частину фітату, доступну в їжі.

Окислення, будучи шкідливим механізмом, спричиняє значну втрату харчової цінності продуктів. Деякі продукти з високим вмістом ненасичених жирних кислот і заліза схильні до цього процесу окислення. При низькому відсотку кисню (<1%) реакція окислення може продовжувати, і це може призвести до небажаних змін смаку, кольору, втрати харчової цінності та псування продуктів. Додавання антиоксидантів мінімізує наслідки реакції окислення. У зв'язку з цим фітаза є одним із природних антиоксидантів. З 22 безпосередньо доступних хелаторів заліза, фітаза є єдиним нетоксичним антиоксидантом у харчових продуктах [55].

Фітази також мають властивість протипухлинного засобу. В дослідженнях [56] фітаза показала інгібуючий вплив проти раку товстої кишки людини HT-29. Крім того, фітаза має потенціал в обмежуванні проліферації клітин раку молочної залози, раку шийки матки та рак простати. Зростання таких злоякісних пухлин як мезенхімальна пухлина, мишача фібросаркома і рабдоміосаркома людини була зменшена за допомогою фітази.

Ішемічна хвороба серця є провідним джерелом захворюваності та смертності в індустріальних країнах. Було встановлено, що приблизно 30% усіх смертей у Сполучених Штатах пов'язані з цією хворобою [57]. Аналіз показує, що існує зв'язок з підвищеним рівнем холестерину в плазмі, призводить до гіперхолестеринемії. Особливо дієти, багаті клітковиною та фітином, мають захисний ефект, зменшуючи відношення цинку до міді, яке всмоктується з кишкового тракту, оскільки фітинова кислота переважно зв'язується з цинком, а не з міддю і, отже, можна зробити висновок, що фітинова кислота призведе до зменшення всмоктування цинку без впливу на поглинання міді.

Фітазу також досліджували на предмет її антивірусної дії проти вірусу імунодефіциту людини *in vitro*.

Було помічено, що фітаза повністю пригнічує в клітинах МТ-4, цитопатичну дію вірусу імунодефіциту людини[58]. Хоча механізми дії фітази досі незрозумілий можна лише констатувати, що він діє на ВІЛ-1 під час ранньої реплікативної стадії. Неможливо виділити фітазу самостійно як анти-СНІД ліки.

Карієс зубів вважається найпоширенішим захворюванням у світі. Епідеміологічні дослідження показали, що у західних країнах спостерігається значно більша поширеність карієсу, що супроводжується харчовими звичками у західній культурі. Це припущення, призвело до гіпотези про зменшення засвоюваності кальцію, фосфору та фтору, які з'єднуються у нерозчинні комплекси з фітиноювою кислотою [59]. Лікувальна дія фітази в даному випадку полягає у збільшенні біодоступності мінералів, що призводить до кращого захисту зубів.

Дефіцит мікроелементів є основною проблемою охорони здоров'я в усьому світі. У всьому світі, таким недугом страждає 1,62 мільярда людей, з яких понад 500 мільйони - жінки репродуктивного віку і близько 600 мільйонів - це діти [60].

Немовлята як і люди похилого віку є найбільш вразливішою групою, і їх розвиток та життєдіяльність часто починає порушуватись при недостатці важливих мікроелементів.

У цей період розвитку завдяки швидкому зростанню організму, з'являється дефіцит заліза. Це призводить до залізодефіцитної анемії та її супутніх патологій, включаючи порушення когнітивних функцій і психомоторний розвиток, що в дорослому житті відзначається на зниженні працездатності людини.

Під час вагітності дефіцит заліза значно збільшує ризик материнської та перинатальної смертності[61]. Дефіцит цинку також виявляється широко поширеним, та збільшує ризик несприятливих наслідків вагітності та затримки росту. Однак докази, що пов'язують дефіцит цинку з когнітивними та фізичний

розвиток є дещо непослідовним через відсутність надійних біомаркерів для індивідуального статусу цинку.

Дієти в країнах, що розвиваються, зазвичай одноманітна, та основана на рослинній основі, що містить мало або взагалі не містить продуктів тваринного походження. Використання мінеральних речовин з таких дієт є неефективним, оскільки їх біодоступність низька через наявність інгібіторів поглинання, такі як фітинова кислота. Це також стосується вегетаріанських і, ще більшою мірою, веганських дієт в індустріальних країнах.

На щастя, фітаза благотворно впливає на засвоєння мікроелементів з продуктів, багатих фітатами в рази збільшуючи їх біодоступність завдяки ферментації фітинової кислоти та вивільненню мінеральних макроелементів.

Останнім часом у науковій медичній літературі значна увага приділяється дефіциту цинку в харчуванні населення. Відомо, що цинк входить до складу більше ніж 200 ферментів та здійснює значний вплив на фундаментальні життєві процеси: кровотворення, функціонування нервової та репродуктивної систем, ріст і розвиток організму, обмін білків, жирів та вуглеводів. Він також підвищує стійкість організму до інфекцій та сприяє підвищенню імунітету. Тому дефіцит цього мікроелементу в харчуванні людини, який поглиблюється з кожним роком, безпосередньо загрожує здоров'ю населення різних країн і, насамперед, дітей. Ця проблема набула світового значення[62].

Ще однією групою ризику, здоров'я якої система яких уже працює не ідеально та забезпечення поживними речовинами для них є важливою складовою повноцінного життя, є люди похилого віку. Ми знаємо, що імунна система у похилому віці функціонує вже не так добре і що для здатності організму працювати злагоджено йому, потрібні різні добавки.

Добавка в склад якої входить фітаза, буде покращувати засвоєння мікроелементів, та розщеплювати фітати, які і утворюють з ними нерозчинні комплекси. Фітаза - найважливіший фермент для дієти, охорони навколишнього

середовища та людини серед останніх двох десятиліть. Фітази можна отримувати з рослин, тварин та мікроорганізмів. Однак ті, що мають мікробне походження, є найбільш важливими для біотехнологічних застосувань. Фітаза в дієтах призводить до збільшення поглинання мінеральних речовин. Його споживання забезпечує захист від діабету, атеросклерозу, запобігає утворенню ниркових каменів та серцевим захворюванням, фітази показують корисні результати у формі, разом із безпекою проти поширення більшості видів раку. Також фітаза може діяти як противірусний засіб. [77]

Такого висновку доходить і Федеральний інститут оцінки ризиків (BfR), який рекомендує людям похилого віку та особам із хронічними хворобами вживати добавки, які покращують засвоєння макроелементів в організмі. Особливо у випадку, коли ці особи потребують стороннього догляду. На мою думку, на тлі пандемії COVID-19 це питання набуває особливого значення, так як у багатьох дослідженнях було зазначено про підвищення дієздатності від фітази.

В Україні громадянами похилого віку визнаються особи, які досягли пенсійного віку, встановленого статтею 26 Закону України "Про загальнообов'язкове державне пенсійне страхування" , а також особи, яким до досягнення зазначеного пенсійного віку залишилося не більш як півтора року.

В Україні, як і в багатьох розвинених країнах, в останні десятиріччя значно зросла частка людей похилого віку. До старшого покоління сьогодні належить кожний п'ятий. Україна входить до 30 «найстаріших» країн світу, спостерігається досить тривожна тенденція зі зростанням кількості людей похилого віку. У 2007 році частка людей пенсійного віку досягла 23,9%, або понад 11 млн осіб, і за рейтингом старіння (часткою населення старше 65 років) Україна займала 11 місце у світі, а в 2025-му переміститься на 9-те місце. Згідно з національним демографічним прогнозом на період до 2025 року частка осіб віком від 60 років становитиме 25%, а у 2030 році – понад 26% . В Україні за даними 2020 року налічується 7 млн громадян віком від 65 років. За даними Держкомстату України, кожен 5 мешканець нашої країни – це особа похилого віку.

3.2 Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ

Ринок бадів з фітазами є доволі перенасиченим, але всі його представники виробляються за кордоном та через це мають високу ціну та доволі невисокий попит. Завдянням даного проекту є розроблення аналогу зарубіжного бадів, що за вітчизняного виробництва буде мати набагато меншу ціну.

Відомого, що кількість очищеного ферменту фітази в препараті має становити 10мг. За даними досліджень при ступені очищення П 10х, фітаза має активність 5000ОД/г.[96], отже когцентрація одиниць активності на одну капсулу складає:

$$5000 - x$$

$$1000 - 10$$

$$X = 50000/1000$$

$$X = 50 \text{ ОД активності}$$

3.3 Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.

Курс лікування таблетками для людини похилого віку складає по 2 таблетки в день протягом місяця. Потужностями виробництва будуть вироблятися ліки для 1% похилого населення України (70 000 осіб):

$$70\,000 \times 60 = 4\,200\,000 \text{ таблеток}$$

В одній таблетці Фітази міститься 50 ОД фітази, отже загалом потрібно буде продукувати:

$$4\,200\,000 \times 50 \text{ ОД} = 210\,000\,000 \text{ ОД фітази}$$

Враховуючи те, що при очистці ферменту, загальні втрати ферменту будуть складати 50%, загалом потрібно буде 420 000 000 ОД фітази (84 кг очищеного ферменту).

Даний фермент продукується штамом *Neurospora sitophila*. Концентрація ферменту в кінці культивування складає 8,3 ОД/мл, отже щоб задовольнити потребу

у виробництві фітази, загальна кількість культуральної рідини для біосинтезу складатиме:

$$8300 \text{ ОД} - 420\,000\,000$$

$$1 \text{ л} - X \text{ л}$$

$$X = 50,6 \text{ м}^3$$

Враховуючи сумарні втрати при виділенні (10-15 %), загальна кількість культуральної сировини буде становити: $50,6 \times 1,15 = 58,2 \text{ м}^3$.

3.4 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для розрахунку потреби потужності виробництва ферменту фітаза, необхідно визначити кількість культуральної сировини, яка буде продукуватись на добу. Прийmemo, що для даного виробництва необхідно 100 робочих днів на рік. Інший час обладнання може бути використаним для аналогічного виробництва. Тому кількість культуральної сировини на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 58,2 / 100 = 582 \text{ л}$$

Тоді кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{ц} = (K_1 \times V_d \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 582 \times 106) / 24 = 2,8 \text{ м}^3 / \text{цикл},$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (96 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість виробничих циклів буде становити:

$$N_{ц} = 58,2 / 2,8 = 20,7 \approx 21 \text{ цикл}$$

2,8 м³ культуральної рідини можна отримати у ферментері, об'єм якого буде становити:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 2,8 / 0,5 = 5,6 \text{ л}$$

де $K_{\text{зап}}$ — коефіцієнт заповнення ферментера.

У додатку 4 методичних рекомендацій №8484 [80] знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\Gamma\text{ф}} = 5 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап}} = V_{\text{ф}} / V_{\Gamma\text{ф}} = 2,8 / 5 = 0,56$.

3.5 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

При одержанні культуральної рідини необхідно враховувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 – 15%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 2,8 / (1 - 0,1) = 3,1 \text{ м}^3,$$

де $E_{\text{ф}}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу (10%).

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

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,5$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$), що становить:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 3,1 / 0,5 = 6,2 \text{ м}^3$$

У додатку 4 методичних рекомендацій №8484 [80] знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\text{сф}} = 6,3 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 3,1 / 6,3 = 0,49$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс.1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 3,1 / (1 + 0,1) = 2,81 \text{ мЗ},$$

де $X_{\text{ф}}$ – доза посівного матеріалу для ферментера (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм.1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс.1}} = 3,1 - 2,81 = 290 \text{ л.}$$

Для одержання 290 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм.1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 290 / (1 - 0,1) = 322 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс.2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 322 / (1 + 0,1) = 292 \text{ л,}$$

де $X_{\text{па}}$ – доза інокуляту для ферментера (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм.2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс.2}} = 322 - 292 = 30 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 322$ л можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 322 / 0,5 = 644 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 630$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.2}/V_{сф} = 322/630 = 0,51.$$

Для одержання 30 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1 - E_{па}) = 30/(1 - 0,1) = 33 \text{ л.}$$

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

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс.2} = V_{роб.2}/(1 + X_{па}) = 33/(1 + 0,1) = 30 \text{ л, де } X_{па} \text{ – доза інокуляту для ферментера (0.1).}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм.2} = V_{роб.2} - V_{пс.2} = 33 - 30 = 3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 33$ л можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом $V_{па2} = V_{роб.2}/K_{зап} = 33/0,5 = 66$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 60$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.2}/V_{сф} = 33/60 = 0,55.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм.3} = 3$ л можна одержати культивування у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{псм}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 3 / (1 + 0,1) = 2,72 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, л:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{псм}} - V_{\text{пск}} = 3 - 2,72 = 0,28 \text{ л.}$$

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмк}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 0,28 / (0,75 \times 0,2) = 20 \text{ колб.}$$

4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Фітази (міо-інозитол-гексакісфосфат-фосфогідролази) - це клас фосфатаз, які каталізують гідроліз фітатів до міо-інозиту, інозитол-фосфату та неорганічних фосфатів. Вперше фітази були ідентифіковані в статті, який знайшов фермент у рисових висівках.

На основі каталітичної функції та структури ферменту, перша та найбільш ретельно вивчена група фітаз класифікуються як фосфатази гістидинової кислоти (НАР), які були виділені з ниткоподібних грибів, бактерій, дріжджів та рослин. Фітази в основному виявляються у багатьох видів грибів та в деяких бактерій.[71]

Однак фізико-хімічні характеристики та каталітичні властивості фітаз залежать від різних штамів грибів та бактерій які служать їх джерелом. Активність та стабільність фітази залежить від різних оптимальних температур і значень рН, які варіюються від нейтральних до кислих (рН 1–6) або лужних (рН 8–14) .

Рід грибів *Aspergillus* найчастіше застосовується для виробництва фітази, через що, перше покоління комерційно доступної фітази, була отримана від *A. niger*, в 1991 році, та з тих пір застосовується для використання в різних галузях промисловості, таких як виробництво продуктів харчування для людей та кормів для тварин, а також для приготування міо-інозитолфосфату.

Фітази також використовувались для напівсинтезу пероксидази, що застосовується у паперовій та целюлозній промисловості, а також як засіб для стимулювання росту рослин в ґрунті.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Роздобудько В.В.			4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Аркушів	Арк.
Перевір.		Резніченко Ю.М.					121	47
Консультант								
Н. Контр								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

Оцінка ефективності біологічного агента буде проводитись по трьом параметрам, а саме: особливості одержання фітази, вартість компонентів для поживного середовища, вартість самого ферменту при культивуванні.

На першому етапі порівняння буде оцінена спроможність до утворення культурами фітази, його активність, час культивування, а також способи очищення культуральної рідини для одержання цільового продукту[72].

Так, в *табл. 4.1* наведено склад поживних середовищ, час культивування, активність утвореного продукту, та особливості технологічного процесу штамів грибів: *Aspergillus ficuumSGA 01*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, та *Neurospora sitophila*. Проаналізувавши дані було зроблено висновок, що всі штами мають майже однакову методику очищення ферменту що не повинно суттєво впливати на його кінцеву активність, та достовірність порівняння. Особлива увага при виборі даних біологічних агентів приділялася активності утвореного продукту та часу його культивування який складав від 0,82 до 0д/г та від 36 год та 120 год відповідно.

Особливості одержаних фітаз при культивуванні

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Активність фітази, ОД/г	Особливості процесу біосинтезу	Виділення ферменту	Використана література, рік
<i>Aspergillus ficuum</i> SGA 01	Глюкоза - 10, дріжджовий екстракт - 2,5, солодовий екстракт - 5, Агар - 20	72-96 год	0,82	Культивування в ферментері при 25°C, при рН-5,5 в анаеробних умовах	Виділення здійснюють за допомогою фільтрування ватманом №1 та подальшого центрифугування при 8944 об/хв протягом 15 хв. Оброблена робоча рідина зберігається при 4 °С для подальшого застосування.	https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/392615/

<i>Pichia pastoris</i>	4% глюкози, 0,2% дріжджового екстракту, 2% пептону, 2% NH ₂ SO ₄ , 0,05% KCl, 0,05% MgSO ₄ *7H ₂ O, 0,003% MnSO ₄ *7H ₂ O і 0,003% FeSO ₄ *7H ₂ O	36	4,1	Рекомбінантні дріжджі культивували в оптимізованому середовищі, при 30 °C і 200 об / хв	Робочий матеріал вдавлювали між фільтрувальним папером та добавляли льодяну дистильовану воду для отримання тонкої суспензії. Потім центрифугували при 1200 об/хв при 15 хв. Прозорий супернатант охолоджували до 4 °C	https://www.researchgate.net/publication/51094207_A_Thermostable_Phytase_from_Neosartorya_spinosa_BCC_41923_and_Its_Expression_in_Pichia_pastoris
------------------------	---	----	-----	---	--	---

<i>Saccharo myces cerevisiae</i>	Сечовина – 0,15% Сахароза – 2,5% Фітат натрію – 0,5%	36	0,55	Інкубують глибинним методом, при 35 ° С протягом 36 год за рН 5,5, при 150 об/хв	Суміш відокремлювали від твердої біомаси фільтруванням через фільтрувальний папір (ватман №4), потім фільтрат центрифугували при 10000 об / хв протягом 10 хв при 4 ° С.	https://doi.org/10.4061/2011/796394
--	--	----	------	---	--	---

<i>Neurospora sitophila</i>	Рисова солома – 187,5 Соева пульпа-437,5 0,03- MnSO 4 · 4H 2O NaCl-0,04	96	8,3	Ферментація проводилась глибинним методом, в аеробних умовах при 30 ° С та рН 6, 0.	Після ферментації робочу сировину змочують в дистильованій воді та перемішують в колбах при 180 об/хв протягом години, потім суспензію центрифугували при 8000 об/хв протягом 20 хв при 4 ° С.	https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/166/1/012010/pdf
-----------------------------	--	----	-----	---	--	---

Така порівняльна характеристика є неоднозначною та потребує більшої конкретики зі сторони цін на поживні середовища, яка має суттєвий вплив на ціну готового продукту, проте вона є недостатньою. Для остаточного вибору біологічного агенту будуть аналізуватись ціни поживних середовищ усіх порівнюваних штамів, які будуть показані в *табл. 4.2*.

Аналіз цін поживних середовищ

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л/кг середовища	Джерело (1, 2, 3, 4)*
<i>Aspergillus ficuum</i> SGA 01	Глюкоза - 10,	23	0,23	1
	дріжджовий екстракт - 2,5,	196	0,49	2
	солодовий екстракт - 5,	139,6	0,698	3
	Агар - 20	28	0,56	4
	Вартість 1 л середовища – 1,978 грн			
<i>Neurospora sitophila</i>	Рисова солома – 187,5	4,5	0,84	23
	Соєва пульпа-437,5	11.21	4,84	24
	MnSO ₄ · 4H ₂ O-0,03	114	0,0042	25
	NaCl-0,04	33,3	0,00132	26
Вартість 1 л середовища – 5,4 грн				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Сахароза – 2,5	15	0,0375	21
	фігат натрію – 0,5	6500	3,25	15
	Сечовина – 0,15	60	0,09	16
Вартість 1 л середовища – 3,3775 грн				
<i>Pichia pastoris</i>	глюкоза -4 г	23	0,092	1
	дріжджовий екстракт – 0,2г	196	0.0392	2

Закінчення таблиці 4.2

	Пептон – 2г	1944	3,88	27
	NH ₄ NO ₃ - 0,5 г	770	0,385	15
	0,05% KCl	1156,52	0,057826	18
	0,05% MgSO ₄ *7H ₂ O	333,6	0,017	17
	0,003% MnSO ₄ *7H ₂ O	114	0,003	20
	0,003% FeSO ₄ *7H ₂ O	228	0,006	19
Вартість 1 л середовища – 4,4802 грн				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на листопад 2020 р. 1. <https://prom.ua/p755976288-glyukoza-pishevaya.html?>; 2. <https://russian.alibaba.com/product-detail/yeast-extract-for-culture-medium-p602-1600085003782.html?spm=a2700.8699010.normalList.11.5f9974bdbWaaC5&s=p;>; 3. <https://prom.ua/p1241695694-neohmelnyj-svetlyj-solodovyj.html?>; 4. https://russian.alibaba.com/product-detail/factory-supply-agar-agar-with-cas-9002-18-0-in-stock-60827346194.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.1238ec74FgsU7g&s=p;5; 5. <https://prom.ua/p755976288-glyukoza-pishevaya.html?>; 6. [https://aliradar.com/item/32465283925-500-g-pishchevoy-natriya-fitat-antioksidant-cvet-zashchity-agenta](https://aliradar.com/item/32465283925-500-g-pishchevoy-natriya-fitat-antioksidant-cvet-zashchity-agenta;); 7. [https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-cheaper-price-cacl2-anhydrous-calcium-chloride-1600120652562.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.ce66593bFCCUzb&s=p](https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-cheaper-price-cacl2-anhydrous-calcium-chloride-1600120652562.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.ce66593bFCCUzb&s=p;); 8. [https://russian.alibaba.com/product-detail/price-for-ammonium-nitrate-nh4no3-porous-prills-for-industrial-use-99-6--1600074312689.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.9cf06f8frsnfGf](https://russian.alibaba.com/product-detail/price-for-ammonium-nitrate-nh4no3-porous-prills-for-industrial-use-99-6--1600074312689.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.9cf06f8frsnfGf;); 9. [https://russian.alibaba.com/product-detail/kcl-powder-pharmaceutical-grade-factory-price-potassium-chloride-for-sale-1600105592003.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.3319408cnZFsF5&s=p](https://russian.alibaba.com/product-detail/kcl-powder-pharmaceutical-grade-factory-price-potassium-chloride-for-sale-1600105592003.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.3319408cnZFsF5&s=p;); 10. [https://russian.alibaba.com/product-detail/mgso4-7h2o-magnesium-sulphate-heptahydrate-price-60850380001.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.cdf5190f0QjNXB](https://russian.alibaba.com/product-detail/mgso4-7h2o-magnesium-sulphate-heptahydrate-price-60850380001.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.cdf5190f0QjNXB;); 11. [https://russian.alibaba.com/product-detail/best-price-of-98-feso4-7h2o-ferrous-sulphate-green-vitriol-cas-17375-41-6-for-water-treatment-62385226300.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.8e524047EjxLj2](https://russian.alibaba.com/product-detail/best-price-of-98-feso4-7h2o-ferrous-sulphate-green-vitriol-cas-17375-41-6-for-water-treatment-62385226300.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.8e524047EjxLj2;); 12. [https://russian.alibaba.com/product-detail/cas-7785-87-7-manganese-sulfate-mnso4-mn-31-8-min-fertilizer-1600061672103.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.602653b1capmfO](https://russian.alibaba.com/product-detail/cas-7785-87-7-manganese-sulfate-mnso4-mn-31-8-min-fertilizer-1600061672103.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.602653b1capmfO;); 13. [https://russian.alibaba.com/product-detail/factory-supply-agar-agar-with-cas-9002-18-0-in-stock-60827346194.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.1238ec74FgsU7g&s=p](https://russian.alibaba.com/product-detail/factory-supply-agar-agar-with-cas-9002-18-0-in-stock-60827346194.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.1238ec74FgsU7g&s=p;); 14. <https://prom.ua/p755976288-glyukoza-pishevaya.html?>; 15. [https://aliradar.com/item/32465283925-500-g-pishchevoy-natriya-fitat-antioksidant-cvet-zashchity-agenta](https://aliradar.com/item/32465283925-500-g-pishchevoy-natriya-fitat-antioksidant-cvet-zashchity-agenta;); 16. [https://russian.alibaba.com/product-detail/price-for-ammonium-nitrate-nh4no3-porous-prills-for-industrial-use-99-6--1600074312689.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.9cf06f8frsnfGf](https://russian.alibaba.com/product-detail/price-for-ammonium-nitrate-nh4no3-porous-prills-for-industrial-use-99-6--1600074312689.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.9cf06f8frsnfGf;); 17. [https://russian.alibaba.com/product-detail/mgso4-7h2o-magnesium-sulphate-heptahydrate-price-60850380001.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.cdf5190f0QjNXB](https://russian.alibaba.com/product-detail/mgso4-7h2o-magnesium-sulphate-heptahydrate-price-60850380001.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.cdf5190f0QjNXB;); 18. [https://russian.alibaba.com/product-detail/kcl-powder-pharmaceutical-grade-factory-price-potassium-chloride-for-sale-1600105592003.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.3319408cnZFsF5&s=p](https://russian.alibaba.com/product-detail/kcl-powder-pharmaceutical-grade-factory-price-potassium-chloride-for-sale-1600105592003.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.3319408cnZFsF5&s=p;); 19. [https://russian.alibaba.com/product-detail/best-price-of-98-feso4-7h2o-ferrous-sulphate-green-vitriol-cas-17375-41-6-for-water-treatment-62385226300.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.8e524047EjxLj2](https://russian.alibaba.com/product-detail/best-price-of-98-feso4-7h2o-ferrous-sulphate-green-vitriol-cas-17375-41-6-for-water-treatment-62385226300.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.8e524047EjxLj2;); 20. <https://russian.alibaba.com/product-detail/cas-7785-87-7-manganese-sulfate->

[mnso4-mn-31-8-min-fertilizer-1600061672103.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.602653b1capmfO;](https://www.olx.ua/obyavlenie/prodam-sahar-optom-kachestvo-otlichnoe-IDJTp0J.html#4cbbddad41;promoted) 21. [https://www.olx.ua/obyavlenie/prodam-sahar-optom-kachestvo-otlichnoe-IDJTp0J.html#4cbbddad41;promoted;](https://www.olx.ua/obyavlenie/prodam-sahar-optom-kachestvo-otlichnoe-IDJTp0J.html#4cbbddad41;promoted) 22. https://natfood.com.ua/zernovye-i-bobovye/otrubi/otrubi-pshenichnye-1kg/?gclid=Cj0KCOiAnuGNBhCPARIsACbnLzrzdYPtKgd8K0Df9evjRfKkNawYKVAQd-iVvOM4FICuST_FvJUubycaAqbaEALw_wcB 23. https://russian.alibaba.com/product-detail/best-quality-rice-straw-hay-for-animal-feed-export-quality-wheat-straw-hay-bales-62459261385.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.7ada68558Pxfyu 24. <https://soevyj-istochnik.tiu.ru/p154336-okara-soevyj-farsh.html> 25. https://russian.alibaba.com/product-detail/cas-7785-87-7-manganese-sulfate-mnso4-mn-31-8-min-fertilizer-1600061672103.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_image.602653b1capmfO; 26. https://russian.alibaba.com/product-detail/Bulk-sale-sodium-chloride-anhydrous-99-1600105574244.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.70e57c45q1lkMf&s=p , 27 . <https://www.covalent.com.ua/ru/shop/urea/>

Отже з табл. 4.2 видно, що ціни за 1 л/кг середовища для культивування будуть становити: для *Aspergillus ficuum* SGA 01 - 1,978 грн, та *Neurospora sitophila* – 5,4 грн, *Saccharomyces cerevisiae* – 3,3775 грн та *Pichia pastoris* – 4,4802 грн.

На залючному етапі порівняння оцінюється умовна вартість створеного продукту та інтенсивність продукування. Штам грибів *Aspergillus ficuum* культивується глибинним методом, але має високу ціну за 1 ОД ферменту – 0,24 грн/л, в порівнянні зі штамом *Neurospora sitophila*, яка має меншу ціну – 0,065 грн/л, та більшу інтенсивність – 0,086 ОД/мл за год. Отже проаналізувавши дані, можна дійти до висновку, що найвигіднішим продуцентом є штам грибів *Neurospora sitophila*, так як за поверхневого культивування він дає, хоч і менші в порівнянні з глибинний варіантом культивування даного штаму(195,66 ОД/мл), але найкращі результати.

Аналіз умовної вартості продукту

Таблиця 4.3

	Вартість 1 л середовища, грн	Активність ферменту, ОД/мл	Умовна вартість 1 ОД ферменту, грн	Тривалість культивування, год	Кількість ОД/мл за год,
<i>Aspergillus ficuum</i> SGA 01	1,978	0,82	0,24	96	0,0085
<i>Neurospora sitophila</i>	5,4	8,3	0,065	96	0,086
<i>Pichia pastoris</i>	4,4802	4,1	1,092	36	0,114
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,3775	0,55	6,14	36	0,0152

Отже, узагальнивши всі дані, можна дійти до висновку, що штам *Neurospora sitophila* є найефективнішим продуцентом фітази для медичних цілей на даний час. Також провівши літературний огляд було зроблено висновки, що культивування саме грибів та саме поверхневим методом дає найкращі результати активності даного ферменту, але для подальшого використання у фармацевтичній

промисловості, даний тип культивування є доволі прооблематичним через високу контамінацію на етапах культивування продукту, що може в разі зменшити вихід готового продукту, та суттєво ускладнить схему очищення ферменту, який потім, навіть через дешевизну та відносно високу кінцеву активність, буде мати величезні втрати на етапі очищення.[54].

4.2 Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментеру

Neurospora sitophila - вид роду *Neurospora*, який має спори у формі смугастих нервових вен. *Neurospora sitophila* часто зустрічається у хлібобулочних виробках і завдає шкоди, так що її зазвичай називають пекарською хворобою або червоною хлібною формою. *Neurospora sithophila* також відомий як онком-гриб. У процесі бродіння *Neurospora sitophila* розмножуються і роблять продукти харчування жовто-червонуватим кольором. Якщо *Neurospora sitophila* атакує лабораторію мікології або бактеріології як забруднюючу речовину, це може становити небезпеку для культури, і її дуже важко видалити через велику кількість продукованих конідій та через їх дуже швидке зростання.

Після дослідження способу розмноження даного гриба, його було віднесено до класу аскоміцетів. Повітряні гіфи *Neurospora sitophila*, який утворює ряд міцелію, легко розпізнати за численними рожевими масами та овальними конідіями, присутніми в ланцюгах у роздвоєних конідіофорах. Цей гриб може нескінченно розмножуватися безстатевим шляхом.

Neurospora sitophila - октоспорові, гермафродитні та гетероталічні гриби. Жіноча стать представлений протоперитеціями, до яких прикріплена багатоядерна аскогонія. Аскогонія виробляє довгі гіфальні гілки, які виконують функцію трихогінів. Антеридії не виробляються. Чоловіча стать представлена мікроконідіями, які утворюються ланцюгами в мікроконідіофорах. У цього виду встановлено, що роль чоловічих статевих органів не дуже велика, і статева функція виконується особливою частиною талуму.

Neurospora, як і більшість інших представників *Sordariaceae*, є дуже швидкозростаючим організмом, але його аскоспори потребують спеціальних умов росту. Клітина гіф має багатоядерне ядро. Міцелій пігментований, кількість пігментів коливається залежно від субстрату.

Для синтезу ферменту фітаза даним видом грибів можна використовувати два види культивування: глибинний та поверхневий. В ході глибинного культивування

активність ферменту складає 8.2 ОД/ мл. В ході поверхневого культивування активність була на порядок вищою та склала 195,66 Од/мл. Цільовим продуктом культивування є вторинний метаболіт, а саме фермент фітаза. Так як даний фермент буде використовуватись в фармацевтичній промисловості, доцільніше буде використовувати глибинний метод культивування, через менший ризик контамінації на етапі культивування, яке в подальшому, спростить виділення через набагато чистіший культуральний продукт, та зменшить витрати на етапі очищення.

Біосинтез фітази буде проходити періодичним способом, що забезпечить більш краще споживання субстрату мікроорганізмами, зменшить ризики контамінації середовища та спростить технологічну схему. Також за періодичного способу культивування усувається вимивання неспожитого субстрату з ферментера, що буде підвищувати економічну доцільність біосинтезу фітази саме таким способом.

Так як даний вид грибів має дуже високу швидкість зростання, небезпека контамінації зменшується. За дотримання асептичних умов в ході початкових робіт, контамінація на стадії культивування буде майже неможливою саме через швидке розмноження даного виду.

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ

5.1 Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва .

Очищення білків — комплекс методів спрямованих на отримання чистого препарату певного білка із складної суміші, такої як клітинний екстракт. Розділити різні білки можливо на основі відмінностей у їхніх властивостях таких як молекулярна маса, розмір молекул, специфічність зв'язування з певними речовинами, а також розчинність, заряд, які залежать від температури, рН, іонної сили розчину та інших факторів. Очищення білків необхідне як для вивчення їхніх властивостей і функцій, так і для використання у промисловості, медицині і лабораторній практиці.

Джерелом для виділення і очищення білків переважно слугує біомаса культивованих клітин. Першим етапом очищення білків є приготування лізатів або клітинних екстрактів шляхом руйнування плазматичних мембран клітин та клітинних стінок. Після цього лізати можуть підлягати диференційному центрифугуванню, яке дозволяє отримати препарати збагачені потрібними субклітинними фракціями (наприклад, ядрами, мітохондріями, мікросомами тощо). Для концентрації і фракціонування білків може бути використане висолювання, позбутись від низькомолекулярних домішок можна за допомогою діалізу. Остаточне очищення відбувається застосуванням різних видів хроматографії, гель-електрофорезу, ізоелектричного фокусування або їх комбінації.

Виділення й очистка фітаз — це трудомісткий і складний процес, тому в деяких випадках ферментні препарати використовують у неочищеному вигляді: у шкіряній і хутровій промисловості ступінь очистки не впливає на якість готової продукції, в той час як у харчовій промисловості, в мікробіологічних виробництвах і особливо в медицині можуть використовуватися тільки ферменти достатньо високого, інколи граничного ступеня очистки.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Роздобудько В.В.</i>			РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Аркушів</i>	<i>Арк.</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					121	60
<i>Консультант</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Так як приклад методу очистки *Neurospora sitophila* полягає в змочуванні сировини в дистильованій воді, перемішуванні в колбах при 180 об/хв протягом години, та центрифугуванні при 8000 об/хв протягом 20 хв при 4 ° С, який підходить лише для використання в лабораторних цілях та аналізу активності, потрібно скомпонувати метод виділення та очищення фітази, який буде прийнятним для використання в харчових добавках.

Культура мікроорганізмів, вирощена поверхневим методом або культуральна рідина після глибинного культивування містять велику кількість баластних речовин: біомасу продуцента, невикористані компоненти поживного середовища, продукти метаболізму. Частка ферментів становить майже 1 % для поверхневих і не більше 0,1 % — для глибинних культур.

У сільському господарстві препарати ГЗХ широко застосовуються для обробки кормів з метою підвищення їх засвоюваності, в той час як у харчовій промисловості, в мікробіологічних виробництвах і особливо в медицині можуть використовуватися тільки ферменти достатньо високого, інколи граничного ступеня очистки.

Для отримання очищеного ферментного препарату з індексом Г10х використовують фракційне осадження ультраконцентрату культуральної рідини органічними розчинниками [80] або проводять виділення ферменту методом висолювання. Самий такого ступеню очистки буде достатньо для використання його у харчових добавках.

Препарати Г20Х застосовують у складі лікарських засобів для лікування захворювань, пов'язаних з ферментною недостатністю [79].

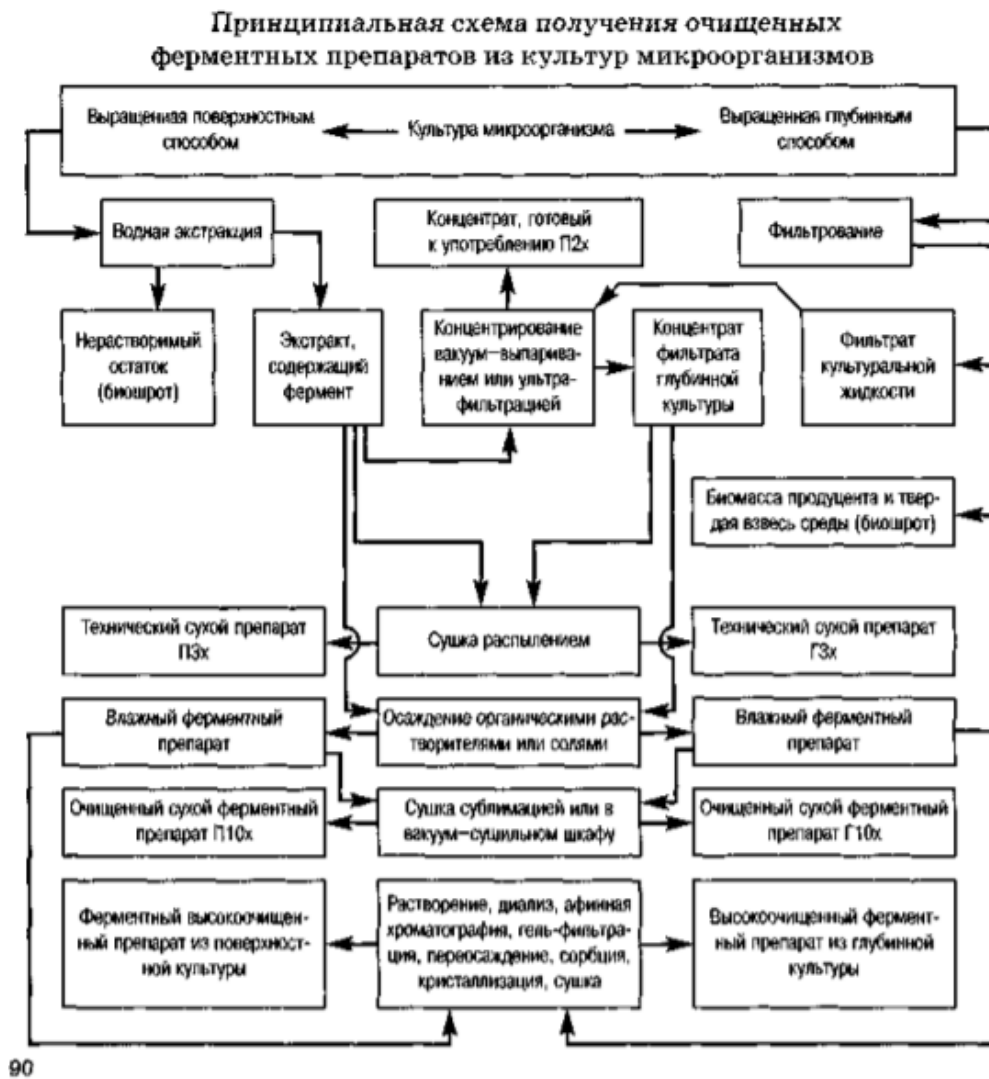


Рис.5.1 Принципова схема отримання ферментних препаратів

Для очищення відносно великої кількості білкових молекул використовуються різні методи, так як на поділ часто впливають відмінності цільового білка та властивості інших речовин, присутніх у зразку, таких як розчинність, осадження, розмір, полярність та зв'язування спорідненість осадження сульфату амонію/ацетону/етанола з наступною ультрафільтрацією, іонообміном або гель - фільтраційною хроматографією[81]. Різні варіації етапів очищення фітази з грибів представлені в *табл. 5*.

Етапи виділення та очистки грибкових фітаз

Таблиця 5

Назва виду	Етапи очищення	Активність ферменту (ОД)	Молекулярна маса (кДа)	pH опт	T ^{opt} (°C)	Км (мкМ)	Посилання
<i>Agaricus bisporus</i>	Аніонообмін, ультрафільтрація та гель-фільтрація	14,7 ОД/мг	14	5,0–8,0	> 60	-	Characterization of phytase activity from cultivated edible mushrooms and their production substrates - PubMed (nih.gov)
<i>Agrocybe</i>	Ультрафільтрація, аніонообмін	400 ОД/мг	59	5,0–6,0	50	-	Expression, Gene Cloning, and Characterization of Five Novel Phytases from Four Basidiomycete Fungi: <i>Peniophora lycii</i>, <i>Agrocybe pediades</i>, a <i>Ceriporia</i> sp., and <i>Trametes pubescens</i> (nih.gov)
<i>Aspergillus foetidus</i>	Осадження сульфатом амонію, гель-фільтрація	12,6 FTU/мг	129.6	5.5	37	-	Partial purification and characterization of phytase from <i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 11682 (nih.gov)

<i>Aspergillus ficuum</i> NTG-23	Іонообмін та гель-фільтрація	150,1 ОД/мг	65.5	1.3	67	295	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20144543/
<i>Aspergillus flavus</i> ITCC 6720	Осадження ацетону, іонообмін та ультрафільтрація	46,53 ОД/мг	30	7,0	45	-	Production, purification and characterization of neutral phytase from thermotolerant <i>Aspergillus flavus</i> ITCC 6720 - ScienceDirect
<i>B.ginsengihumi</i> м2.11	Центрифугування, лізис, центрифугування, афінна хроматографія, іонообмінна хроматографія, гель-фільтрація	19,2 ОД/мг	57	6,5	40	-	https://core.ac.uk/download/pdf/197476879.pdf
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Осадження сульфатом амонію, аніонообмінник та гель-фільтрація	0,23 ОД/мг	118	6.0	40	7200	Purification and characterization of phytase from <i>Aspergillus fumigatus</i> Isolated from African Giant Snail (<i>Achatina fulica</i>) - ScienceDirect

<i>Mucor hiemalis</i>	Ультрафільтрація, діафільтрація, іонний обмін, гель -фільтрація та гідрофобна взаємодія	46,7 ОД/мг	45	5,0–5,5	55	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17889394/
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Фракціонування ацетону, гель - фільтрація та іонний обмін	9,47 ОД/мг	-	4.5	55	150	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2856346/
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>мікроспору</i>	Іонообмін та гель - фільтрація	0,8 ОД/мг	55	9.5	65	413	Purification and characterization of an alkalistable phytase produced by <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> in submerged fermentation - ScienceDirect

Так, як фітаза у *Neurospora sitophila* являється екзоферментом, стадії виділення пов'язані з лізисом клітин, руйнуванням їх мембран та клітинних стінок неумістні і тільки будуть збільшувати кількість баластних речовин, які потрібно буде додатково очищати.

Позаклітинні ферменти одержують із культуральної рідини після сепарації, тобто після розділення культуральної рідини і біомаси мікробних білків. Інколи сепарації передуює спеціальна обробка культури - зміна рН, нагрівання, додавання коагулянтів білків для більш ефективного відокремлення біомаси і стабілізації продуктів. Є різні методи сепарації.

1. Флотація. Метод може бути використаним, якщо клітини продуцента в біореакторі накопичуються у поверхневих шарах рідини. Флотатори різних конструкцій зціджують, відкачують або зскрібають піну, яка містить мікробні клітини. Але, Використання різних лікарських засобів може легко спричинити забруднення навколишнього середовища. Також для проведення потрібен тонкий розмір шліфування. Висока вартість, багато впливаючих факторів та високі вимоги до процесу

2. Центрифугування. Метод ґрунтується на осаджуванні частин, які знаходяться у завислому стані в рідині з використанням центробіжної сили. Центрифугування вимагає більш дорогого обладнання, ніж фільтрування.

Центрифугування – це процес розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. Машини для здійснення таких операцій називаються центрифугами.

Перевагами центрифугування є:

- порівняно більша кількість затриманих та незруйнованих клітин порівняно з фільтруванням та флотацією;
- повна автоматизація процесу;
- високій фактор розділення;

- високий ступінь розділення високодисперсних систем

3. Фільтрація. Усі існуючі типи фільтрів (барабанні, дискові, стрічкові тощо) використовують один і той самий принцип - затримання біомаси на пористій фільтруючій поверхні.

Барабанні фільтри зручні для відділення не тільки біомаси продукту, але й нерозчинних суспензій, яких порівняно багато в середовищі (вичавки, висівки, макуха, паростки тощо). До недоліків фільтрів цього типу можна віднести їх порівняно низьку продуктивність, громіздкість (відношення питомої поверхні фільтрування до об'єму фільтрату невелика). У ферментній промисловості рідше використовують рамні фільтр-преси періодичної дії з ручним вивантаженням осаду. З їх допомогою можна отримувати прозорі фільтрати, але ці фільтри працюють періодично без регенерації фільтруючої поверхні. Так як шламовий простір обмежений, а шар осаду до кінця фільтрування досягає значної товщини, швидкість фільтрування падає, незважаючи на підвищення робочого тиску. При заповненні шламового простору осадом фільтр-прес відключають, розбирають і промивають або змінюють полотно, що фільтрує. Продуктивність фільтр-преса багато менше, ніж барабанного вакуум-фільтра, вона лімітується вмістом осаду в рідині, що фільтрується, і об'ємом рамного простору фільтр-преса.

Фільтрувати малі об'єми культуральної рідини можна на рамних фільтрах, великі об'єми — на барабанних вакуумфільтрах, який і буде використовуватись.

Процеси виділення очищених препаратів із поверхневих та глибинних культур дещо різні. З поверхневих культур важче отримати високоочищені препарати через велику кількість баластових речовин. З глибинних культур отримати очищені препарати трохи легше, але при цьому доводиться вести виділення з розбавлених розчинів, якщо виділення ферментів проводиться з рідкої культури. Виділення ускладнюється, якщо фермент внутрішньоклітинний, і тоді необхідно руйнувати клітини мікроорганізмів.

Екстракт із поверхневої культури або фільтрат культуральної рідини є вихідним матеріалом для отримання препаратів ферментів різного ступеня очищення. На першому етапі виділення відходом процесу є нерозчинна частина культури - біошрот, що містить нерозчинні включення середовища та біомасу продуцента. Далі залежно від властивостей виділеного ферменту та супутнього йому баласту схема очищення та отримання ферментного препарату може включати різні прийоми та методи, такі як концентрування, діаліз, осадження органічними розчинниками, солями, гель-фільтрування, афінна хроматографія, іммобілізація, сушіння термолабільних матеріалів і т. д. [83]

5.2 Обґрунтування методу виділення фітази

Очищення культуральної рідини від твердих залишків. Більшість продуцентів накопичує основну частину синтезованих ними ферментів у поживному середовищі. При отриманні очищених ферментних препаратів нерозчинну частину середовища разом з біомасою продуцента відокремлюють на фільтрах, центрифугах або сепараторах. Найбільш широко в мікробіологічній промисловості використовують комірковий барабанний вакуум-фільтр безперервної дії із зовнішньою поверхнею фільтрування. Схема роботи такого фільтра представлена на рис. 1.2 Ці фільтри мають високий ступінь механізації та дозволяють здійснювати фільтрування різних суспензій з постійною швидкістю. Барабанні вакуум-фільтри являють собою барабан, занурений у ємність, в яку безперервно подається культуральна рідина. Поверхня барабана перфорована і обтягнута тканиною, що фільтрує (батист або інша синтетична тканина аналогічного типу). Іноді за наявності в культуральній рідині осадів, що важко відокремлюються, з високими питомими опорами як фільтруючу поверхню використовують наливний шар. Знімання осаду на цих фільтрах проводиться спеціальним ножом. [84]

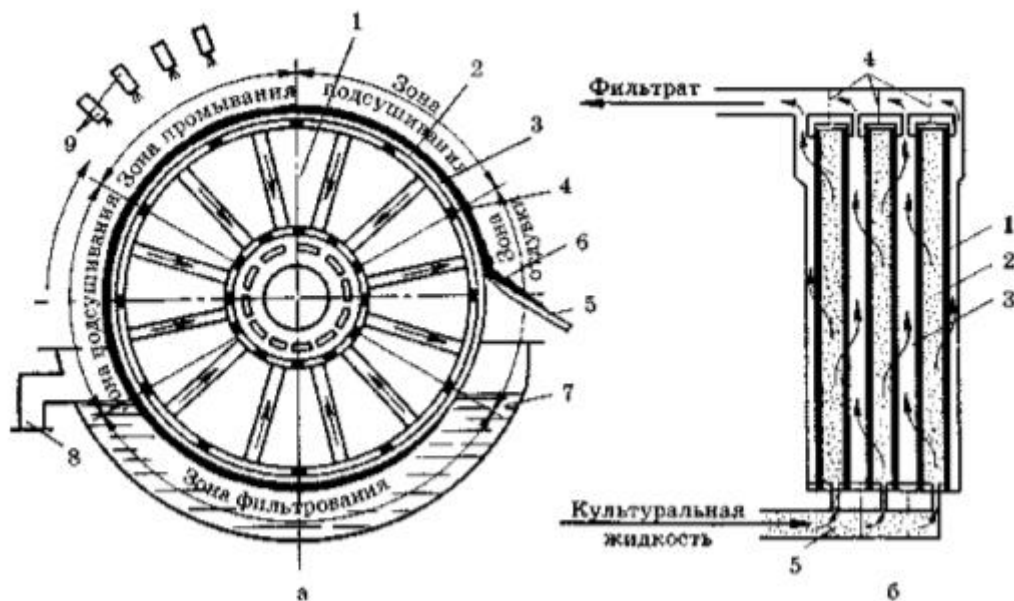


Рис.5.2 Принципова схема роботи фільтру

Мною був обраний барабанний вакуум фільтр компанії «LLC Intech GmbH.

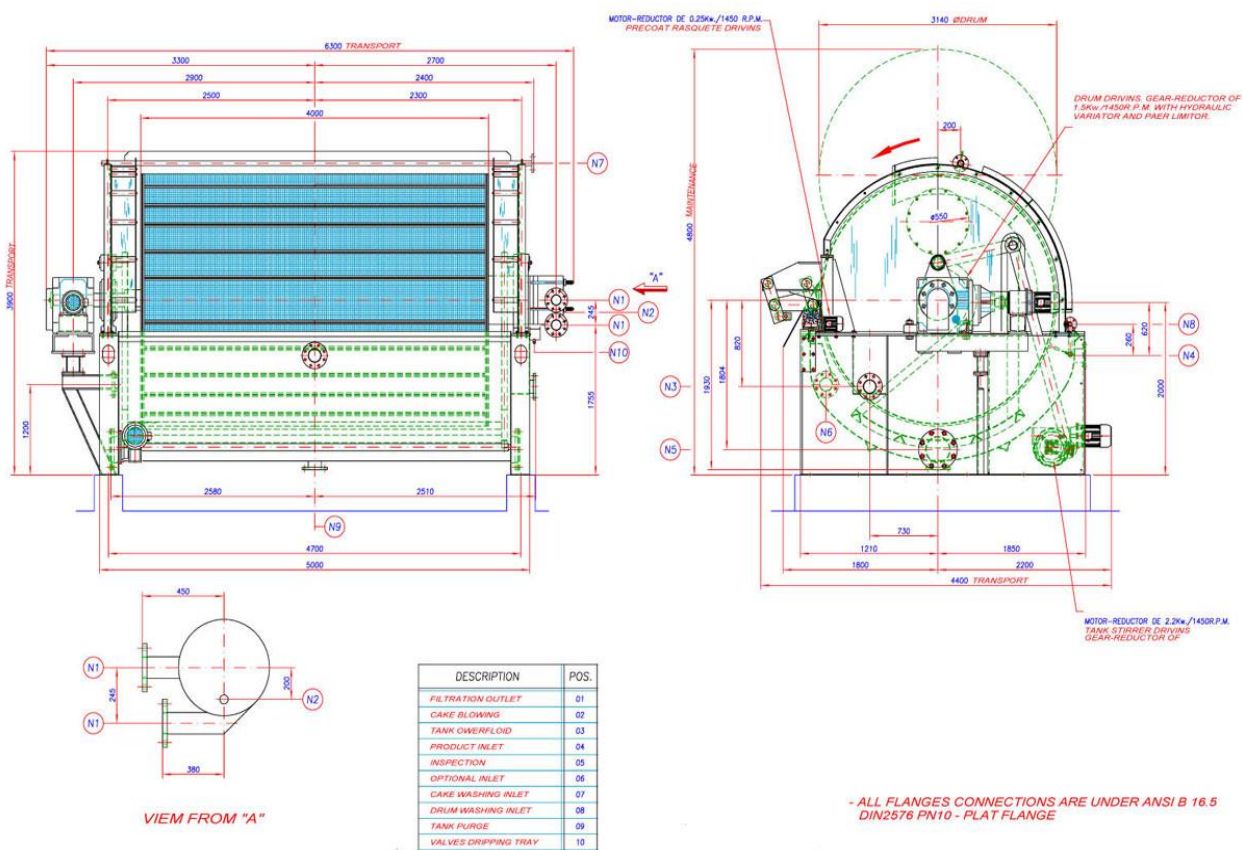


Рис.5.3 Схема барабанного вакуум фільтра

5.3 Обґрунтування методу очистки фітази

Залежно від рушійної сили процесу методи очистки білків класифікуються на дифузійні (різні концентрації з обох боків мембрани), електромембранні - електродіаліз (різниця електричних потенціалів), баромембранні - зворотний осмос, ультрафільтрація, мікрофільтрація (різниця тисків). Всі ці процеси використовуються для переробки ферментних розчинів, і вибір їх визначається метою переробки: для очищення від низькомолекулярних домішок при невеликих виробництвах – діаліз, для обезсолювання в інтенсивних умовах – електродіаліз, для глибокої очистки від домішок з одночасним концентрування – ультрафільтрація і т.д.

Для отримання очищеного ферментного препарату з індексом Г10х використовують фракційне осадження ультраконцентрату культуральної рідини органічними розчинниками або проводять виділення ферменту методом висолювання.

Діаліз - це перший вивчений та промислово розвинений мембранний процес, оскільки для його здійснення не потрібна складна апаратура та спеціальні мембрани. Сутність діалізу в тому, що якщо два розчини з різною концентрацією будь-якого компонента розділити мембраною, то розпочнеться природний процес дифузії, що досягає рівноваги при вирівнюванні концентрацій цього компонента з обох боків мембрани.

Процес діалізу стосовно очищення розчинів ферментів має ряд істотних недоліків. По-перше, за діалізу можлива «втрата ферменту в результаті вимивання іонів металів, що входять до складу молекули ферменту, або стабілізуючих ферментів сполук, або фрагментів самого ферменту, наприклад, протетичної групи його. По-друге, при діалізі за звичайної водопровідної води може відбуватися втрата активності ферменту в результаті потрапляння з води в розчин ферменту іонів металів - інгібіторів ферменту. Слід також відмітити, що в процесі діалізу одночасно з очищенням відбувається сильне розведення ферментного розчину через проникнення води під дією сил прямого осмосу в розчин, що діалізується. Об'єм продіалізованого розчину збільшується приблизно на 20-25%, а якщо врахувати, що

відбувається активне видалення баластових речовин, то в результаті діалізу одержують дуже розбавлені ферментні розчини. Тому зараз цей метод очищення ферментних розчинів від баластових речовин у ферментній промисловості майже не використовується. Цей метод іноді застосовують у лабораторних дослідженнях та при отриманні високоочищених ферментних препаратів.

Часто баромембранні методи поділу рідких сумішей відносять до процесу звичайної фільтрації, але вони лише зовні схожі завдяки тому, що рушійною силою є різниця тисків. Насправді за допомогою напівпроникних мембран поділяються справжні розчини, тобто гомогенні системи, тоді як фільтруванням можна розділити лише суспензії, тобто тверду фазу відокремити від рідкої. Разом з тим, вважаючи мембранні методи фільтруванням на молекулярному рівні, можна побудувати умовний спектр фільтрації, розмістивши мембранні методи - зворотний осмос, ванодіфільтрацію, ультрафільтрацію та мікрофільтраційну фільтрацію по порядку збільшення розміру та молекулярної маси затримуваних частинок. Сьогодні баромембранні методи набули широкого поширення в біотехнологічній, харчовій, фармацевтичній та хімічній промисловості. Зокрема, жодне сучасне виробництво ферментів не може вже обійтися без ультрафільтраційного очищення та концентрування продукту.

Отримання високоякісних вакцин, сироваток, ферментів та антибіотиків неможливе без застосування ультрафільтрації. Застосування мембран дає можливість здійснювати очищення високомолекулярних речовин від низькомолекулярних, зокрема, видалення електролітів, карбаміду, лактози та інших речовин з протеїнів розчинів. За допомогою ультрафільтрації вдається одночасно здійснювати процеси концентрування та очищення білків, гормонів, антибіотиків, ферментів тощо. При використанні ультрафільтрації не тільки збільшується вихід готового продукту та покращується його якість, а й різко скорочується кількість стадій технологічного процесу при виробництві медичних та біологічних препаратів[85].

Отже, мною був обраний метод ультрафільтрації.

5.4 Осадження ферментів

Серед багатьох методів очищення ферментів найбільшого поширення набули методи осадження органічними розчинниками та неорганічними солями. Розчинність білка визначається розподілом гідрофобних і гідрофільних залишків на поверхні молекули. Змінюючи деякі властивості білкових розчинів (температуру, іонну силу, рН, додавання нейтральних солей, водорозчинних органічних сполук або інших інертних речовин), можна вплинути на гідратний або сольватний шар і викликати агрегацію білкових молекул і випадання їх в осад[86].

Ефект осадження білків пов'язаний з тим, що в присутності органічного розчинника знижується активність води. Зі збільшенням концентрації розчинника знижується здатність води до сольватації заряджених гідрофільних молекул ферменту.

Діелектрична постійна розчинника знижується, відбувається витіснення молекул води з поверхні білкової молекули та їх часткова іммобілізація молекулою органічного розчинника внаслідок гідратації білка. Тому молекули води, розміщені на гідрофобних ділянках поверхні білка, можуть бути заміщені на молекули органічного розчинника. При цьому розчинність білків знижується, відбувається агрегування і осадження білкових молекул.

Агрегування білків відбувається під дією електростатичних і Ван-дер-Вальсових сил, що виникають між окремими білковими молекулами. Гідрофобна взаємодія, ймовірно, має менше значення в результаті впливу органічних розчинників на неполярні ділянки білкової глобули.

Фітази досить чутливі до впливу розчинників, оскільки під їх дією досить часто спостерігається часткова денатурація білка, що може призвести до порушення організації активного центру та втрати активності. Тому для виділення фітаз висолюванням потрібно уважно підібрати потрібний адсорбент.

Органічний розчинник, який використовують для осадження, повинен повністю змішуватися з водою і не зв'язуватися з ферментом. Найбільш широко для осадження ферментів використовуються етиловий спирт, ацетон і ізопропіловий

спирт. Рідше застосовуються метанол, н-пропанол, діоксан, 2-метоксиетанол і інші спирти, кетон, ефіри та їхні суміші[87].

На сьогоднішній день, для очистки білка дуже часто застосовують сульфат амонію, який і буде вибрано при оскільки він добре розчинний у воді і на більшу частину ферментів не здійснює негативного впливу, а навпаки — навіть стабілізує, і тому при роботі з ним нема необхідності проводити фракціонування білків за низької температури. Важливо, щоб сульфат амонію був високої якості і не вносив в розчин речовин, які будуть інгібувати активність білку.

5.5 Діаліз

Діаліз (метод мембранних сит) базується на нездатності білків проходити через напівпроникну мембрану на відміну від низькомолекулярних речовин. Використовують діалізну мембрану, яка є полімером і має пори певної величини. Малі молекули (низькомолекулярні домішки) проходять через пори в мембрані, а крупні (білки) затримуються. Таким чином білки відмивають від низькомолекулярних домішок, наприклад, від солей після висолювання.

Під час діалізу використовують напівпроникні мембрани (целофан, колодійна плівка), через які білки не дифундують і залишаються усередині діалізного мішечка (рисунок 5.4). Дрібніші молекули проходять через пори діалізної мембрани і виходять в діалізат, так як в процесі дифузії молекули намагаються перейти в зону з більш низькою їх концентрацією. Замінюючи декілька разів водну фазу в діалізаті на дистильовану воду, можна знизити концентрацію низькомолекулярних сполук в розчині білка до скільки завгодно малої величини[87].

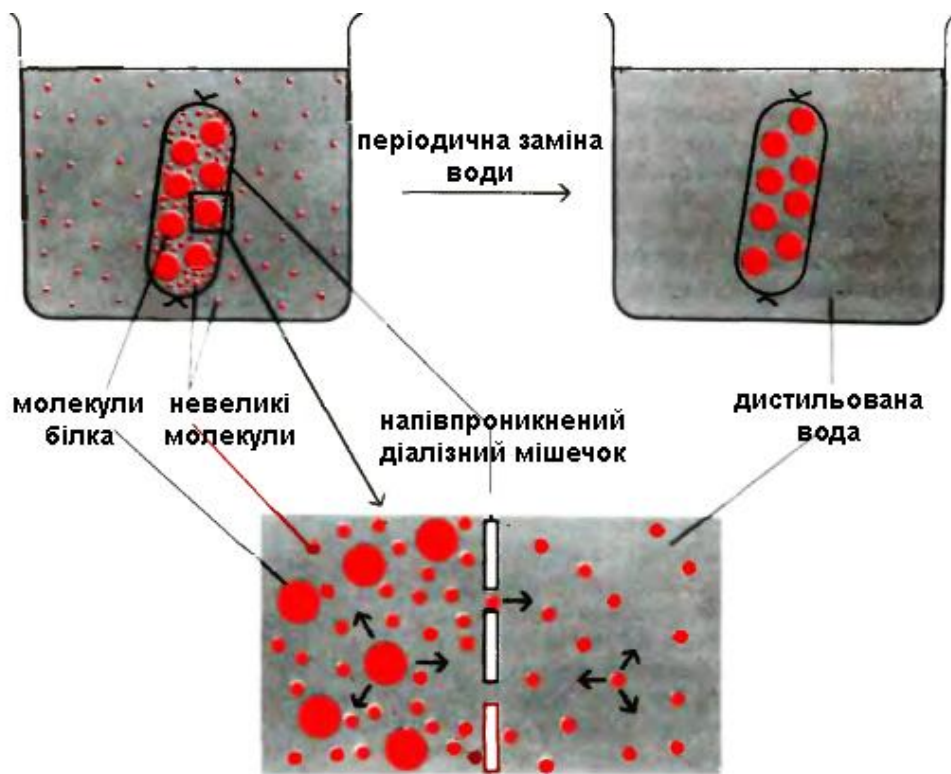


Рисунок 5.4 – Діаліз

5.6 Обґрунтування методу концентрування продукту

Сушка ферментних препаратів має на меті отримувати стабільний при зберіганні препарат. Для обезвожування ферментних розчинів використовують вакуумне-сушіння або сушку у розпилювальній і сублимаційній сушарках.

Вакуум-висушування. У вакуум-сушильних шафах процес зменшення вологи проводиться тонким шаром (приблизно 0,5см), при температурі приблизно 30 ° С та тиску приблизно 136 Па.

Використовувати таке обладнання доцільно тільки на підприємствах з невеликою продуктивністю. Також, в таких сушарках можлива велика інактивація ферментів через те, що на вальці подається обігрів паром з температурою до 150 ° С, і навіть мінімальна тривалість контакту продукту з паром дає до 12-15% втрати активності ферментами. Шар продукту на вальцях невеликий: від 0,1 до 1 мм. Осад висихає за один оборот барабану і знімається з поверхні барабана ножами.

У розпилювальній сушарці ферментний осад висушують за температури теплоносія на вході в сушарку 160 °С і на виході 60—75 °С. Режимі сушіння

забезпечують досягнення 8 % вологості матеріалу. На цій стадії втрати матеріалу становлять 5—8 %[93].

Сублімаційне сушіння. Цей процес для ферментних препаратів ведуть при глибокому вакуумі. Матеріал в початкових стадіях сушки віддає частину вологи, охолоджується і заморожується.

Сублімаційне висушування відбувається в субліматорі у три фази: самозаморожування, сублімація і видалення залишкової вологи випарюванням. Самозаморожування відбувається при інтенсивному випаровуванні частини вологи і безперервно зростаючому вакуумі. З матеріалу за період випаровування видаляється 10—15 % вологи, при цьому частина капілярної і осмотично зв'язаної. В процесі сублімації видаляється 40—50 % вологи і більше. В період випаровування залишкової вологи швидкість висушування весь час знижується, а температура підвищується. Висушений осад розтирається в порошок у кульових млинах, молоткових дробарках або дисмембраторах

Зазвичай процес сублімації сушіння починається з заморожування по поверхні продукту при температурі мінус 20-30 ° С. Швидкість заморожування термолабільних матеріалів істотно впливає на активність ферментів і інших біологічно активних речовин.

З матеріалу за період випаровування видаляється 10—15 % вологи, при цьому частина капілярної і осмотично зв'язаної. В процесі сублімації видаляється 40—50 % вологи і більше. В період випаровування залишкової вологи швидкість висушування весь час знижується, а температура підвищується. Висушений осад розтирається в порошок у кульових млинах, молоткових дробарках або дисмембраторах. При висушуванні в сублімаційних сушарках ферменти практично не інактивуються.

Незважаючи на переваги цих сушильних апаратів, все ж втрати активності досить великі і часто висушений препарат треба досушувати, що ще збільшує втрати.

Тому в даний час створилася стійка тенденція випускати стабільні рідкі ферментні препарати у вигляді концентратів або використовувати для сушки сублімаційні сушарки.

Отже, проаналізувавши методи висушування, найдоцільніше використовувати метод сублімаційної сушки, так як при даному методі активність ферменту практично не знижується.

5.7 Обґрунтування вибору лікарської форми

Пероральний прийом лікарських засобів та інших добавок є найприроднішим та найбільш поширеним способом введення ліків. Перорально застосовують близько 75 % ліків, які мають здатність всмоктуватися у шлунково-кишковому тракті протягом 1-3 годин. Пероральний шлях застосування є одним із видів ентерального шляху введення лікарських засобів.

Перевагами перорального застосування є проходження препарату або добавки та їх метаболітами перед всмоктуванням у кров двох природних бар'єрів — слизової оболонки шлунково-кишкового тракту та печінки, на мембранах яких проходить вибіркова фільтрація речовин, що потрапляють у організм. Окрім цього, цей спосіб введення лікарських речовин є найбільш фізіологічним, простим — не потребує допомоги медичного персоналу, та має меншу кількість побічних ефектів, які можуть спостерігатися при парентеральному застосуванні лікарських засобів. При пероральному застосуванні всмоктування препарату відбувається повільніше, чим при парентеральному застосуванні, що також зменшує кількість побічних ефектів ліків. Частина препаратів для перорального застосування, що погано всмоктуються у шлунково-кишковому тракті, використовуються для місцевої дії у просвіті шлунково-кишкового тракту (протиглистні засоби, частина антибактеріальних, протигрибкових, антацидних засобів), що також зменшує ймовірність системних побічних ефектів цих препаратів[95].

В нашій країні набули подальшого розвитку різні види упаковки. Для збереження якості готових лікарських засобів застосовується первинна та вторинна упаковка. Головний вплив на добавку має первинна упаковка, так як вона

безпосередньо контактує з лікарським засобом. В залежності від виду лікарської форми використовують різні види пакувальної тари та дизайн її маркування. Основними функціями маркування первинної упаковки є інформаційна, ідентифікаційна, мотиваційна та емоційна. Маркування добавок повинно відповідати вимогам міжнародних та вітчизняних стандартів, бути чітким, наочним, однозначним і достовірним. Маркування дозволяє споживачеві мати повну інформацію про виробника та сам лікарський засіб.

Тверді лікарські форми, БАДи та добавки складають приблизно 70% від загального випуску готових лікарських засобів. Таблетки пакують в саму різноманітну тару, в тому числі в паперову (конвалют), скляну (банки і флакони), металеву (пробірки, пенали) та ін. Найбільш перспективною вважається контурно-чарункове пакування (блістери). Окремо необхідно згадати саше. Пакування дозованих порошків оснащуються різними по конструкції пристосуваннями для дозованої подачі. В основному вони випускаються іноземними фірмами і являють собою двокамерну систему, що складається із зовнішньої закритої камери, сполученої з порожниною ємності, в якій розміщений порошок чи гранули, і внутрішньої дозованої камери. Дана лікарська форма – саше, дозується у пакети різного розміру і форми з фольгоплену.

Блістери - це контурно-чарункове пакування, яке виконане з полімерної плівки та фольги алюмінієвої, і має форму близьку до форми таблетки. Основна частина капсул чи таблеток пакуються тільки таким чином. Блістери виготовляють з полімерної плівки, яка, як правило, утворює достатньо жорсткий каркас. Завдяки таким властивостям вона захищена від механічних пошкоджень, потрапляння вологи і забруднень. Матеріали для виготовлення полімерної плівки можуть бути різні: поліпропілен, поліетилен, полівінілхлорид, полівінілденхлорид та ін., що дає простір для оптимального рішення в залежності від результатів вивчення стабільності ГЛЗ [96]. Основною перевагою блістерних упаковок є надійність та висока герметичність.

Отже, для даного лікарського препарату була обрана раціональна лікарська форма – таблетки в блістері.

За способом отримання розрізняють два класи таблеток:

1. Пресовані, одержувані шляхом пресування лікарських порошків на таблеткових машинах із різною продуктивністю. Цей метод є основним.

2. Формовані або тритураційні таблетки, одержувані формуванням маси, що таблетується. Вони становлять приблизно 1-2% від обсягу виробництва таблеток. Тритураційні таблетки містять невеликі дози лікарських та розбавляючих речовин: маса їх може становити до 0,05 г.

Таблетки класифікують також за конструктивною ознакою:

1. За складом: прості (однокомпонентні) та складні (багатокомпонентні).

2. За структурою будівлі: каркасні, одношарові та багатшарові (не менше 2 шарів), з покриттям або без нього.

Каркасні (або скелетні) пігулки мають нерозчинний каркас, порожнечі якого заповнені лікарською речовиною. Окрема таблетка є як би губкою, просоченою ліками. При прийомі каркас її не розчиняється, зберігаючи свою геометричну форму, а лікарська речовина дифундує у шлунково-кишковий тракт.

Одношарові таблетки складаються з пресованої суміші лікарських та допоміжних речовин та однорідні по всьому обсягу лікарської форми.

У багатшарових таблетках лікарські речовини розташовуються пошарово. При застосуванні у багатшарових таблетках хімічно несумісних речовин це зумовлює мінімальну їхню взаємодію.

3. За характером покриття: дражоване, плівкове та пресоване сухе покриття.

Форми таблеток, що випускаються хіміко-фармацевтичною промисловістю – найрізноманітніші: циліндри, кулі, куби, трикутники, чотирикутники та ін. Найпоширенішою є плоскоциліндрична форма з фаскою та двоопукла форма, зручна для ковтання. Крім того, пуансоні і матриці для виробництва таблеток простіші і не викликають особливих труднощів при їх встановленні на таблеткові машини.

Більшість існуючих фасувальних та пакувальних автоматів також пристосовано для роботи з плоскоциліндричними та двоопуклими таблетками.

Плоскоциліндрична без фаски форма таблеток для виробництва не рекомендується, тому що при розфасовуванні та транспортуванні спостерігається руйнування гострих країв таблеток, внаслідок чого втрачається їх товарний вигляд.

Розмір пігулок коливається від 4 до 25 мм у діаметрі. Пігулки діаметром понад 25 мм називаються брикетами. Найбільш поширеними є пігулки діаметром від 4 до 12 мм. Таблетки діаметром більше 9 мм, мають один або два ризики, нанесені перпендикулярно одна одній, що дозволяють розділити таблетку на дві або чотири частини та, таким чином, варіювати дозування лікарської речовини.

Маса таблеток, в основному, становить 0,05-0,8 г, що визначається дозуванням лікарської речовини та кількістю допоміжних речовин, що входять до їх складу.

Таблетки каркасні – це таблетки з безперервним, рівномірно продовженим вивільненням і вивільненням, що підтримує дію лікарських речовин.

Для їх отримання використовують допоміжні речовини, що утворюють сітчасту структуру (матрицю), в яку включено лікарську речовину. Така таблетка нагадує губку, пори якої заповнені розчинною лікарською речовиною. Вона не розпадається в шлунково-кишковому тракті. Залежно від природи матриці вона може набухати і повільно розчинятися або зберігати свою геометричну форму протягом всього перебування в організмі і виводиться незмінно у вигляді пористої маси, в якій пори заповнені рідиною.

Каркасні таблетки відносяться до препаратів пролонгованої дії. Лікарська речовина з них вивільняється шляхом вимивання. При цьому швидкість її вивільнення не залежить ні від змісту ферментів в навколишньому середовищі, ні від величини її рН і залишається досить постійною у міру проходження таблетки через шлунково-кишковий тракт. Швидкість вивільнення лікарської речовини визначають такі фактори, як: природа допоміжних і розчинність лікарських речовин,

співвідношення ліків, які утворюють матрицю речовини, пористість таблетки і спосіб її отримання.

Допоміжні речовини для утворення матриць підрозділяють на гідрофільні, гідрофобні, інертні і неорганічні: – гідрофільні матриці – з полімерів, що набухають (гідроколоїдів): гідроксипропіл Ц, гідроксипропілметил Ц, гідроксиетилметил Ц, метил-метакрилат та ін.; – гідрофобні матриці - (ліпідні) - з натуральних восків або з синтетичних моно, ди-і тригліцеридів, гідрогенізованих рослинних олій, жирних вищих спиртів та ін.; – інертні матриці - з нерозчинних полімерів: поліетилен, поліметил-метакрилат та ін. Для створення каналів в шарі полімеру, нерозчинного у воді, додають водорозчинні речовини (ПЕГ, ПВП, лактоза, пектин та ін.). При їх вимиванні з каркаса таблетки, створюються умови для поступового виділення молекул лікарської речовини. Для отримання неорганічних матриць використовують нетоксичні нерозчинні речовини: Ca_2HPO_4 , CaSO_4 , BaSO_4 , аеросил та ін.

Каркасні таблетки отримують прямим пресуванням суміші лікарських і допоміжних речовин, пресуванням мікрогранул чи мікрокапсул лікарських речовин як на звичайному типі таблеткових машин, так і на таблеткових машинах для отримання багатошарових таблеток, в яких матричний стіл триразово подається під насипні воронки, що заповнюють матриці гранулами різного складу.

Отже, при виробництві буде використовуватись метод каркасної структури таблетки в склад якої буде входити лактоза як допоміжна речовина активний фермент та кальцію сульфат в якості каркасц. Такий тип таблеток дозволяє :

- оптимізувати фармакодинамічні властивості активних компонентів ;
- виключити фармакологічний і хімічний антагонізм при комбінації несумісних речовин.

РОЗДІЛ 6. ПІДБІР СУЧАСНИХ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ВИРОБНИЦТВА

Методи контролю якості - затверджена в установленому порядку нормативна документація, яка визначає методики контролю якості лікарських засобів, установлює якісні і кількісні показники лікарського засобу та їх допустимі межі, вимоги до упаковки, маркування, умов зберігання, транспортування, терміну придатності, що були затверджені при державній реєстрації (перереєстрації) лікарського засобу.

Визначення активності ферменту

Метод визначення ферментативної активності фітази з утворенням фосфорнованадієво-молібденового комплексу.

Для визначення фітазної активності використовують профільтовану культуральну рідину на папеперовому фільтрі.

Суть методу: заснований на визначенні вмісту неорганічних фосфатів, що утворюються в результаті дії ферменту фітази на субстрат - фітат натрію (натрієва сіль фітинової кислоти) - за певних стандартних умов, шляхом їх зв'язування ванадієво-молібденовим реактивом з утворенням фосфорнованадієво-молібденового комплексу жовтого кольору [67].

За одиницю фітазної активності приймають кількість ферменту, що каталізує гідроліз фітату натрію з утворенням 1 мкмоль неорганічного фосфату за одну хвилину в стандартних умовах (температура - 37 ° С , значення рН 5,5, тривалість гідролізу - 15 хв) [68].

Інтенсивність забарвлення вимірюють фотоколориметричним методом при довжині хвилі від 400 до 415 нм.

Кількість виділених неорганічних фосфатів визначають за градувальним графіком, побудованому як функція оптичної щільності від молярної концентрації фосфатів, в мкмоль/см³.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Роздобвдько В.В.</i>			РОЗДІЛ 6. ПІДБІР СУЧАСНИХ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ВИРОБНИЦТВА	<i>Літ.</i>	<i>Аркушів</i>	<i>Арк.</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Резніченко Ю.М.</i>					121	81
<i>Консультант</i>								
<i>Н. Контр</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
						<i>Кафедра БТМ</i>		

Метод дозволяє визначати від 0,5 до 2,0 мкмоль/см³. Діапазон вимірювань контрольованого показника від 100 до 8000 од [74].

Відбір і підготовка проб ферментної активності у культуральній рідині

Для приготування робочого розчину культури спочатку відбирають з ферментеру проби культуральної рідини. Після цього із відібраних проб відділяють міцелій фільтрацією через паперові фільтри. Від 1 до 5 мл фільтрату розводять дистильованою водою у мірній колбі на 250 мл і використовують одержаний розчин для проведення аналізу.

Відбір і підготовка проб ферментної активності у сухому ферментному препараті

Аналізовані зразки у формі порошку можна використовувати без попередньої підготовки. Для приготування основного розчину аналізованого зразка в плоскодонну колбу поміщають наважку аналізованого зразка масою від 0,1 до 10 г з точністю до 0,2 мг і суспендують у невеликій кількості дистильованої води (до 50 см³) на магнітній мішалці протягом 15 хв. Суспензію кількісно переносять в мірну колбу місткістю 100 см³ і доводять об'єм дистильованою водою до мітки. Отриману суспензію центрифугують при частоті обертання 7000 об/хв протягом 15 хв. Для аналізу використовують надосадову рідину .

Суть методу: заснований на визначенні вмісту неорганічних фосфатів, що утворюються в результаті дії ферменту фітази на субстрат - фітат натрію (натрієва сіль фітинової кислоти) - за певних стандартних умов, шляхом їх зв'язування ванадієво-молібденовим реактивом з утворенням фосфорнованадієво-молібденового комплексу жовтого кольору .

За одиницю фітазної активності приймають кількість ферменту, що каталізує гідроліз фітату натрію з утворенням 1 мкмоль неорганічного

фосфату за одну хвилину в стандартних умовах (температура - 37 ° С , значення рН 5,5, тривалість гідролізу - 15 хв).

Інтенсивність забарвлення вимірюють фотоколориметричним методом при довжині хвилі від 400 до 415 нм.

Кількість виділених неорганічних фосфатів визначають за градувальним графіком, побудованому як функція оптичної щільності від молярної концентрації фосфатів, в мкмоль/см³.

Метод дозволяє визначати від 0,5 до 2,0 мкмоль/см³. Діапазон вимірювань контрольованого показника від 100 до 8000 од .

Проведення аналізу: у 3 пробірки (дві дослідні і одну контрольну) вносять по 2,0 см³ робочого розчину аналізуючого зразка. Пробірки поміщають в ультратермостат або водяну баню з температурою $(37 \pm 1) ^\circ \text{C}$ і витримують протягом 5 хв.

У дві дослідні пробірки додають по 4,0 см³ розчину субстрату фітату натрію, попередньо витриманого в ультратермостаті або водяній бані з температурою $(37 \pm 1) ^\circ \text{C}$ протягом 5 хв, і перемішують. Всі три пробірки поміщають в ультратермостат або водяну баню з температурою $(37 \pm 1) ^\circ \text{C}$ на 15 хв .

До контрольної пробірку вносять 4 см³ розчину субстрату фітату натрію. До контрольної і в дві дослідні пробірки додають по 4,0 см³ ванадієво- молібденового реактиву і ретельно перемішують.

Пробірки (дві дослідні і одну контрольну) витримують 10 хв при кімнатній температурі.

Розчини колориметрують при довжині хвилі від 400 до 415 нм, в кюветі з товщиною поглинаючого світлового шару 10 мм, проти контролю на реактиви. При необхідності розчини центрифугують при 7000 хв-1

Визначення результатів: молярну концентрацію фосфатів (мкмоль/см³) в дослідних і контрольних розчинах визначають за градувальним графіком.

Ферментативну активність фітази од/г, в аналізованому зразку, розраховують за формулою:

$$\Phi = (C_0 + C_k) / ct$$

де C_0 – молярна концентрація фосфатів у дослідній пробі відповідно за градувальними графіком, мкмоль/см³;

C_k – молярна концентрація фосфатів в контрольній пробі відповідно за градувальними графіком, мкмоль/см³;

t – тривалість гідролізу, хв;

c – масова концентрація ферментного препарату, що міститься в реакційній суміші, г/см³, що розраховується за формулою:

$$c = m/VP$$

де m – маса навішення ферментного препарату, г;

V – об'єм розведення наважки при приготуванні основного розчину, см³;

P – розведення основного розчину ферментного препарату для приготування робочого розчину.

За остаточний результат приймають середньоарифметичне значення результатів двох паралельних визначень, округлене до першого десяткового знака

Межі відносної похибки 7 % при деякій ймовірності.

Визначення концентрації глюкози

Вміст глюкози у культуральній рідині вимірюється за допомогою біосенсора на основі іммобілізованої глюкозооксидази.

Суть методу: під дією ензиму глюкозооксидази глюкоза окислюється з утворенням пероксиду водню та D-глюконолактону. Глюконолактон спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон. Це у свою чергу, спричиняє зміну провідності, яку можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача. У разі амперметричного визначення утворений у процесі глюкозооксидазної реакції пероксид водню відновлюється на аноді, що приводить до збільшення сили струму. Струм, який виникає під час вимірювання, пропорційний концентрації глюкози в зразку [78].

Техніка визначення: у відкриту комірку об'ємом 2,5 мл поміщають пробу супернатанту культуральної рідини. Подвійну мембрану біосенсора, яка з'єднана з амперметром, занурюють у дослідну пробу і фіксують покази амперметра. За калібрувальним графіком, побудованим на основі показів амперметра при зануренні мембран біосенсора у розчин глюкози відомої концентрації, визначають концентрацію глюкози у супернатанті [92].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в *табл. 7.1.*

Таблиця 7.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Цільний елемент призначений як для приливної так і витяжної повітря, виготовлений з оцинкованої сталі, оснащений захисною решіткою від грубих механічних включень. Габарити 1250x1380x810[1]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Базовий фільтр грубої очистки класу фільтрації F7, тип вловлюючих забруднювачів – частинки, матеріал – тканинна основа, Розмір вловлюючих забруднювачів:> 5 мкм, ефективність 80-90% [2]
К-3	Компресор	1	Компресор фірми «BROOMWADE» (Італія), потужність 1,1-7,5 кВт, робочий тиск 8-12 бар, продуктивність 0,14-0,16 м ³ /хв, габарити 1440x592x1100, маса 215 кг [3]
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник складається з корпусу з охолоджуючою рубашкою та внутрішньої посудини, допустимі температура від -20 до +150°С, поверхня теплообміну 2 м ³ , габарити 810x668x1490, маса 442 кг. [4]
Р – 5	Ресивер повітря	1	Ресивер призначений для компресора оладнаний штуцером, зливом конденсатів та запобіжним клапаном, обсяг 500 л, робочий тиск 16 атм, оброблений поліуретаном з середини, матеріал корпусу сталь Ст3сп/5мм, габарити 775x616x2138, маса 170 кг. [5]
Т-6	Теплообмінник нагрівач	1	Теплообмінник складається з корпусу з охолоджуючою рубашкою та внутрішньої посудини, допустимі температура від -20 до +150°С, поверхня теплообміну 2 м ³ , габарити 810x668x1490, маса 442 кг. [6]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр Airpool серії FP 120 P, (Україна), фільтруючий матеріал багатошарове мікрОВОлокно ,Е = 95% [7]

НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Роздобудько В.В.			
Перевір.	Резніченко Ю.М.			
Консультант				
Н. Контр				
Затверд.	Стабніков В.П.			
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ				
Літ.		Аркушів		Арк.
		121		85
<i>Кафедра БТМ</i>				

Д-11;8;13	Дозатор	3	Автоматичний ваговий дозатор. Діапазон дозування, гр 10-1000. Об'єм накопичувального бункера, л- 40. Похибка, % 2. Принцип дозування вібраційний, швидкість дозування 2 дози/хв, габарити 400x1300x680, вага 32 кг [10]
Р-10	Реактор-змішувач	1	Реактор- змішувач, виготовлений з нержавіючої сталі, об'ємом 40 л. Оснащений зовнішньою рубашкою для підтримки певної температури, з максимальним тиском 0,6 кгс/м ² , потужністю електродвигуна мішалки 0,75 кВт, та частотою обертів до 50 об/хв, маса апарату 270 кг, габарити 1200x980 [9]
ФІ-9	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтр РФМ-3,0, компанія ГеоСорб, фільтруючий матеріал – сополімер стирола, Е = 99,99% [10]
Р-12	Реактор-змішувач	1	Переносний реактор-змішувач, з робочим об'ємом 25 л, оснащений теплообмінною рубашкою з робочим тиском до 3 бар, перемішувачем пристроєм від 10 до 375 об/хв, вся конструкція виготовлена за сталі AISI 316L, габарити 400x350x1100[11]
Р-14	Реактор-змішувач	1	Реактор- змішувач, виготовлений з нержавіючої сталі, об'ємом 250 л. Оснащений зовнішньою рубашкою з електронагрівом для підтримки певної температури, частотою обертів мішалки 0-60 об/хв, габарити 1600x1450x192 [12]
Д-15;17	Дозатор	2	Масовий дозатор призначений для дозування рідин та інших текучих речовин об'ємним способом, потужність 0,5 кВт, продуктивність 2,5 м ³ /год, габарити 600x800x1600 [13]
Р-18	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач виготовлений з нержавіючої сталі, об'ємом 4м ³ оснащений зовнішньою рубашкою для підтримки температури з автоматичним регулюванням, та якірною мішалкою, з потужністю двигуна 5,5 кВт, та частотою обертів 50 об/хв. Маса 3545 кг та габаритами 1600x4115x2130 [14]
Р-16	Реактор-змішувач	1	Скляний реактор-змішувач об'ємом 100 л, оснащений мішалкою з частотою обертів 0-450 об/хв, та рубашкою для підтримки температури з автоматичним регулюванням. Маса апарату 120 кг, габарити 1900 x 780 x 870 [15]
ІН-39	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 60 л, матеріал ферментера нержавіюча сталь 316L, автоматичний контроль ареації, наглядовими люками, дисплеєм настройки, вертикальне розміщення, розміщені сенсори визначення кислотності та автоматичним додаванням кислоти або лугу, температури, ротаметр для керування впуску повітря, вимірювач тиску швидкість перемішування 0 – 1200 об/хв, габарити 1000x700x1500, маса 350 кг. [16]
ІН-20	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 630 л оснащений люком та двома оглядовими вікнами, манометром, барботером, термометром датчиками кислотності та тиску. Потужність двигуна мішалки 3 кВт, швидкість обертів до 260 об/хв, габарити 1200x2570, маса апарату 750 кг [17]

ИН-21	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 6,3 м ³ , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений барботером, датчиками температури, рН рО ₂ , піни, тиску, мутності та ОВП, механічним піногасником, та витратоміра рідини та повітря, наявний асептичний відбір проб, відсутність «мертвих зон», маса 4900 кг, габарити 2345x4960. [18]
Н-22 Н-23 Н-25 Н-27	Насос	4	Насос фірми Calpeda MXP, з прямий підключеним насосом та загальним валом, потужність подачі 1-7,2 м ³ /год, потужність двигуна 0,5 кВт, номінальне число обертів валу 2900 об/хв.[19]
3-22	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач оснащений перемішуючим пристроєм, об'ємно-ваговим дозатором. Загальний об'єм 6,3 м ³ , швидкість перемішування 100 об/хв, потужність 7,5 кВт, об'єм рубашки 0.832 м ³ , маса апарата 4515 кг, габарити 1800x4960, тиск в корпусі 0.3 мПа, тиску рубашки 0,4 мПа[20]
Б-24	Барабанний-фільтр	1	Конструкційний матеріал нержавіюча сталь AISI 304, фільтруюча поверхня 40 м ² , потужність двигуна 3к.с., при 1500 об/хв, тип фільтруючої тканини моновіламентний, матеріал поліпропілен, потужність мішалки 1,5 кВт, 2 наглядні вікна, діапазон обертів барабану від 0,5 до 4 об/хв, габарити 4000x3140[21]
Ф-26	Ультрафільтраційна установка	1	Напівпромислова установка на порожнистих волокнах УПВ-6,0/3, призначена для відділення високомолекулярних фракцій з розчинів біологічно активних сполук, концентрування та очищення розчинів ферментів та полісахаридів, вірусних та бактеріальних суспензій тощо методом ультрафільтрації та діафільтрації у промислових та напівпромислових умовах. Продуктивність установки з фільтрату (вода дистильована) при тиску 0,1 МПа та температурі (20±2) °С, 600 л/год, площа фільтрації 6м ² , максимальний робочий тиск 0,2 МПа, габаритні розміри 110x600x1500, маса 140 кг. [22].
3-28	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач оснащений перемішуючим пристроєм, об'ємно-ваговим дозатором. Загальний об'єм 4 м ³ , швидкість перемішування 100 об/хв, потужність 5,5 кВт, об'єм рубашки 0.533 м ³ , маса апарата 3545 кг, габарити 1600x4115, тиск в корпусі 0.3 мПа, тиску рубашки 0,4 мПа[25]
Д-29	Діалізатор	1	Промисловий діалізатор LP21-4040, має продуктивність 3000л/год, потужність апарату 11кВт, встановлений витратомір, кондуктометр та повітряний вимикач, розміри катриджів 30"x5um, RO контролер кориди РПЦ-2015, СІР-насос CNP CHL2-30 / 0,55 кВт, габарити 1900x2100 [26].
С-30	Сублімаційна сушарка	11	Фармацевтичний ліофілізатор GZLY-2 спеціально розроблений для медичної промисловості, його здатність захоплення води становить 20 кг / 24 години. Фармацевтичний ліофілізатор GZLY-2 має якісний матеріал, хорошу структуру і вакуумний насос і компресор. Зона сублімаційного сушіння 2,16 м ² , температура конденсатора <-75 °С, Точність контролю ± 1 °С. Максимальна ступінь вакууму <5 Па, Ємність уловлювання води 40 кг, потужність 15 кВт, габарити 3500 * 1300 * 2000мм[23].
Д-31	Дробарка	11	Щокова дробарка призначена для використання у хімічній та фармацевтичній промисловості. Розміри подрібнення 1-20 мм, потужність 1,5 кВт, ступінь захисту IP 54, габарити 420x1160x900, маса 300 кг. [24]

Закінчення таблиці 7.1

П-32	Фасувальний апарат	1	Високопродуктивна фасувальна машина FOYER FZL500 - автоматичний фасувально-пакувальний апарат з високою точністю зважування для сипучих продуктів. Матеріал корпусу нержавіюча сталь, режим роботи автоматичний, тип зварювання зварювання пакету типу «подушка», діапазон зважування, г 1-500, продуктивність, упаковок/хв до 10, точність зважування, г ± 1 , об'єм накопичувального бункера, л 15, робочий діапазон температур, $^{\circ}\text{C}$ 10...40 потужність, кВт 0,5, габаритні розміри, мм 460 x 590 x 1400, вага машини, кг 75[27]
В-33	Вібросито	1	Вібросито високочастотне одномоторне ВВУ1.800.2 ВЧ.Обладнання повністю автономне, відполіроване, без щілин і зазорів в конструкції з дотриманням найвищих санітарних вимог. Кількість груд, шт. – 2 , активна площа, м ² – 2x0,5, опорна сітка поліестер, розмір комірки, мм – 4x4, електрична потужність, кВт 0,9, напрямок обертання валу вібратора за годинниковою стрілкою при вигляді зверху. Габаритні розміри 1345x930x1200, маса 320 кг [28].
З-34	Змішувач	1	Плужовий змішувач забезпечує приплив матеріалу. Завдяки високій швидкості та формі плужної мішалки, відцентровій вихровій дії, матеріал у плужному змішувачі здійснює тривимірний рух і змішується разом. Цей тип змішувача підходить для сухого порошку, гранул, дрібного волокна, рідини та пасти з низькою в'язкістю. Максимальне навантаження 120 кг, швидкість 97 об/хв., повна потужність 4 Квт, габарити 1525x850x1000, маса апарату 450 кг [29].
Т-35	Таблетпрес	1	Таблетпрес GZP (ZPT) 26 може виробляти різні форми таблетованих лікарських засобів У конструкції преса для таблеток використано вузол примусового завантаження сировини. ормування таблетки за два цикли (основне та попереднє пресування). Функція автоматичного поповнення порошку, контроль та відображення значень тиску на кожному прес-інструменті. Система контролю на основі PLC; автоматичні захисні функції. Ролики основного та попереднього пресування однакового розміру, взаємозамінні, закріплені на металевих опорах. Кількість станцій прес інструменту 26, швидкість ротору 22-110 об/хв., продуктивність до 171000 таблеток за годину, потужність двигуна 7,5 кВт, тиск основного пресування 100 кН, додаткового 14 кН, габарити 820x1100x1750, маса 1450 кг [30].
Б-36	Блістерна машина	1	Блістерна машина ВМР270Н приймає цифровий індикатор положення забезпечує пряме налаштування. Оснащений блокуванням формату, системою позиціонування та швидкознімною конструкцією без інструментів, що забезпечує надзвичайно просту зміну формату Швидкість: алюміній/ПВХ 150 ударів/хв. Вихід: 400 блістерів/хв. (алюміній/ПВХ блістер розміром 57×80 мм). Площа формування: 260×210 мм Максимальна глибина формування: 14 мм. Потужність машини: 19 кВт Розмір машини: 5500×1500×2000 мм (5 станцій). Вага машини: 3200 кг [31]

Примітка: підбір обладнання відбувався за допомогою таких електронних ресурсів:

1. <https://ccktm.ibud.ua/ua/company-prais/kruglvyv-kryshnyy-element-ventilyatsii-bzl-1250-ccktm-3567408>
2. <https://kvantum.com.ua/ua/klimat/pritochnaya-ventilyaciya-doma-s-ochistkoj/filtr-fl7-tion-o2>
3. <http://championairtech.com.ua/produkcija/porshnevye-kompressory/>
4. <https://tdredoctober.com/catalog/teploobmenniki/teploobmennik-tip-sosud-v-sosude.html>
5. https://xkz.com.ua/p1075044643-resiver-vertikalnij-500.html?gclid=CjwKCAjw5Ij2BRBdEiwA0Frc9U7YWvw7VAfjCLbUH4dtG8CepQaSJKW_JT65DION1GabVlu4H6sVBoCZpgQAvD_BwE
6. <https://tdredoctober.com/catalog/teploobmenniki/teploobmennik-tip-sosud-v-sosude.html>
7. <http://www.airpol.com.ua/catalog/ochystka-povtria/filters/filtry-tonkoi-ochystky/>
8. <https://tdredoctober.com/catalog/teploobmenniki/teploobmennik-tip-sosud-v-sosude.html>
9. <https://azovhimservis.all.biz/reaktor-nerzhavyushchij-laboratornyj-40l-g15083700>
10. <https://airpol.com.ua/product-category/ochystka-stysnenogo-povitrya/>
11. <http://www.kft2.com.ua/reaktor25.html>
12. <http://promvit.ru/reaktor-250-l-3/>
13. <https://packtech.com.ua/uk/obladnannya/dozuvayne/dozatory-ridkykh-produktiv/dzhm-1>
14. <https://tdredoctober.com/catalog/vertikalnye-mehanicheckie-meshalki/jakornaja-meshalka-v25-63-m3.html>
15. <https://prom.ua/p1365094424-laboratornyj-himicheskij-steklyannyj.html?>
16. https://www.alibaba.com/product-detail/Conical-fermentor-3-5bbl-fermenter-60_60856095288.html
17. <http://pharmspravka.ru/farmatsevticheskoe-oborudovanie/apparatyi-s-peremeshivayuschimi-ustroystvami/fermenter-inokulyator-emkostyu.html>
18. <https://biotechno.ru/catalog/promyshlennij-fermenter/promyshlenny-ferment-biotechno-obemom-1000-20-l>
19. <https://tdredoctober.com/catalog/promyshlennoe-oborudovanie/nasosnoe-oborudovanie/nasosi-calpeda.html>
20. <https://tdredoctober.com/catalog/vertikalnye-mehanicheckie-meshalki/jakornaja-meshalka-v25-63-m3.html>
21. https://intech-gmbh.ru/drum_vacuum_filters/#construction
22. http://chemanalytica.com/book/novyy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/10_protsesty_i_apparaty_khimicheskikh_tekhnologiy_chast_II/7113
23. https://prom.ua/ua/p1372024489-farmatsevticheskaya-vakuumnaya-sublimatsionnaya.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=cpa_50&gclid=CjwKCAjwzaSLBhBJEiwAJSRokjC2cjdlutmd59NBpAB1SslpU1XGTg9HPx2HxOd93clka65tusLdhoCWMAQA_vD_BwE
24. <https://himtest-ukraina.com/p600465186-schyokovaya-drobilka-retsche.html>
25. <https://tdredoctober.com/catalog/vertikalnye-mehanicheckie-meshalki/jakornaja-meshalka-v25-63-m3.html>
26. https://www.alibaba.com/product-detail/Industrial-Machine-Dialysis-Reverse-Osmosis-Ro_1600176742957.html?spm=a2700.7724857.topad_classic.d_title.40f37033BSJOvV
27. https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fzl-500?pk_campaign=GoogleMerchant&gclid=CjwKCAiA4veMBhAMEiwAU4XRr4dsh7fr8gU9_MREDElpy5I1hy9wcv295ZVkyLjir9q6lCiiJ6_2pxoCJswQAvD_BwE
28. <https://prom.ua/ua/p619214373-vibrosito-krugloe-vysokochastotnoe.html>
29. <http://ua.bolimill.com/mixing-machine/pharmaceuticals-mixer/ganoderma-lucidum-powder-mixer.html>
30. <https://www.diapazon-pharm.ru/speed-tablet-press>
31. <https://www.jornen.ru/plus/view.php?aid=170>

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу ферменту фітаза штамом грибів *Neurospora sitophila* включає в себе допоміжні роботи (підготовка повітря, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та безпосередньо сам технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і виробничий біосинтез).

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря потрібно проводити враховувати існуючі та можливі джерела забруднень (автотранспорт, газоподібні промислові викиди та інші фактори).

Враховуючи висоту будівлі підприємства (близько 6 м), забір атмосферного повітря відбуватиметься на висоті близько 2–4 м над будівлею, 10 м. Забір здійснюється повітрозбірником (ПЗ – 1).

ДР 1.2. Грубе очищення повітря від пилу та часточок

На цій стадії з повітря видаляється основна маса механічних часточок та пилу. Для цього використовують фільтри грубої очистки (Ф-2). Ступінь очищення 80 %.

ДР 1.3. Стиснення повітря

За допомогою турбокомпресора (К-3) повітря стискають до 0,35–0,5 МПа, при цьому повітря нагрівається до 120–250 °С.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Щоб запобігти випаданню вологи в крапле-вловлювачі, повітря охолоджують до 25°С в теплообміннику (Т-4). Далі у ресивері (Р-5) відбувається стабілізація вологості повітря $W = 60 \%$.

ДР 1.5. Стабілізація термодинамічних показників

Надалі, повітря підігрівають у теплообміннику (Т-6) для забезпечення надійної роботи фільтрів до температури 45-50°С. При таких температурах не відбувається конденсація пари на волокнах фільтра.

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Роздобудько В.В.			РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Аркушів	Арк.
Перевір.		Резніченко Ю.М.					120	90
Консультант								
Н. Контр								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-7). Ступінь очищення – 99 %. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

ДР 1.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Остаточне очищення повітря від забруднень здійснюється в індивідуальних фільтрах (ФІ-8). Як фільтрувальний матеріал використовують сополімер стирила. Ступінь очищення становить 99,999 %.

ДР 2. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалці.

Для вирощування інокуляту потрібно приготувати 2,72 л поживного середовища. Вміст компонентів середовища наведений у таблиці 8.1

Таблиця 8.1

Склад поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2720 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Рисова солома	187,5	510	А	2200
Вода		250		
Соева пульпа	437,5	1190		
Вода		250		
NaCl	0,04	0,1	Б	520
Вода		260		
MgSO ₄	0,03	0,09		
Вода		260		
Разом:		2720		

ДР 2.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 510 г рисової соломи та 1190 г соєвої пульпи та додають у колбу об'ємом 5 л після чого заливають 500 мл водопровідної води і

перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою , після чого колба йде на стерилізацію в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 2.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На аналітичних вагах зважують 0,1 г NaCl, та 0,09 г MgSO₄. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 520 мл водопровідної води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою , після чого колба йде на стерилізацію в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 2.2. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 л

Для вирощування посівного матеріалу потрібно приготувати 33 л поживного середовища.

Враховуючи те, що для засіву використовується рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 3 л, загальна кількість води, яку необхідно буде додати становить 30 л. Вміст компонентів середовища наведений у *таблиці 8.2*

Таблиця 8.2

Склад поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 30 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Рисова солома	187,5	5,625	А	28,75
Вода		5		
Соева пульпа	437,5	13,125		
Вода		5		
NaCl	0,04	1,2 (г)	Б	1,25
Вода		0,625		
MgSO ₄	0,03	0,9 (г)		
Вода		0,625		
Разом:		30		

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор змішувач об'ємом 40 л (Р-10) вносять 5,625 кг рисової соломи та 13,125 кг соєвої пульпи, після чого заливають 10 л водопровідної води і перемішують. Стерилізацію проводять, при температурі 131 °С упродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На аналітичних вагах зважують 1,2 г NaCl, та 0,9 г MgSO₄. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, добавляють 1,25 л водопровідної води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою, після чого колба йде на стерилізацію в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 2.3. Приготування поживного середовища для біосинтезу в інокуляторі об'ємом 630 л

Для стадії біосинтезу в інокуляторі об'ємом 630 л потрібно приготувати 292 л поживного середовища, враховуючи коефіцієнт заповнення. Вміст компонентів середовища наведений у таблиці 8.3

Таблиця 8.3

Склад поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 630 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 292 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Рисова солома	187,5	54,75	А	272,5
Вода		45		
Соєва пульпа	437,5	127,75		
Вода		45		
NaCl	0,04	11,68(г)	Б	19,5
Вода		9,75		
MgSO ₄	0,03	8,76(г)		
Вода		9,75		
Разом:		292		

ДР 2.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор змішувач об'ємом 250 л (Р-14) вносять 54,75 кг рисової соломи та 127,75 кг соєвої пульпи, після чого заливають 90 л водопровідної води і перемішують. Стерилізацію проводять, при температурі 131 °С упродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 2.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На аналітичних вагах зважують 11,68 г NaCl, та 8,76 г MgSO₄. Наважки поміщають у реактор змішувач об'ємом 25 л (Р-12), додають 19,5 л водопровідної води і перемішують до повного розчинення. Стерилізація проходить при температурі 131 °С упродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 2.4. Приготування поживного середовища для біосинтезу у ферментері об'ємом 6,3 м³

Для стадії біосинтезу у ферментері об'ємом 6,3 м³ потрібно приготувати 2810 л поживного середовища, враховуючи коефіцієнт заповнення. Вміст компонентів середовища наведений у таблиці 8.4.

Таблиця 8.4

Приготування поживного середовища для біосинтезу у ферментері об'ємом 6,3 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 2810 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Рисова солома	187,5	526,875	А	2,726,25
Вода		485		
Соева пульпа	437,5	1229,375		
Вода		485		
NaCl	0,04	0,112	Б	83,75
Вода		41,775		
MgSO ₄	0,03	0,084		
Вода		41,775		
Разом:		2810		

ДР 2.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор змішувач об'ємом 4 м³ (Р-18) вносять 526,875 кг рисової соломи та 1229,375 кг соєвої пульпи, після чого заливають 970 л

водопровідної води і перемішують. Стерилізацію проводять, при температурі 131 °С упродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 2.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 112 г NaCl, та 84 г MgSO₄. Наважки поміщають у реактор змішувач об'ємом 100 л(Р-16), додають 83.5 л водопровідної води і перемішують до повного розчинення. Стерилізація проходить при температурі 131 °С упродовж 40 хв за тиску 0,15 МПа.

ТП 3. Вирощування посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Neurospora sitophila* підтримують в картопляно декстрозному агарі. Пересів здійснюють 1 раз на 2 тижні. При роботі з колекційною

культурою обов'язково дотримуються умов асептики.

ТП 3.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру, що зберігається на чашках Петрі, пересівають петлею в пробірки із середовищем того ж складу і вирощують добу при температурі 30 °С

ТП 3.3 Вирощування культуральної рідини в колбах на качалці

Колбу з композицією А (від ДР 2.1.1) вносять композицію Б (від ДР 2.1.2).

Далі перемішують та готове поживне середовище вносять у 20 колб об'ємом 750 мл, які ставлять на шейкер в кожній з яких буде добавлено по 150 мл поживного середовища.

В пробірку з робочою культурою вносять 5 мл стерильної води, суспендують клітини та за допомогою стерильної піпетки вносять в колбу з готовим поживним середовищем (на одну колбу поживного середовища розраховується одна пробірка з робочою культурою). Всі операції обов'язково проводяться в асептичних умовах.

Вирощують робочу культуру в качалочних колбах при 300 об/хв, при температурі 30°С 96 годин.

Після культивування проводять мікробіологічний контроль культуральної рідини, а також перевіряють концентрацію ферменту.

ТП 3.4 Вирощування культуральної рідини в інокуляторі 60 л

У ферментер (ІН-19) подають вміст композиції А (від ДР 2.2.1) та Б (від ДР 2.2.2) . Потім у ферментер подають посівний матеріал з посівного апарату по трубі перетискування (від ТП 3.5). Культивування проходить при 300 об/хв та при температурі 30°C 96 год.

Кожні 4 год з ферментера відбирають пробу культуральної рідини для мікробологічного контролю та визначають концентрацію ферменту.

ТП 3.5 Вирощування культуральної рідини в посівному апараті об'ємом 630 л

В посівний апарат(ІН-20) вносять композицію А (від ДР 2.3.1) та Б (від ДР 2.3.2). Після цього в апарат вносять посівний матеріал з посівного апарату по трубі перетискування (від ТП 3.4).

Культивування проходить 96 год при 300 об/хв, та при температурі 30°C. Кожні 4 год. з посівного апарату відбирають пробу для мікробологічного контролю, та визначають концентрацію ферменту.

ТП 4 Вирощування культуральної рідини в ферментері об'ємом 6,3 м³

У ферментер (ІН-21) подають вміст композиції А (від ДР 2.4.1) та композиції Б (від ДР 2.4.2). Потім у ферментер подають посівний матеріал з посівного апарату по трубі перетискування (від ТП 3.5). Культивування проходить при 300 об/хв та при температурі 30 °С 96 год.

Кожні 4 год з ферментера відбирають пробу культуральної рідини для мікробологічного контролю та визначають концентрацію ферменту.

ТП 5. Барабанна вакуум фільтрація

Культуральну рідину після ферментації, зі збірника(З-22) по насосу (Н-23), подають в установку барабанного фільтру (Б-24). Процес фільтрації відбувається при тиску 0,1-0,4 МПа, куту заповнення барабану 115°, розміром пор 45 мкм, та швидкістю обертання барабану 1 об/хв. Після проведення фільтрації фільтрат проходить на утилізацію, а відфільтрована рідини проходить на подальшу обробку.

ТП 6. Ультрафільтрація

По насосу (Н-25) відфільтрована рідина передається в ультрафільтраційну установку(Ф-26), де проводиться ультрафільтрація при розмірі по 60 КДа, та робочому тиску 0,2 Мпа.

ТП 7. Осадження білків

По насосу (Н-27) сировину подають у збірник(З-28) та добавляють 1%-ий розчин сульфату амонію до загальної концентрації речовиниму розчині 0,1%, ретельно перемішують даний розчин протягом години при 180 об/хв, при 4 ° С.

ТП 8. Діаліз

Осаджений білок діалізують 5 год проти 100 об'ємів дистильованої води при 4 ° С.

ТП 9. Сублімаційне висушування

Отриманий продукт подається на сублімаційну сушарку GZLY-2 (С-29), після чого отриманий продукт висипається у ємності, та подається на подрібнення.

ТП 10. Подрібнення

Після просушування, речовина подається у шокову дробарку(Д-30) Retsch BB 200, де проводиться подрібнення продукту до розміру часток менше 1 мм.

ТП 11. Пакування.

Після подрібнення готовий продукт подається до пакувальної машини та пакується в поліетиленові мішки по 500 г та подається на склад для подальшого використання.

ТП 12. Просіювання

Після подрібнення речовина подається на вібросито, де проводиться просіювання речовини з розміром сита 2мм для відсіювання занадто великих часток.

ТП 13. Змішування

Після просіювання речовина для таблетування (порошок фітази, лактоза, кальцію сульфат) подається подається в змішувач порошку, де перемішується 4 год при 50 об/хв, задля гомогенізації складу.

ТП 14. Таблетування

Після перемішування готовий порошок подається на роторний таблетпрес де проходить прямеме пресування таблеток в порошок.

ТП 15. Пакування

Після таблетування готові таблетки подаються на блістерну машину, де таблетки пакуються в алюмінієвий блістер та фасуються в коробки з відповідною інструкцією.

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва

9.1. Карта поетадійного контролю

Таблиця 9.1

Карта поетадійного контролю виробництва фітази штамом *Neurospora sitophila*

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх, Км 1.2.1. Щоденне прибирання	Підлога	Візуальний огляд, КУО \leq 800	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Км, Кх 1.2.2. Генеральне прибирання	Підлога, стіни, двері та вікна	Візуальний огляд КУО \leq 300	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.3.1. Миття обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура робочого розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	t = 40-50 °С, τ = 30-40 хв, чисте обладнання
Кт 1.3.2. Перевірка обладнання на герметичність	Герметичність роботи обладнання, температура, тиск, час, перепад тиску	Манометр технічний, термометр, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	P = 0,07 МПа, τ = 20–30 хв, $\Delta P < 0,01$ Мпа
Кт 1.3.3. Стерилізація ферментаційного обладнання	Обладнання, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	τ = 1 год, P = 0,15 МПа

					НУХТ БТЕК 02.01.01 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Роздобудько В.В.			РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	Літ.	Аркушів	Арк.
Перевір.		Резніченко Ю.М.					120	99
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт 2.1. Забір атмосферного повітря	Висота забору повітря	Альтиметр	При проектуванні приміщень	$h = 10 \text{ м}$
Кт 2.2. Грубе очищення повітря від пилу та часток	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 80 \%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.3. Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,35\text{--}0,5 \text{ МПа}$, $t = 120\text{--}150 \text{ }^\circ\text{C}$
Кт 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, після видалення зайвої вологи температура	Термометр технічний, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	$t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $W = 60 \%$
Кт 2.5. Стабілізація теромодинамічних показників	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 70\text{--}90 \text{ }^\circ\text{C}$
Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Повітря на виході з головного фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	$E = 95 \%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря на виході з індивідуального фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у індивідуальному фільтрі	$E = 99,99 \%$, тиск згідно паспорту
Кт, Км 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А у колбах	Композиція А, та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112 \text{ }^\circ\text{C}$ $P = 0,05 \text{ МПа}$, $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б у колбах	Композиція Б, температура та тиск стерилізації, час стерилізації, стерильність	Годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А для вирощування посівного матеріалу у реакторі змішувачі об'ємом 40 л	Композиція Б, рН, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, годинник технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б для вирощування посівного матеріалу у колбі	Композиція Б, рН, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, годинник технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P = 0,15 МПаτ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А для вирощування посівного матеріалу у реакторі змішувачі 350 л	Композиція Б, рН, тиск, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність	Манометр, годинник технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

Кх, Кт, Км 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б для вирощування посівного матеріалу у реакторі змішувачі об'ємом 25 л	Композиція Б, рН, температура стерилізації, стерилізації, стерильність тиск, час	Манометр, годинник технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А для вирощування посівного матеріалу у реакторі змішувачі об'ємом 3 м ³	Композиція А, рН, температура стерилізації, стерилізації, стерильність тиск, час	Манометр, годинник технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б для вирощування посівного матеріалу у реакторі змішувачі об'ємом 100 л	Композиція Б, рН, температура стерилізації, стерилізації, стерильність тиск, час	Манометр, годинник технічний, рН-метр, датчик температури, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, P = 0,15 МПа τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1. Підтримання колекційної культури	Культура <i>Neurospora sitophila</i> тривалість, температура, мікробіологічна чистота	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль у процесі збереження	t = 4 °C, τ = 2 тижні, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2. Одержання робочої культури.	Культура, <i>Neurospora sitophila</i> тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 30 °C, τ = 96 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження табл. 9.1

<p>Кх, Кт, Км 5.3. Вирощування інокуляту в колбах на качалках</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота.</p>	<p>Термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Контролюється частота обертів перемішуючого пристрою, температура – безперервно, мікробіологічний контроль проводиться після вирощування</p>	<p>t = 30°C, n = 300 об/хв, τ = 96 год, відсутність сторонньої мікробіоти,</p>
<p>Кх, Кт, Км 6.1. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 60 л</p>	<p>Посівний матеріал, рН, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси</p>	<p>Датчик рН та температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 10 годин</p>	<p>pH = 6,0 t = 30 °C, τ = 96 год, відсутність сторонньої мікробіоти, n = 150 об/хв</p>
<p>Кх, Кт, Км 6.2. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 630 л</p>	<p>Посівний матеріал, рН, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси</p>	<p>Датчик рН та температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 10 годин</p>	<p>pH = 6,0 t = 30 °C, τ = 96 год, відсутність сторонньої мікробіоти, n = 150 об/хв</p>

Закінчення табл.9.1

Кх, Кт, Км 6.3.Вирощування посівного матеріалу в робочому ферментері	Посівний матеріал, рН, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота, концентрація біомаси	Датчик рН та температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси відбираються кожні 10 годин	pH = 6,0 t = 30 °C, τ = 96 год, відсутність сторонньої мікробіоти, n = 50 об/хв
Кт 7.1. Барабанна вакуум фільтрація	Розчин з клітинами, кількість обертів на роторі	Датчик обертів, датчик заповнення, розмір пор, тиск.	Під час фільтрування	n=1 об/хв, ∠=115° P=0,4-0,1 МПа d =45 мкм
Кт, Кх 7.2 Ультрафільтрація	Ступінь очищення сировини	Швидкість плинності, ступінь очищення згідно паспорту, тиск подачі сировини	Після приготування розчину	P=0,2 МПа
Кт, Кх 7.3 Осадження сульфатом амонію	Концентрація сульфату амонію у розчині	Хімічний метод, рН-метр, датчик обертів мішалки, годинник, термометр	Після приготування розчину	C=0,1% n=180 об/хв τ =1-2 год t=4 °C
Кт, Кх 7.4 Діаліз	Концентрація сульфату амонію у розчині	Хімічний метод, рН-метр, витратомір, годинник, термометр	Під час діалізу	V=100 об'ємів розчину τ =5 год t=4 °C
КТ 7.5 Сублімаційне сушіння	Концентрація вологи в сировині	Термометр, барометр, анемометр	Концентрація визначається після сушки речовини	P=15 мм. рт. ст. t =-20 °C
КТ 7.6 Подрібнення	Розмір подрібнених часток	Лабораторне сито	Після подрібнення	d ≤ 2 мм
КТ 7.7 Пакування	Вага пакету	Ваги	Після пакування	M=500 г

9.2. Методи контролю

9.2.1 Визначення концентрації біомаси.

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. У пробірки із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтують, потім вимірюють оптичну густина (при 540 нм), отримані дані перераховують за калібрувальним графіком[71].

9.2.2 Визначення активності ферменту

Метод визначення ферментативної активності фітази з утворенням фосфорнованадієво-молібденового комплексу.

Для визначення фітазної активності використовують профільтовану культуральну рідину на папеперовому фільтрі.

Суть методу: заснований на визначенні вмісту неорганічних фосфатів, що утворюються в результаті дії ферменту фітази на субстрат - фітат натрію (натрієва сіль фітинової кислоти) - за певних стандартних умов, шляхом їх зв'язування ванадієво-молібденовим реактивом з утворенням фосфорнованадієво-молібденового комплексу жовтого кольору [74].

За одиницю фітазної активності приймають кількість ферменту, що каталізує гідроліз фітату натрію з утворенням 1 мкмоль неорганічного фосфату за одну хвилину в стандартних умовах (температура - 37 ° С , значення рН 5,5, тривалість гідролізу - 15 хв) [74].

Інтенсивність забарвлення вимірюють фотоколориметричним методом при довжині хвилі від 400 до 415 нм.

Кількість виділених неорганічних фосфатів визначають за градувальним графіком, побудованому як функція оптичної щільності від молярної концентрації фосфатів, в мкмоль/см³.

Метод дозволяє визначати від 0,5 до 2,0 мкмоль/см³. Діапазон вимірювань контрольованого показника від 100 до 8000 од [74].

Відбір і підготовка проб ферментної активності у культуральній рідині

Для приготування робочого розчину культури спочатку відбирають з ферментеру проби культуральної рідини. Після цього із відібраних проб відділяють міцелій фільтрацією через паперові фільтри. Від 1 до 5 мл фільтрату розводять дистильованою водою у мірній колбі на 250 мл і використовують одержаний розчин для проведення аналізу.

Відбір і підготовка проб ферментної активності у сухому ферментному препараті

Аналізовані зразки у формі порошку можна використовувати без попередньої підготовки. Для приготування основного розчину аналізованого зразка в плоскодонну колбу поміщають наважку аналізованого зразка масою від 0,1 до 10 г з точністю до 0,2 мг і суспендують у невеликій кількості дистильованої води (до 50 см³) на магнітній мішалці протягом 15 хв. Суспензію кількісно переносять в мірну колбу місткістю 100 см³ і доводять об'єм дистильованою водою до мітки. Отриману суспензію центрифугують при частоті обертання 7000 об/хв протягом 15 хв. Для аналізу використовують надосадову рідину .

Суть методу: заснований на визначенні вмісту неорганічних фосфатів, що утворюються в результаті дії ферменту фітази на субстрат - фітат натрію (натрієва сіль фітинової кислоти) - за певних стандартних умов, шляхом їх зв'язування ванадієво-молібденовим реактивом з утворенням фосфорнованадієво-молібденового комплексу жовтого кольору .

За одиницю фітазної активності приймають кількість ферменту, що каталізує гідроліз фітату натрію з утворенням 1 мкмоль неорганічного

фосфату за одну хвилину в стандартних умовах (температура - 37 ° С , значення рН 5,5, тривалість гідролізу - 15 хв).

Інтенсивність забарвлення вимірюють фотоколориметричним методом при довжині хвилі від 400 до 415 нм.

Кількість виділених неорганічних фосфатів визначають за градувальним графіком, побудованому як функція оптичної щільності від молярної концентрації фосфатів, в мкмоль/см³.

Метод дозволяє визначати від 0,5 до 2,0 мкмоль/см³. Діапазон вимірювань контрольованого показника від 100 до 8000 од .

Проведення аналізу: у 3 пробірки (дві дослідні і одну контрольну) вносять по 2,0 см³ робочого розчину аналізуючого зразка. Пробірки поміщають в ультратермостат або водяну баню з температурою $(37 \pm 1) ^\circ \text{C}$ і витримують протягом 5 хв.

У дві дослідні пробірки додають по 4,0 см³ розчину субстрату фітату натрію, попередньо витриманого в ультратермостаті або водяній бані з температурою $(37 \pm 1) ^\circ \text{C}$ протягом 5 хв, і перемішують. Всі три пробірки поміщають в ультратермостат або водяну баню з температурою $(37 \pm 1) ^\circ \text{C}$ на 15 хв .

До контрольної пробірки вносять 4 см³ розчину субстрату фітату натрію. До контрольної і в дві дослідні пробірки додають по 4,0 см³ ванадієво- молібденового реактиву і ретельно перемішують.

Пробірки (дві дослідні і одну контрольну) витримують 10 хв при кімнатній температурі.

Розчини колориметрують при довжині хвилі від 400 до 415 нм, в кюветі з товщиною поглинаючого світлового шару 10 мм, проти контролю на реактиви. При необхідності розчини центрифугують при 7000 хв-1

Визначення результатів: молярну концентрацію фосфатів (мкмоль/см³) в дослідних і контрольних розчинах визначають за градувальним графіком.

Ферментативну активність фітази од/г, в аналізованому зразку, розраховують за формулою:

$$\Phi = (C_0 + C_k) / ct$$

де C_0 – молярна концентрація фосфатів у дослідній пробі відповідно за градувальним графіком, мкмоль/см³;

C_k – молярна концентрація фосфатів в контрольній пробі відповідно за градувальним графіком, мкмоль/см³;

t – тривалість гідролізу, хв;

c – масова концентрація ферментного препарату, що міститься в реакційній суміші, г/см³, що розраховується за формулою:

$$c = m/VP$$

де m – маса навішення ферментного препарату, г;

V – об'єм розведення наважки при приготуванні основного розчину, см³;

P – розведення основного розчину ферментного препарату для приготування робочого розчину.

За остаточний результат приймають середньоарифметичне значення результатів двох паралельних визначень, округлене до першого десяткового знака

Межі відносної похибки 7 % при деякій ймовірності. [76]

9.3 Визначення концентрації азоту

Широкого впровадження у лабораторній практиці набув метод Дюма. Його часто використовують в Європі, Америці, Росії при експортних операціях для швидкого визначення концентрації білка. При визначенні азоту цим методом зразок спалюється за високої температури (900–1030 °С) у спеціальній лунці в атмосфері кисню при наявності каталізаторів, внаслідок чого вивільняється CO₂, H₂O і N₂. Вуглекислий газ і вода видаляються шляхом пропускання через спеціальні колонки, які поглинають їх, а вміст азоту, що виділився визначають інноваційним самокалібрувальним детектором за теплопровідністю (TCD) LoGas™ (для його роботи не потрібний газ порівняння) і порівнюють з калібрувальною кривою (GOST R 54390- 2011). Основною перевагою цього методу є швидкість проведення аналізу. При його проведенні не використовуються токсичні хімічні речовини і каталізatori, і практично відсутня пробопідготовка (тільки розмел проби), а на одне визначення потрібно лише декілька хвилин, тоді як при використанні метода К'ельдаля затрати часу є набагато більші (1,5–2 год). Проте, недоліком цього методу є те, що невелика кількість дослідного зразку не завжди є репрезентативною, тому результати досліджень можуть бути не точними. Цей метод не є арбітражним, тому при виникненні претензій між постачальником і споживачем для повторних досліджень використовують метод К'ельдаля. [75]

9.4 Визначення концентрації глюкози

Вміст глюкози у культуральній рідині вимірюється за допомогою біосенсора на основі імобілізованої глюкозооксидази.

Суть методу: під дією ензиму глюкозооксидази глюкоза окислюється з утворенням пероксиду водню та D-глюконолактону. Глюконолактон спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон. Це у свою чергу, спричиняє зміну провідності, яку можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача. У разі амперметричного визначення утворений у процесі глюкозооксидазної реакції пероксид водню відновлюється на аноді, що приводить до збільшення сили струму. Струм, який виникає під час вимірювання, пропорційний концентрації глюкози в зразку [76].

Техніка визначення: у відкриту комірку об'ємом 2,5 мл поміщають пробу супернатанту культуральної рідини. Подвійну мембрану біосенсора, яка з'єднана з амперметром, занурюють у дослідну пробу і фіксують покази амперметра. За калібрувальним графіком, побудованим на основі показів амперметра при зануренні мембран біосенсора у розчин глюкози відомої концентрації, визначають концентрацію глюкози у супернатанті [76].

9.5 Опис. Порошок фіолетово-рожевого кольору без запаху

9.6 Час розчинення. Легкорозчинний у воді 1 г на 10 мл води, нерозчинний у 96 % спирті та ефірі.

9.7 Ідентифікація.

А) Метод визначення ферментативної активності фітазою з утворенням молібденової сині. Метод заснований на кількісному визначенні змісту неорганічних фосфатів (P04), що утворюються в результаті дії ферменту фітазою на субстрат - фітат натрію (натрієву сіль фітинової кислоти) при певних стандартних умовах, шляхом їх зв'язування молібдатом натрію і відновленням двопористого олова з утворенням забарвленого в синій колір комплексу - молібденової сині

Б) Метод визначення ферментативної активності фітазою з утворенням фосфорнованадієво-молібденового комплексу. Метод заснований на визначенні змісту неорганічних фосфатів (P04), що утворюються в результаті дії ферменту

фітазою на субстрат - фітат натрію (натрієва сіль фітинової кислоти) - за певних стандартних умовах, шляхом їх зв'язування ванадієво-молібденовим реактивом з утворенням фосфоро-ванадієво-молібденового комплексу жовтого кольору.

9.8 Активність фітази

Активність фітази визначали шляхом вимірювання неорганічного фосфату, що виділяється з фітату натрію. Для аналізу використовували 600 мкл 1,5 мМ фітату натрію в 100 мМ ацетатному буфері натрію, рН 2,5 та 150 мкл ферментативного екстракту. Реакцію проводили на водяній бані при 50 ° С, і її припиняли через 30 хв додаванням 250 мкл 10% розчину трихлороцтової кислоти. Після цього вимірюють поглинання світла колориметричним методом при 700 нм, а виміряні значення корелювали зі стандартною кривою, побудованою з використанням монофосфату калію.

9.9 Виявлення білка

Аналіз робиться з використанням барвника Кумассі діамантовий синій G-250, який в певних умовах при взаємодії зі зразком викликає зміна кольору розчину. За зміною кольору потім можна знайти чисельне значення концентрації, вимірявши оптичну щільність зразка.

Метод Бредфорда широко застосовується, оскільки він швидкий і володіє високою чутливістю.

9.10 рН

Від 6,0 до 8, Потенціометричне визначення рН проводять шляхом вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню (звичайно скляний електрод), другий - електрод порівняння (наприклад, насичений каломельний електрод).

9.11 Втрати в масі при висушуванні.

Визначення втрати в масі при висушуванні виражають у відсотках (маса/маса). Зазначену в окремій статті кількість випробовуваної речовини поміщають у зважений бюкс, попередньо висушений за умов, описаних для випробовуваної речовини. Речовину сушать до постійної маси або протягом часу, зазначеного в

окремій статті, одним з наведених нижче способів. Якщо для температури висушування зазначено не температурний інтервал, а одинарне значення температури, висушування проводять при зазначеній температурі ± 2 °C

9.12 Мікробіологічна чистота.

Випробування, описані нижче, дозволяють здійснювати кількісне визначення мезофільних бактерій та грибів, здатних рости за аеробних умов. Випробування призначені насамперед для того, щоб визначити, чи задовольняє субстанція вимогам щодо мікробіологічної чистоти, наведеним в окремій статті. Якщо випробування проводять із цією метою, виконують зазначення, наведені нижче, включаючи кількість зразків, що відбирають для аналізу, та інтерпретацію одержаних результатів. Наведені нижче методики можуть бути також використані при випробуванні ефективності антимікробних консервантів (5.1.3) відповідно до Фармакопеї. Крім того, їх можна застосовувати при визначенні якості сировини і готових лікарських засобів відповідно до рекомендацій, викладених у статті "Мікробіологічна чистота лікарських засобів" (5.1.4). У цьому випадку, наприклад, при визначенні виробником якості сировини і/або готових лікарських засобів або при проведенні перевірки придатності вибраної методики порядок проведення випробування, в тому числі кількість зразків, що відбираються для аналізу, і інтерпретацію одержаних результатів виробник установлює за погодженням із компетентним уповноваженим органом. Випробування проводять за умов, що дозволяють запобігти випадковому мікробному забрудненню випробовуваного зразка. Заходи, що вживаються для запобігання мікробному забрудненню випробовуваного зразка, не мають впливати на мікроорганізми, які можуть бути виявлені при проведенні випробування. У випадку, якщо випробовуваний лікарський засіб виявляє антимікробну активність, вона має бути підходящим чином нейтралізована. При використанні з цією метою інактиваторів треба підтвердити їхню нейтралізуючу ефективність і нешкідливість для мікроорганізмів. Визначення загального числа аеробних мікроорганізмів проводять методом мембранної фільтрації або Випробування, описані нижче, дозволяють здійснювати кількісне визначення мезофільних бактерій та грибів, здатних рости за аеробних умов.

Випробування призначені насамперед для того, щоб визначити, чи задовольняє субстанція вимогам щодо мікробіологічної чистоти, наведеним в окремій статті. Якщо випробування проводять із цією метою, виконують зазначення, наведені нижче, включаючи кількість зразків, що відбирають для аналізу, та інтерпретацію одержаних результатів. Наведені нижче методики можуть бути також використані при випробуванні ефективності антимікробних консервантів (5.1.3) відповідно до Фармакопеї. Крім того, їх можна застосовувати при визначенні якості сировини і готових лікарських засобів відповідно до рекомендацій, викладених у статті "Мікробіологічна чистота лікарських засобів" (5.1.4). У цьому випадку, наприклад, при визначенні виробником якості сировини і/або готових лікарських засобів або при проведенні перевірки придатності вибраної методики порядок проведення випробування, в тому числі кількість зразків, що відбираються для аналізу, і інтерпретацію одержаних результатів виробник установлює за погодженням із компетентним уповноваженим органом. Випробування проводять за умов, що дозволяють запобігти випадковому мікробному забрудненню випробовуваного зразка. Заходи, що вживаються для запобігання мікробному забрудненню випробовуваного зразка, не мають впливати на мікроорганізми, які можуть бути виявлені при проведенні випробування. У випадку, якщо випробовуваний лікарський засіб виявляє антимікробну активність, вона має бути підходящим чином нейтралізована. При використанні з цією метою інактиваторів треба підтвердити їхню нейтралізуючу ефективність і нешкідливість для мікроорганізмів. Визначення загального числа аеробних мікроорганізмів проводять методом мембранної фільтрації.

9.13 Однорідність маси.

Видаляють паперову етикетку з поверхні контейнера. Контейнер миють і сушать. Потім контейнер розкривають і зразу зважують. Обережним постукуванням звільняють якомога повніше контейнер від вмісту, обполіскують його, якщо необхідно, водою і потім 96 % спиртом і сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 1 год або, якщо природа контейнера не дозволяє використовувати нагрівання при такій температурі, сушать при більш низькій температурі до

постійної маси. Після цього охолоджують в ексікаторі і зважують. За різницею зважувань розраховують масу вмісту контейнера. Повторюють процедуру з іншими 19 контейнерами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Balaban N.P., Suleimanova A.D., Valeeva L.R., Shakirov E.V. Structural features and mechanism of catalysis of β -propellant phytases of bacilli (Review). *Biokhimiya [Biochemistry]*. 2016
2. Suzuki U, Yoshimura K, Takaishi M. 1907. Über ein enzym 'Phytase' das anhydro-oxymethylen diphosphorsäure' spalter. *Tokyo Imper. Univ. Coll. Agric. Bull.* 7:503–12
3. Муста Оглы Н.М., Шарова Н.Ю., Юшкаускайте А.Р. Фитаза микромицета *Aspergillusniger* - потенциальный пищевой микроингредиент // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. №1 (24). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/fitaza-mikromitseta-aspergillusniger-potentsialnyy-pischevoy-mikroingredient>
4. Redkozubov O. Phytase. What has changed over the past 15 years. *Kombikorma*. 2014, no. 12, pp. 71–74. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4368368/>
5. Nuobariene L, Hansen AS, Jespersen L, Arneborg N. Phytase-active yeasts from grain-based food and beer. *J Appl Microbiol*. 2011 Jun;110(6):1370-80. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04988.x. Epub 2011 Mar 16. PMID: 21352423.
6. Songré-Ouattara LT, Mouquet-Rivier C, Icard-Vernière C, Humblot C, Diawara B, Guyot JP. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. *Int J Food Microbiol*. 2008 Dec 10;128(2):395-400. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.004. Epub 2008 Sep 16. PMID: 18937991.
7. Nuobariene L, Hansen AS, Jespersen L, Arneborg N. Phytase-active yeasts from grain-based food and beer. *J Appl Microbiol*. 2011 Jun;110(6):1370-80. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04988.x. Epub 2011 Mar 16. PMID: 21352423.
8. Savita PD, Yallappa M, Nivetha N, et al. Phytate solubilizing microorganisms and enzyme phytase to combat nutritional problems in cereal-based foods. *J Bacteriol Mycol Open Access*. 2017;4(3):86-89. DOI: [10.15406/jbmoa.2017.04.00093](https://doi.org/10.15406/jbmoa.2017.04.00093)
9. Сулейманова А. Д., Тойменцева А. А., Михайлова Е. О., Шарипова М. Р. Оптимизация определения фитазной активности бактериальных штаммов // Вестник Казанского технологического университета. 2013. №20. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/optimizatsiya-opredeleniya-fitaznoy-aktivnosti-bakterialnyh-shtammov>
10. Носова Марина Владимировна, Дремучева Галина Федоровна, Костюченко Марина Николаевна, Зуева Александра Геннадьевна, Цурикова Нина Васильевна Технологические свойства мультэнзимной композиции на основе отечественных ферментных препаратов в технологии хлеба из пшеничной муки с различными хлебопекарными свойствами // Пищевая промышленность. 2019. №4. <https://cyberleninka.ru/article/n/tehnologicheskie-svoystva-multenzimnoy-kompozitsii-na-osnove-otechestvennyh-fermentnyh-preparatov-v-tehnologii-hleba-iz-pshenichnoy>
11. Пат. N 2428481, Способ получения лимонной кислоты / Т.В. Выборнова, Т.А. Никифорова, В.П. Комов, Л.Б. Пиотровский, М.А. Думпис, Е.В. Литасова. 2011. <http://www.freepatent.ru/patents/2428481>

12. Редкозубов О. Фитаза. Что изменилось за последние 15 лет // Комбикорма. 2014. N 12. С. 71-74.
http://journals.istu.edu/izvestia_biochemi/journals/2018/01/articles/09
13. Ashwani Kumar, Ashira Chanderman, Melvin Makolomakwa, Kugen Perumal & Suren Singh (2016) Microbial production of phytases for combating environmental phosphate pollution and other diverse applications, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46:6, 556-591, DOI: [10.1080/10643389.2015.1131562](https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1131562)
14. Edi Franciele Ries, Gabriela Alves Macedo, "Improvement of Phytase Activity by a New *Saccharomyces cerevisiae* Strain Using Statistical Optimization", *Enzyme Research*, vol. 2011, Article ID 796394, 6 pages, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/796394>
15. Электронный ресурс [Режим доступа]: https://www.researchgate.net/publication/8957046_Phytase_enzymology_applications_and_biotechnology
16. P Shah, K Bhavsar, S K Soni, Jayant Malhar Khire, Strain improvement and up scaling of phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volume 36, Issue 3, 1 March 2009, Page 373, <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0506-7>
17. Электронный ресурс [Режим доступа]: https://www.jmbfs.org/issue/april-may-2019-vol-8-no-5/jmbfs_203_sasirega-raman/?issue_id=5537&article_id=0
18. Qasim, S. , Shakir, K. , Al-Shaibani, A. and Walsh, M. (2017) Optimization of Culture Conditions to Produce Phytase from *Aspergillus tubingensis* SKA. *Food and Nutrition Sciences*, **8**, 733-745. doi: [10.4236/fns.2017.87052](https://doi.org/10.4236/fns.2017.87052).
19. Farias, N., Almeida, I., & Meneses, C. (2018). New Bacterial Phytase through Metagenomic Propection. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(2), 448. <https://doi.org/10.3390/molecules23020448>
20. Han, N., Miao, H., Yu, T. *et al.* Enhancing thermal tolerance of *Aspergillus niger* PhyA phytase directed by structural comparison and computational simulation. *BMC Biotechnol* **18**, 36 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0445-y>
21. Borgi, M.A., Boudebouze, S., Aghajari, N. *et al.* The attractive recombinant phytase from *Bacillus licheniformis*: biochemical and molecular characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 5937–5947 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5421-9>
22. Pandee P, Summpunn P, Wiyakrutta S, Isarankul D, Meevootisom V. A Thermostable phytase from *Neosartorya spinosa* BCC 41923 and its expression in *Pichia pastoris*. *J Microbiol*. 2011 Apr;49(2):257-64. doi: [10.1007/s12275-011-0369-x](https://doi.org/10.1007/s12275-011-0369-x). Epub 2011 May 3. PMID: 21538247
23. Wang Y, Gao X, Su Q, Wu W, An L. Cloning, expression, and enzyme characterization of an acid heat-stable phytase from *Aspergillus fumigatus* WY-2. *Curr Microbiol*. 2007 Jul;55(1):65-70. doi: [10.1007/s00284-006-0613-5](https://doi.org/10.1007/s00284-006-0613-5). Epub 2007 May 28. PMID: 17534560.

24. Pal Roy M, Mazumdar D, Dutta S, Saha SP, Ghosh S. Cloning and Expression of Phytase appA Gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and Comparison of Properties with Recombinant Enzyme Expressed in *E. coli*. *PLoS One*. 2016 Jan 25;11(1):e0145745. doi: 10.1371/journal.pone.0145745. PMID: 26808559; PMCID: PMC4726635.
25. Coban HB, Demirci A. Enhanced submerged *Aspergillus ficuum* phytase production by implementation of fed-batch fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014 Dec;37(12):2579-86. doi: 10.1007/s00449-014-1236-z. Epub 2014 Jun 24. PMID: 24958522.
26. Coban HB, Demirci A, Turhan I. Microparticle-enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production and evaluation of fungal morphology in submerged fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2015 Jun;38(6):1075-80. doi: 10.1007/s00449-014-1349-4. Epub 2015 Jan 3. PMID: 25555703.
27. Coban, H.B., Demirci, A. Screening of phytase producers and optimization of culture conditions for submerged fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng* **37**, 609–616 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1028-x>
28. Abid, N., Khatoun, A., Maqbool, A., Irfan, M., Bashir, A., Asif, I., et al. (2017). Transgenic expression of phytase in wheat endosperm increases bioavailability of iron and zinc in grains. *Transgenic Res*. 26, 109–122. doi: 10.1007/s11248-016-9983-z
29. Jatuwong, K., Suwannarach, N., Kumla, J., Penkhrue, W., Kakumyan, P., & Lumyong, S. (2020). Bioprocess for Production, Characteristics, and Biotechnological Applications of Fungal Phytases. *Frontiers in microbiology*, 11, 188. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00188>
30. Gunashree B. Shivanna, Govindarajulu Venkateswaran, "Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid-State Fermentation", *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 392615, 6 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/392615>
31. A Kanti and I. M Sudiana 2018 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 166 012010 <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/166/1/012010>
32. "Optimization of Culture Conditions to Produce Phytase from *Aspergillus tubingensis* SKA" written by Samar S. Qasim, Khalida A. Shakir, A. B. Al-Shaibani, Marie K. Walsh, published by *Food and Nutrition Sciences*, Vol.8 No.7, 2017 <https://www.scirp.org/journal/papercitationdetails.aspx?PaperID=77602&JournalID=208>
33. Tian, M., & Yuan, Q. (2016). Optimization of phytase production from potato waste using *Aspergillus ficuum*. *3 Biotech*, 6(2), 256. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0573-9>
34. Bogar, B., Szakacs, G., Pandey, A., Abdulhameed, S., Linden, J. C., & Tengerdy, R. P. (2003). Production of phytase by *Mucor racemosus* in solid-state fermentation. *Biotechnology progress*, 19(2), 312–319. <https://doi.org/10.1021/bp020126v>
35. Ghada E.A. Awad, Mohamed M.I. Helal, Enas N. Danial, Mona A. Esawy, Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid

- state fermentation by using Box–Behnken design, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 21, Issue 1, 2014, Pages 81-88, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.06.004>.
36. Priyanka Buddhiwant, Kavita Bhavsar, V. Ravi Kumar & Jayant M. Khire (2016) Phytase production by solid-state fermentation of groundnut oil cake by *Aspergillus niger*: A bioprocess optimization study for animal feedstock applications, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46:6, 531-538, DOI: [10.1080/10826068.2015.1045606](https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1045606)
 37. Augspurger, N. R., Webel D.M., Lei X.G., Baker D.H. (2015) Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. *J. Anim. Anim.* <http://download.garuda.ristekdikti.go.id/article.php?article=741802&val=11685&title=Effect%20of%20culture%20conditions%20on%20phytase%20production%20by%20Aspergillus%20ficuum%20in%20solid-state%20fermentation%20using%20rice%20bran%20as%20substrate>
 38. McKinney K, Combs J, Becker P, Humphries A, Filer K, Vriesekoop F. Optimization of Phytase Production from *Escherichia coli* by Altering Solid-State Fermentation Conditions. *Fermentation*. 2015; 1(1):13-23. <https://doi.org/10.3390/fermentation1010013>
 39. Edi Franciele Ries, Gabriela Alves Macedo, "Improvement of Phytase Activity by a New *Saccharomyces cerevisiae* Strain Using Statistical Optimization", *Enzyme Research*, vol. 2015, Article ID 796394, 6 pages, 2015. <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/260/1/ME4.pdf>
 40. Ibrahim, D., and Lim, S.-H. (2014). "Utilization of palm kernel cake as a novel substrate for phytase production by *Aspergillus niger* USM A11," *BioRes.* 9(1), 1488-1497. <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/utilization-of-palm-kernel-cake-as-a-novel-substrate-for-phytase-production-by-aspergillus-niger-usm-a11/>
 41. Neira-Vielma, A. A., Aguilar, C. N., Ilyina, A., Contreras-Esquivel, J. C., Carneiro-da-Cunha, M. G., Michelena-Álvarez, G., & Martínez-Hernández, J. L. (2018). Optimized production of phytase by solid-state fermentation using triticale as substrate and source of inducer. *African Journal of Biotechnology*, 17(4), 81-90. <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text/2A73D7E55742>
 42. Aguilar, C. N.; G., Gutierrez-Sanchez; P. A., Rado- Barragan; R., Rodriguez-Herrera; J. L., Martinez-Hernandez and J. C. ContrerasEsquivel 2016. Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(4): 354-366 <https://iasj.net/iasj/article/127480>
 43. Jatuwong, K., Suwannarach, N., Kumla, J., Penkhrue, W., Kakumyan, P., & Lumyong, S. (2020). Bioprocess for Production, Characteristics, and Biotechnological Applications of Fungal Phytases. *Frontiers in microbiology*, 11, 188. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00188>
 44. Qasim Al-Ta'ay, Samar. (2016). PURIFICATION OF PHYTASE PRODUCED FROM A LOCAL FUNGAL ISOLATE AND ITS APPLICATIONS IN FOOD SYSTEMS. *The Iraqi Journal of Agricultural Sciences*. 47. 112-120. https://www.researchgate.net/publication/314038723_PURIFICATION_OF_PHY

TASE PRODUCED FROM A LOCAL FUNGAL ISOLATE AND ITS APPLICATIONS IN FOOD SYSTEMS

45. Naves, L de P, Corrêa, AD, Bertechini, AG, Gomide, EM, & Santos, CD dos. (2012). Effect of pH and temperature on the activity of phytase products used in broiler nutrition. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 14(3), 181-185. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2012000300004>
46. Yu, P., Chen, Y. Purification and characterization of a novel neutral and heat-tolerant phytase from a newly isolated strain *Bacillus nealsonii*ZJ0702. *BMC Biotechnol* 13, 78 (2013). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-78>
47. Gunashree B. Shivanna, Govindarajulu Venkateswaran, "Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid-State Fermentation", *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 392615, 6 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/392615>
48. Gaiind, S., & Nain, L. (2015). Soil-Phosphorus Mobilization Potential of Phytate Mineralizing Fungi. *Journal of Plant Nutrition*, 38(14), 2159–2175. doi:10.1080/01904167.2015.1014561
49. "Optimization of Culture Conditions to Produce Phytase from *Aspergillus tubingensis* SKA" written by Samar S. Qasim, Khalida A. Shakir, A. B. Al-Shaibani, Marie K. Walsh, published by *Food and Nutrition Sciences*, Vol.8 No.7, 2017 <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=77602>
50. Сулейманова А. Д., Данилова Ю. В., Грайнер Р., Шарипова М. Р. Новая бактериальная внутриклеточная фитаза энтеробактерий: выделение и характеристика // *Биоорганическая химия*. – 2013. – Т. 39. - № 4. – С. 424-429. <https://core.ac.uk/download/pdf/197374017.pdf>
51. Вивчення фізико-хімічних та біохімічних властивостей фітази Ладозим Проксі з метою її модифікації та підвищення ефективності використання як кормової добавки / С.В.Мерзлов, В.С.Бітюцький, О.М.Мельниченко, Л.В.Мороз // *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва: збірник наукових праць* .- Біла Церква: БНАУ, 2010 .- Вип. 4(77) .- С. 13-17. http://193.138.93.8/bitstream/BNAU/3747/1/Vyvchennia_fizyko-khimich.pdf
52. БОЗ ЕЛЕН, ОМЕЛЯ АНДРЕ, МУЛЕН ГІ. ФІТАЗА *DEBARYOMYCES CASTELLII* 10.06.2011, Бюл.№ 11, 2011 p <https://uapatents.com/39-94712-fitaza-debaryomyces-castellii.html#recent>
53. І. Ю. Горбатенко, О. О. Кравченко – ТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ, : учеб. пособие для вузов / Миколаївський національний аграрний університет, 2020 http://dspace.mnau.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/7928/1/Tekhnolohii_mikrobnoho%20syntezu.pdf
54. Muhammad Irshad, Muhammad Asgher, Khizar Hayat Bhatti, Muddassar Zafar and Zahid Anwar, 2017. Anticancer and Nutraceutical Potentialities of Phytase/Phytate. *International Journal of Pharmacology*, 13: 808-817.
55. Kumar, V., Sinha, AK., Makkar, HPS., Klaus, Becker (2010) Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review, *Food Chemistry* 120, 945–959.

56. Bhowmik, A., Ojha, D., Goswami, D., et al. (2017) Inositol hexa phosphoric acid (phytic acid), a nutraceuticals, attenuates iron-induced oxidative stress and alleviates liver injury in iron overloaded mice. *Biomed. Pharmacother.* 87, 443-450.
57. Greiner, R., Konietzny, U (2007) Functional properties of phytate. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, 32, 75-89.
58. Aguree S, Guo L, Reddy MB. Phytic Acid Protects from Oxidative Stress Induced by Iron-Overload and High-Fat Diets in β 2-Microglobulin Knockout Mice. *Molecules.* 2020 Nov 15;25(22):5331. doi: 10.3390/molecules25225331. PMID: 33203173; PMCID: PMC7697163.
59. Greiner, Ralf & Konietzny, Ursula. (2005). Phytase for Food Application. *Food Technol Biotechnol.* 44.
60. 1993–2005: WHO global database on anaemia. Geneva: World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention, 2008.
61. Boukhris I, Smaoui S, Ennouri K, Morjene N, Farhat-Khemakhem A, Blibech M, Alghamdi OA, Chouayekh H. Towards understanding the antagonistic activity of phytic acid against common foodborne bacterial pathogens using a general linear model. *PLoS One.* 2020
62. Любарська Л.С.
Порівняльна оцінка харчових продуктів за вмістом мікроелементів цинку та міді / Л.С.Любарська, М.П.Гуліч, Ємченко Н.Л. // Гігієна населених місць. - №66. – 2015.- С. – 187 – 194 (*Проведення досліджень, підготовка матеріалу до публікації*)
63. Prasad A.S. et al. (1976) Trace Elements in Human Health and Disease. Vol. I. Academic Press, New York, pp. 391–413
64. Prasad A.S. (2009) Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 12(6): 646–652.
65. Бойко М.І., Бойко О.М. (2011) Роль цинку у функціонуванні репродуктивної системи. *Медицина газета «Здоров'я України XXI сторіччя»*, 15–16: 55
66. Barrett J.T. (1978) Textbook of Immunology (St. Louis: The C.V. Mosby Company), 320
67. Nielsen, A.V.F.; Tetens, I.; Meyer, A.S. Potential of Phytase-Mediated Iron Release from Cereal-Based Foods: A Quantitative View. *Nutrients* 2013
68. Статистичний щорічник України. –К.: Держкомстат України, 2011. –95 с
69. А. М. Сердюк, Е. М. Білецька, 2004; Бабенко Г.А., 2001, Шабров А.В. и др., 2003; М.П.Гуліч, Н.С.Полька, 2008; Н.В. Нагорная, 2009
70. Brnić, M., Hurrell, R., Songré-Ouattara, L. et al. Effect of phytase on zinc absorption from a millet-based porridge fed to young Burkinabe children. *Eur J Clin Nutr* 71, 137–141 (2017). <https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.199>
71. Савинов В. А., Самбук Е. В., Падкина М. В. Природные и рекомбинантные фитазы микроорганизмов // *Biological Communications.* 2007. №2.
72. Pires, E.B.E., de Freitas, A.J., Souza, F.F.e. et al. Production of Fungal Phytases from Agroindustrial Byproducts for Pig Diets. *Sci Rep* 9, 9256 (2019).
73. Gunashree B. Shivanna, Govindarajulu Venkateswaran, "Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and

- Solid-State Fermentation", *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 392615, 6 pages, 2014.
- 74.ГОСТ 31487-2012. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности фитазы.
 75. Ibatullin, I.I., Melnik, Yu.F., Otchenachenko, B.B. (2015). *Praktikum z godivli silskohospodarskich tvarin: navchalnii posibnik. Praktikum z godivli silskohospodarskich tvarin: navchalnii posibnik.* Kiev
 - 76.Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение. // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2006. – Т. 42, №2. — С. 133–143.
 77. Hussain, Muhammad Sajid and Hafeez, Abdul and Ali, Mahmood and Hussain, Syed Makhdoom, *Phytase Activity In Human Nutrition 2019*
 - 78.Цыперович А.С. Ферменты (основы химии и технологии). — К.: Техніка, 1971. — 361 с.
 - 79.Zhang G. Q., Chen Q. J., Sun J., Wang H. X., Han C. H. (2013a). Purification and characterization of a novel acid phosphatase from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. *J. Basic Microbiol.* 53 868–875. 10.1002/jobm.201200218.
 - 80.de Oliveira Ornela P. H., Guimaraes L. H. S. (2019). Purification and characterization of an alkalistable phytase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* in submerged fermentation. *Process Biochem.* 81 70–76. 10.1016/j.procbio.2019.03.015 .
 - 81.Sariyska M. V., Gargova S. A., Koleva L. A., Angelov A. I. (2005). *Aspergillus niger* phytase: purification and characterization. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 19 98–105. 10.1080/13102818.2005.10817235
 - 82.Shion A., Harada M., Takahashi H., Adachi M. // *Langmuir.* 1997. 13. № 4. P. 609
 - 83.Нолтинг, Б. Новейшие методы исследования биосистем / Б.Нолтинг. - М.: Техносфера, 2005.- 254 с.
 - 84.Lunn, G. *Chromatography* // *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.* — 4th. — New York : John Wiley & Sons, 2004. — ISBN 978-0-471-48517-9 — DOI
 - 85.Garrett RH, Grisham CM (2013). *Biochemistry (5th ed.). Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning.* p. 108. ISBN 9781133106296. OCLC 1066452448.
 - 86.Paul-Dauphin, S; Karaca, F; Morgan, TJ; et al. (6 Oct 2007). "Probing Size Exclusion Mechanisms of Complex Hydrocarbon Mixtures: The Effect of Altering Eluent Compositions". *Energy & Fuels.* 6. 21 (6): 3484–3489. doi:10.1021/ef700410e
 - 87.Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (2006). "Ch. 28. Liquid Chromatography" (PDF). *Principles of instrumental analysis*(6th ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. p. 816. ISBN 9780495012016. LCCN 2006926952. OCLC 7722439.

88. "Instructions for Sephadex Media" (PDF). gelifesciences.co.jp (product manual). GE Healthcare. Apr 7, 2008. Retrieved Jan 2, 2019.
89. A Kanti and I. M Sudiana 2018 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 166 012010
90. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов: Учеб. для студ. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.
91. Энциклопедический справочник. Современные лекарства. - М.: Русское энциклопедическое товарищество, 2005; М.: ОЛМА-ПРЕСС, 2005
92. Лікарські засоби і готові лікарські форми. Організація зберігання фармацевтичних товарів на аптечних складах і в аптечних умовах. / Градусов В.І., Оридорога Л.М., Винник О.В. та ін. — Х., 1999. — 72 с
93. ГОСТ 31487-2012. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности фитазы.
94. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006.
95. В.І. Кабачний, Л.К. Осипенко, Л.Д. Грицан та ін. — Х., / Фізична і колоїдна хімія 1999.
96. Shivanna GB and Venkateswaran G: Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through submerged and solid-state fermentation. The Scientific World Journal 2014; 1-6.