

**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
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » лютого 2026 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » лютого 2026 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

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

освітньо-професійної програми

«Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: «Біосинтез α -амілази *Aspergillus oryzae*»

Виконав: здобувач V курсу, групи ЗБТ-5-1

КУЧЕРУК Юрій Андрійович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____
(прізвище, і'мя) (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 – 2026 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” грудня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Кучерука Юрія Андрійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез α -амілази *Aspergillus oryzae*».

керівник роботи РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович, доцент, кандидат технічних наук.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28.11.2025 року № 957к

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2026

3. Вихідні дані до роботи Цільовий продукт біосинтезу – α -амілаза. Біологічний агент – *Aspergillus oryzae* OSI1013. Об'єм ферментера для виробництва – 1 м³, коефіцієнт заповнення складає 0,6. Активність готового продукту – 7984 ОД/мл.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; біосинтез цільового продукту; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; виділення та очищення цільового продукту; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема виробництва α -амілази (формат А1) – 2 аркуші.

Технологічна схема біосинтезу α -амілази (формат А1) – 1 аркуш.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 грудня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Отримання завдання та підбір літератури	01.12.2025 – 05.12.2025	
2	Написання Розділу 1. Характеристика цільового продукту	06.12.2025 – 15.12.2025	
3	Написання Розділу 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	16.12.2025 – 25.12.2025	
4	Написання Розділу 3. Техніко-економічне обґрунтування	26.12.2025 – 05.01.2026	
5	Написання Розділу 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	06.01.2026 – 15.01.2026	
6	Написання Розділу 5. Специфікація обладнання	16.01.2026 – 20.01.2026	
7	Написання Розділу 6. Опис технологічної схеми	21.01.2026 – 22.01.2026	
8	Написання Розділу 7. Основні етапи виділення та очищення	23.01.2026 – 24.01.2026	
9	Написання Розділу 8. Контроль виробництва	24.01.2026 – 25.01.2026	
10	Оформлення кваліфікаційної роботи	26.01.2026 – 27.01.2026	
11	Оформлення графічної частини	28.01.2026 – 30.01.2026	

Здобувач _____
(підпис)

Юрій КУЧЕРУК
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юрій РЕЗНІЧЕНКО
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

In the qualification work, a technological and instrumental scheme for the biosynthesis of α -amylase using *Aspergillus oryzae* OSI1013, a fungus that synthesizes enzyme with activity up to 7,984 U/ml, was developed. α -Amylase can be used in the brewing industry for the liquefaction of starch in unmalted grain adjuncts during mashing.

The estimated production capacity of the enzyme preparation was 3,600 l of product per year. The technological scheme of α -amylase biosynthesis includes auxiliary work (preparation of aeration air, preparation and sterilization of the nutrient medium), as well as the technological process itself (three stages of growing seed material (in flasks on shakers, in inoculators with a volume of 10 l and 100 l) and biosynthesis in a fermenter with a volume of 1.0 m³ with a filling factor of 0.6. The scheme of α -amylase isolation and purification is also given.

The qualification work consists of an introduction, eight chapters, a list of used literature (58 items), technological and apparatus schemes. The total volume of the work is 101 pages, 16 tables, 8 figures.

Keywords: α -amylase, *Aspergillus oryzae*, enzyme preparation, brewing, submerged cultivation, technological scheme, apparatus scheme.

РЕФЕРАТ

У кваліфікаційній роботі розроблено технологічну та апаратурну схеми біосинтезу α -амілази за допомогою *Aspergillus oryzae* OSI1013 - гриба, який синтезує фермент з активністю до 7 984 ОД/мл. α -Амілаза може застосовуватися у пивоварній промисловості для розрідження крохмалю несолоджених зернових добавок на стадії затирання.

Розрахована потужність виробництва ферментного препарату склала 3 600 л продукту на рік. Технологічна схема біосинтезу α -амілази включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка і стерилізація поживного середовища), а також безпосередньо технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 10 л та 100 л) та біосинтез у ферментері об'ємом 1,0 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Також наведено схему виділення та очищення α -амілази.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (58 найменувань), технологічної та апаратурної схем. Загальний обсяг роботи – 101 сторінка, 16 таблиць, 8 рисунків.

Ключові слова: α -амілаза, *Aspergillus oryzae*, ферментний препарат, пивоваріння, глибинне культивування, технологічна схема, апаратурна схема.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту α -амілази	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ α -АМІЛАЗИ.....	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного	15
середовища для його культивування	15
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	28
3.1. Розрахунок потреби в цільовому продукті	28
Оцінка загальної маси зернової сировини.	28
Для світлих сортів пива, що становлять основу ринку, типовий витратний коефіцієнт засипу становить 16–20 кг/гЛ [2, 5].	28
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	31
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	33
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	34
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	38
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.	38
4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища	43
4.3.1. Особливості підготовки і стерилізації середовища для одержання інокуляту в колбах	44
4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах та виробничому ферментері	46
4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації середовища для виробничого біосинтезу	50
4.4. Обґрунтування вибору титрувальних агентів для регуляції рН у процесі біосинтезу цільового продукту	52
4.5. Обґрунтування вибору піногасника	56
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА α -АМІЛАЗИ.....	59
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	62
РОЗДІЛ 7. ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ α -АМІЛАЗИ.....	73
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	76

8.1. Мікробіологічний контроль.....	76
8.1.1. Висів на агаризовані поживні середовища	76
8.1.2. Мікроскопіювання.....	79
8.2. Технологічний контроль	80
8.2.1. Визначення концентрації біомаси	80
8.2.2. Визначення активності ферменту α -амілази.....	81
8.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення	83
8.2.4. Визначення концентрації джерела азотного живлення.....	84
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:	87
ДОДАТКИ:	95

ВСТУП

Ферментні препарати α -амілази займають ключове місце у сучасній харчовій промисловості, оскільки каталізують гідроліз α -1,4-глюкозидних зв'язків у крохмалі з утворенням декстринів та низькомолекулярних цукрів. Це дає змогу інтенсифікувати процеси осахарення крохмалевмісної сировини, підвищувати вихід ферментованих вуглеводів і керувати реологічними властивостями напівпродуктів у технологіях виробництва напоїв, хлібобулочних та кондитерських виробів, крохмалепродуктів тощо.

У пивоварінні α -амілаза особливо важлива для розрідження крохмалю несолоджених зернових добавок (кукурудзи, пшениці, ячмінної крупи тощо) під час затирання, що дозволяє працювати з високими частками несоложеної сировини без погіршення якості суслу і готового пива.

Серед промислових продуцентів α -амілази значне поширення має філаментозний гриб *Aspergillus oryzae*, відомий як «кожі-цвіль», який десятиліттями використовується у харчових технологіях Східної Азії та вважається організмом з низьким рівнем ризику за умов контролю процесу ферментації. На основі штаму *A. oryzae* OSI1013, що характеризується високою продуктивністю (максимальна активність близько 7 984 ОД/мл за 72 години глибинного культивування), у даній роботі проєктується виробництво рідкого ферментного препарату α -амілази з активністю, придатною для прямого використання в технології пивоваріння.

Пивоварна галузь України є одним із основних споживачів ферментних препаратів. За даними Державної служби статистики України та галузевих повідомлень, обсяг виробництва пива у 2024 році становив близько 140 млн дал, демонструючи ознаки відновлення після воєнного спаду. За таких умов виробники пива дедалі активніше застосовують несолоджені зернові добавки для зниження собівартості продукції, що підвищує потребу у використанні високоефективних

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ док.м.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кучерук Ю.А.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Архів
Консульт.							8	101
Керівник		Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. кафедри		Стабніков В.П.						

препаратів α -амілази. Комерційні ферментні препарати для пивоваріння та випічки на українському ринку представлені переважно імпортними продуктами провідних світових виробників, тоді як вітчизняні аналоги займають обмежену нішу. Це зумовлює залежність галузі від зовнішніх постачань та валютних коливань, а також створює передумови для розвитку локального виробництва α -амілази із заданими характеристиками.

Метою даного курсового проєкту є техніко-економічне обґрунтування промислового виробництва рідкого ферментного препарату α -амілази на основі штаму *Aspergillus oryzae* OSI1013 для потреб пивоварної промисловості України.

Актуальність даної роботи зумовлена необхідністю зменшення імпортозалежності пивоварної галузі України у частині ферментних препаратів α -амілази, забезпечення стабільної якості продукції за умов використання високих часток несолоджених зернових добавок, а також прагненням до оптимізації витрат на сировину та енергоресурси. Локальне виробництво α -амілази на основі високопродуктивного штаму *A. oryzae* OSI1013, орієнтоване на покриття щонайменше 50 % розрахованої потреби пивоварної галузі, створює передумови для підвищення технологічної гнучкості підприємств та формування доданої вартості всередині країни.

Науково-практична новизна курсового проєкту полягає в поєднанні в єдиній логіці трьох блоків: (1) ринкової оцінки попиту на α -амілазу для пивоварної промисловості України; (2) параметрів глибинного культивування штаму *A. oryzae* OSI1013 з урахуванням досягнутого титру ферменту та (3) техніко-економічних розрахунків потужності виробництва, об'єму ферментаційного обладнання й багатостадійної посівної схеми. Такий підхід формує основу для подальшої деталізації матеріальних та енергетичних балансів, оцінки собівартості й планування поетапного розширення виробництва α -амілази.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ А-АМІЛАЗИ

α -Амілаза (КФ 3.2.1.1) - це фермент, який належить до класу гідролаз і відіграє ключову роль у каталізі гідролізу внутрішніх α -1,4-глікозидних зв'язків у крохмалі, глікогені та споріднених полісахаридах. Цей фермент є одним з найбільш затребуваних у біотехнології та промисловості завдяки своїй здатності розщеплювати крохмаль до олігосахаридів, таких як глюкоза, мальтоза та мальтотріоза. Один з ключових ферментів у промисловій біотехнології, що становить близько 25% світового ринку ферментів [1]. Препарати мікробних α -амілаз майже повністю витіснили методи хімічного гідролізу крохмалю завдяки їх вищій стабільності, специфічності та можливості економічно ефективного великомасштабного виробництва, оскільки мікроорганізми легко піддаються генетичним маніпуляціям для отримання ферментів із бажаними характеристиками [1].

Залежно від біологічного джерела, α -амілази класифікують на дві основні промислово значущі групи: грибні та бактеріальні, які суттєво відрізняються за своїми біохімічними властивостями та спектром застосування.

Грибні α -амілази, що продукуються переважно мікроміцетами родів *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. niger*) та *Penicillium*, характеризуються оптимальною активністю в помірно кислому середовищі (рН 4.5–6.5) та відносно низькою термостабільністю. Ці властивості роблять їх ідеальними для процесів, що не вимагають високих температур, таких як хлібопечення, виробництво кондитерських виробів та ферментація кормів. Вони секретуються екстрацелюлярно, що значно спрощує їх виділення та очищення. Цінність представляє *Aspergillus*, здатний продукувати фермент за низьких значень рН (до 3,0), що мінімізує ризик бактеріальної контамінації. Більшість грибних амілаз мають статус GRAS (Generally Recognized As Safe), що робить їх пріоритетними для харчової промисловості [1].

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кучерук Ю.А.			РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту α - амілази	Літ.	Арк.	Архів
Консульт.							10	101
Керівник		Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. кафедри		Стабніков В.П.						

Бактеріальні α -амілази, зокрема ті, що синтезуються представниками роду *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*), вирізняються високою термостабільністю та здатністю функціонувати в широкому діапазоні рН, часто з оптимумом у нейтральній або слаболужній зоні. Їхня виражена термофільність (оптимальна діяльність при 100–110 °С) є ключовою перевагою для таких промислових процесів, як високотемпературне розрідження крохмалю, виробництво біоетанолу та використання у складі синтетичних мийних засобів. Існують також галофільні бактеріальні амілази, отримані з мікроорганізмів, таких як *Chromohalobacter* sp. та *Haloarcula hispanica*, що зберігають активність за високих концентрацій солей [1].

Основним субстратом для α -амілази є крохмаль - головний запасний полісахарид рослин, що складається з двох полімерів: амілози (20–25%) та амілопектину (75–80%). Амілоза є лінійним полімером з α -1,4-глікозидними зв'язками, тоді як амілопектин - розгалуженим, що містить як α -1,4, так і α -1,6-глікозидні зв'язки.

Структура та властивості α -амілази. α -Амілаза належить до 13-го сімейства глікозид-гідролаз (GH-13). Це ендоамілаза, що розщеплює глікозидні зв'язки випадковим чином всередині крохмальної молекули, швидко знижуючи в'язкість розчину крохмалю. Більшість мікробних α -амілаз є металоферментами, активність яких залежить від присутності іонів кальцію (Ca^{2+}), що стабілізують їхню структуру.

Молекулярна маса та структура ферменту варіюють залежно від джерела. Наприклад, α -амілаза з мікробних джерел зазвичай є мономерним білком, що складається з одного поліпептидного ланцюга, який містить близько 512 амінокислотних залишків, з молекулярною масою приблизно 57,6 кДа. Просторова структура α -амілази складається з трьох доменів (А, В, С). Найбільший домен А має характерну консервативну структуру $(\beta/\alpha)_8$ -бочки, де розташований активний центр ферменту (рис.1.).

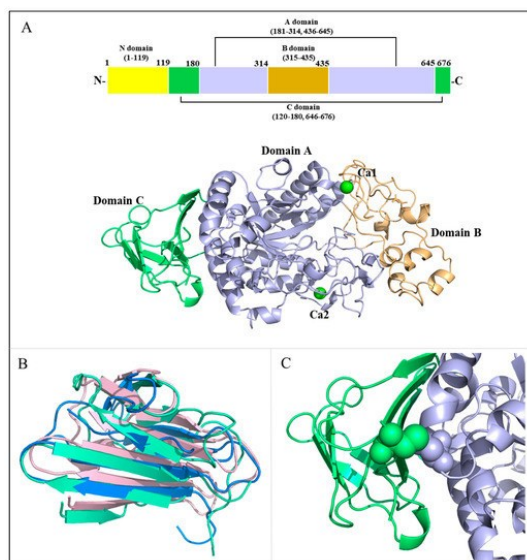


Рис.1. Тривимірна структура α -амілази з її доменами А, В та С [2].

Механізм дії та специфічність. Механізм дії α -амілази полягає у гідролізі внутрішніх α -1,4-глікозидних зв'язків у молекулах амілози та амілопектину. Це призводить до утворення декстринів та олігосахаридів різної довжини. Важливою особливістю є те, що α -амілаза не здатна гідролізувати кінцеві глюкозні залишки та α -1,6-глікозидні зв'язки, які утворюють точки розгалуження в амілопектині. Таким чином, кінцевими продуктами її дії є суміш олігосахаридів, а не вільна глюкоза.

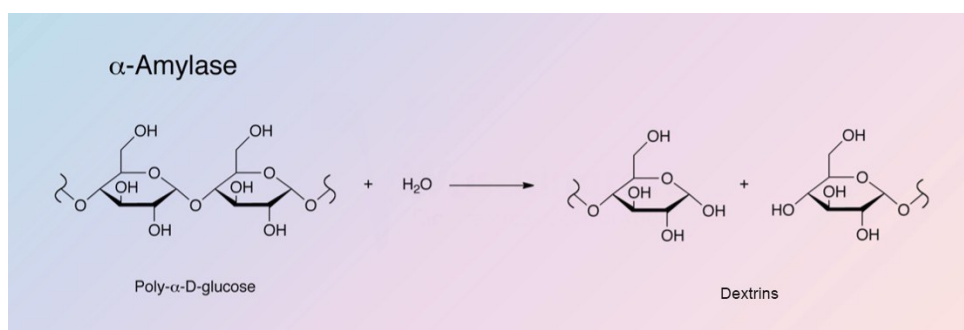


Рис.1.2. Механізм дії α -амілази на молекулу крохмалю, показуючи розщеплення α -1,4-зв'язків та утворення декстринів [3].

Оптимальні умови функціонування. Оптимальна активність α -амілази зазвичай спостерігається при нейтральному або злегка кислому рН, в діапазоні від 6,0 до 7,0. Температурний оптимум для більшості мікробних ферментів знаходиться в діапазоні від 40 до 60 °С. Однак існують термофільні α -амілази, отримані, наприклад, з бактерій родів *Bacillus* або *Thermococcus*, що залишаються активними при температурах 80–100 °С, що є важливим для промислових процесів, які вимагають високих температур.

Вплив іонів металів. Активність ферменту значно залежить від присутності іонів металів. Іони, такі як Ca^{2+} , є важливими кофакторами, які стабілізують тривимірну структуру ферменту та підвищують його термостабільність. Іони K^+ , Na^+ та Mg^{2+} також можуть підвищувати його активність. Водночас, іони важких металів, такі як Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} та Fe^{3+} , діють як сильні інгібітори, оскільки вони можуть зв'язуватися з активним центром ферменту та блокувати його функцію.

Промислове застосування. Завдяки своїм властивостям α -амілаза широко використовується в харчовій промисловості (хлібопечення для покращення текстури та об'єму, пивоваріння, виробництво глюкозних та фруктозних сиропів), текстильній (для видалення крохмального шліхту з тканин у процесі десайзингу), паперовій (для модифікації крохмалю, що використовується для покриття паперу), а також у виробництві мийних засобів для видалення крохмальних плям та біоетанолу для перетворення крохмальної сировини у ферментовані цукри.

Відомими комерційними препаратами α -амілази є Termamyl®, Fungamyl 800 L, BAN®, Amizyme®, а також препарати під торговими марками Alfalad та Hot Rod α -amylase. Виробниками α -амілази, представленої на ринку у фасовках від 100 г, 1 кг, 5 кг до 25–30 кг і промислових контейнерах (до 1 тонни), є провідні міжнародні компанії Novozymes (Данія; продукти Termamyl®, Fungamyl®, BAN®), PMP Fermentation Products (США; Amizyme®), а також вітчизняна компанія ENZIM Biotech (Україна; продукт «Alfalad», фасування: пакет 100 г, 1 кг, мішок 5, 10, 25 кг (рис.3.)). Додатково на ринку доступні α -амілази торгової марки Hot Rod (Китай/ЄС, фасування 100 г) для харчового та побутового використання, а також професійні препарати для пивоваріння й крохмале-переробки у фасуваннях від 1 до 25 кг та IBC-контейнерах (Termamyl® SC 4X, Fungamyl 800 L) [4–9].



Рис.1.3. Альфалад БН (альфа-амілаза бактеріальна низькотемпературна)
ENZIM [4].

З огляду на важливу роль α -амілази у численних галузях промисловості, а також її здатність ефективно каталізувати гідроліз крохмалю до цінних оліго- і моносахаридів, особливо актуальним є вдосконалення біотехнологічних підходів до її отримання. Практична цінність цього ферменту визначається широким спектром його застосування - від харчової до паперової та текстильної промисловості, що обумовлює стабільно високий попит на α -амілазу. У цьому контексті вибір оптимального продуцента та раціонального складу поживного середовища є вирішальним чинником для підвищення виходу ферменту й економічної ефективності процесу біосинтезу. Саме тому пошук та впровадження нових штамів мікроорганізмів, удосконалення умов культивування і застосування сучасних технологій мають ключове значення для забезпечення потреб сучасної біотехнологічної галузі.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ α -АМІЛАЗИ

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

Ферменти групи амілаз в тому чи іншому вигляді знаходяться в більшості живих істот на Землі, і наразі у світі активно зростає продукція α -амілази через її широкий спектр використання в харчовій, фармацевтичній та біотехнологічній промисловості. α -Амілаза є ключовим інструментом грубого гідролізу крохмалю, що, в свою чергу, є важливим для використання борошна або решток крохмалевмісних культур для біотехнологічного виробництва широкого спектру продуктів, від біогазу до рекомбінантних білків та харчових добавок [10].

Оскільки α -амілази досить широко зустрічаються у живих організмів, цьому комплексу ферментів властива значна варіабельність ознак, особливо таких як: температура максимальної активності, рН максимальної активності, ферментативна активність, ізoeлектрична точка та ін.. Загалом α -амілази, що отримуються на мікробіологічному виробництві, прийнято розділяти на грибні (найчастіше *Aspergillus oryzae*) та бактеріальні (найчастіше *Bacillus subtilis*). Грибні α -амілази активні при середніх температурах (30-45°C) та низькому рН середовища; вони, залежно від ступеня очищення, можуть бути дешевшими за бактеріальні, оскільки субстратом для грибів переважно служать рослинні рештки або залишки харчових продуктів. Бактеріальні α -амілази найчастіше є високотемпературними (60-105°C) і частіше застосовуються в харчовій промисловості, бо через високу температуру процесу менше піддаються контамінації сторонньою мікрофлорою протягом гідролізу. [11,12]

Останніми роками головним інтересом вчених є дослідження та оптимізація штамів-продуцентів α -амілаз для підвищення їх ефективності.

НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ

Змн.	Лист.	№ докцм.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кучерук Ю.А.			Літ.	Арк.	Архів
Консульт.						15	101
Керівник		Резніченко Ю.М.			Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Зав. кафедри		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ДЛЯ БІОСИНТЕЗИ		

Розглянемо три штами *Aspergillus oryzae*, які продемонстрували високу продуктивність та пропонують різні стратегії культивування, детально описані в Таблиці 2.1: *Aspergillus oryzae* NRRL695, *Aspergillus oryzae* S2, та *Aspergillus oryzae* (OSI1013). [13,18,19]

Аналізуючи дані з Таблиці 2.1 та відповідних наукових публікацій:

- *Aspergillus oryzae* NRRL695 культивувався методом твердофазного культивування на суміші агропромислових відходів: соєвого лушпиння (45%) та відходів борошна (55%), зволжених сольовим розчином (KH_2PO_4 , NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та ін.). Максимальна активність α -амілази близько 6040 ОД/мл екстракту (що відповідає 45900 ОД/г сухого субстрату при масштабуванні) була досягнута за 144 години (6 діб) культивування при 30°C. Цей метод є привабливим завдяки валоризації дешевих відходів. [13]
- *Aspergillus oryzae* S2 вирощувався методом глибинного культивування з підживленням (fed-batch). Оптимізоване середовище містило крохмаль, сечовину, соєве борошно, мінеральні солі та Твін 80. Максимальна активність α -амілази 1220 ОД/мл була отримана після тривалого культивування при 24°C та рН 5.5, з контрольованою аерацією, перемішуванням та стратегією підживлення крохмалем. [18]
- *Aspergillus oryzae* (OSI1013) культивувався глибинним методом у періодичному режимі з використанням інноваційного мішального пристрою (Swingstir impeller). Поживне середовище було багатим на компоненти: глюкоза (30 г/л), пептон (10 г/л), дріжджовий екстракт (5 г/л) та розчинний крохмаль (100 г/л). За 72 години культивування при 30°C була досягнута дуже висока активність α -амілази – 7984 ОД/мл.

Для економічної оцінки розглянемо вартість поживних середовищ (Таблиця 2.2) та умовну вартість одиниці ферменту (Таблиця 2.3). Згідно з Таблицею 2.2, найдешевшим є поживне середовище для *A. oryzae* S2 (13.1 грн/л), за ним слідує середовище для *A. oryzae* NRRL695 (18.33 грн/л, що фактично є вартістю екстрагенту для твердоф.культивування), а найдорожчим є середовище для *A. oryzae* (OSI1013)

(26.08 грн/л) через використання дорогих компонентів, таких як пептон та дріжджовий екстракт у високих концентраціях.

Аналіз Таблиці 2.3 показує наступне:

- *A. oryzae* NRRL695: умовна вартість 1 ОД амілази становить 0.003 грн, а швидкість накопичення ферменту – 41.94 ОД/мл год⁻¹.
- *A. oryzae* S2: умовна вартість 1 ОД амілази – 0.0109 грн, а швидкість накопичення (згідно таблиці) – лише 0.6 ОД/мл год⁻¹. Варто зазначити, що розрахункова швидкість накопичення на основі активності 1200 ОД/мл за 180 годин становить 6.67 ОД/мл год⁻¹, що значно вище, ніж вказано в таблиці, але все одно нижче за інші штами.
- *A. oryzae* (OSI1013): умовна вартість 1 ОД амілази – 0.0033 грн, а швидкість накопичення є найвищою – 110.8 ОД/мл год⁻¹. [18]

Згідно з оцінкою вартості кінцевого продукту та швидкості його накопичення, *Aspergillus oryzae* ф демонструє найвищу швидкість продукування α -амілази (110.8 ОД/мл год⁻¹) при умовній вартості 0.0033 грн/ОД, що є дуже близьким до найдешевшого варіанту *A. oryzae* NRRL695 (0.003 грн/ОД, швидкість накопичення 41.94 ОД/мл год⁻¹). Штам *A. oryzae* S2, згідно з табличними даними, показує значно вищу вартість за одиницю активності та нижчу швидкість накопичення. Хоча *A. oryzae* NRRL695 використовує надзвичайно дешеві субстрати (відходи) і має найнижчу умовну вартість ферменту, його швидкість накопичення та об'ємна продуктивність (ОД/мл) значно поступаються штаму *A. oryzae* (OSI1013). Враховуючи значно вищу швидкість процесу та високу об'ємну активність, що дозволяє скоротити час виробничого циклу та потенційно зменшити капітальні витрати на обладнання, культивування *Aspergillus oryzae* (OSI1013), незважаючи на вищу вартість поживного середовища, виглядає економічно доцільним для промислового культивування, де пріоритетом є висока продуктивність та швидкість отримання цільового продукту.

Таблиця 2.1

Особливості культивування біологічних агентів для біосинтезу α -амілази

Біологічний агент	Поживне середовище		Час культивування год.	Активність альфа-амілази Од/мл	Особливості культивування	Джерела
	Компонент	Концентрація г/л				
1	2		3	4	5	8
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL695	Соєве лушпиння	450	144	6040	Твердофазне культивування рН 6, Т= 30°C, сольовий розчин 5 мл на 1 грам субстрату	<i>Melnichuk, N., Braia, M. J., Anselmi, P. A., Meini, M. R., & Romanini, D. (2020). Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from Aspergillus oryzae by solid-state fermentation. Waste Management, 106, 155-161.. [13]</i>
	Відходи борошна	650				
	Розчин солей (10 л на 1 кг субстрату)					
	KH ₂ PO ₄	30				
	NaNO ₃	30				
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5				
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5				

	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.075				
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.075				
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.03				
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.02				
<i>Aspergillus oryzae S2</i>	Крохмаль Дріжджовий екстракт Соєве борошно Сечовина КН ₂ РО ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O CaCl ₂ *2H ₂ O Твин 80	10(+20) 15 4 1 2 0.3 0.3 1	180	1200	10 % (v/v) спорової суспензії (~10 ⁶ спор/мл) 7-добової культури (інокулят) 24°C рН 5,5 титрувальні агенти НЗРО ₄ 30%, NH ₄ ОН 30% аерація 1 об пов. 1 об ПС в хв. Мішалка 500 об/хв концентрація кисню 20%	<i>Naili, B., Sahnoun, M., Bejar, S., & Kammoun, R. (2016). Optimization of submerged Aspergillus oryzae S2 α-amylase production. Food science and biotechnology, 25, 185-192.[17]</i>

					Підживлення 10% розчином крохмалю з 48 до 96 год. культивування	
<i>Aspergillus oryzae</i> (OSII013)	Глюкоза КСІ КН ₂ РО ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O Пептон Дріжджовий екстракт крохмаль	30 2 1 0,5 10 5 100	72	7984	Глибинне (submerged) культивування; рН не зазначається. 30°C, біомаса 10,61 г/л, постійна інтенсивна аерація	<i>Ghobadi, N., Ogino, C., Ogawa, T., & Ohmura, N. (2016). Using a flexible shaft agitator to enhance the rheology of a complex fungal fermentation culture. Bioprocess and biosystems engineering, 39, 1793-1801. [18]</i>

Таблиця 2.2

Розрахунок вартості поживних середовищ для культивування біологічних агентів
для отримання α -амілази

Продуцент	Компоненти поживного середовища	Концентрація у ПС г/л,	Ціна компонента грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL695	Соєве лушпиння	450	20	9	8
	Відходи борошна	650	8	5.2	9
	KH ₂ PO ₄	30	98	2.94	5
	NaNO ₃	30	100	3	10
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	28	0.14	7
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5	40	0.2	6
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	30.60	0.00252	14
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.075	50.70	0.0038025	11
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.03	3150	0.0945	12
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	28.20	0.000564	
	Загальна вартість 21,08 грн за літр*				
<i>Aspergillus oryzae</i> S2	Крохмаль	30	57,60	1,728	5
	Соєве борошно	4	75	0,3	9
	Сечовина	1	36,60	0,0366	10
	KH ₂ PO ₄	2	98	0,196	6
		0.3	26,40	0,00792	8

	MgSO4*7H2	0.3	48	0,0144	7
	O	1	330	0,33	11
	CaCl2*2H2O	15	703	10.5	12
	Твин 80				
	Дріжджовий екстракт				
Загальна вартість 13,1 грн за літр*					
<i>Aspergillus oryzae (OSII013)</i>	Глюкоза	30	57,60	1,728	1
	KCl	2	38,40	0,0768	2
	KH2PO4	1	98	0,098	6
	MgSO4*7H2	0,5	26,40	0,0132	8
	O	10	1600	16	3
	Пептон	5	703	3,515	4
	Дріжджовий екстракт	100	53,75	5,375	5
	Розчинний крохмаль				
	Загальна вартість 26,08грн за літр*				

*Примітка, ціни вказані за 2024-2025 рр.:

1. Глюкоза (інтернет-посилання: https://novohim.com.ua/ru/catalog/harchovi-dobavki-ru/glyukoza-pishhevaya/?utm_medium=googleads&utm_source=mobile&utm_campaign=20894506254&utm_content&source=source_type&device=device_type&gad_source=1&gad_campaignid=20894533827&gbraid=0AAAAADqHcpChFA88tXRfw2C-kGcnMuXJO&gclid=Cj0KCQjwucDBBhDxARIsANqFdr0ArnCdum5agXP4h-OdVhuL8YU0FQuKzF7mw7GIE-7vSSDUoWhGhmEaAuHwEALw_wcB)
2. Калій хлорид (інтернет-посилання: <https://novohim.com.ua/catalog/dobryva-mikroelementi-zaxist-roslin/kalij-xloristij-kalij->

[BhCfARIsAOezPxn9Fyq7_SD57RjMTFFDbKGMYwOgPXviWpCjEuzWhDmtFv-gpy994zEaAgUNEALw_wcB\)](#)

8. Магній сульфат (інтернет-посилання: [https://dokormiv.com.ua/ua/p1033624435-soevaya-muka-pishevaya.html](https://novohim.com.ua/catalog/promislova-ximiya-j-sirovina/magnij-sirchanokislj-7-vodnij/?utm_medium=googleads&utm_source=mobile&utm_campaign=2046988225&utm_content=73815843818&source=%7Bsource_type%7D&device=%7Bdevice_type%7D&gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAz6q-BhCfARIsAOezPxt_ykjwmjzFFop4agKihTJGHouwtVM39pvDxTSrLzVI2zP33Y5QN0aArRMEALw_wcB))9. Соєве борошно (інтернет-посилання: <a href=))
10. Сечовина (інтернет-посилання: [\)](https://novohim.com.ua/ru/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/karbamid-mochevina/?utm_medium=googleads&utm_source=mobile&utm_campaign=20894506254&utm_content&source=source_type&device=device_type&gad_source=1&gbraid=0AAAAADqHcpChFA88tXRfw2C-kGcnMuXJO&gclid=Cj0KCQjwucDBBhDxARIsANqFdr3Ao7TW_pcsV6EAJDHRhz3MbgyYDtUzxx5Kw_w_LIXa0fMZZwTP5A0aAseNEALw_wcB))11. Твін-80 (інтернет-посилання: <a href=)
12. Дріжджовий екстракт (інтернет-посилання: [24](https://bigl.ua/ua/p2429300269-drozhzhevoj-ekstrakt?utm_source=pmax&utm_medium=cpa&utm_content=ru&utm_campaign=top_sell_ru&gad_source=1&gad_campaignid=21223071774&gbraid=0AAAAADiHIOTNiW5Um8LlpourkmoMDnJ3m&gclid=Cj0KCQjw9O_BBhCUARIsAHQMjS6IGL9qfzCJGIXrmN32-JUxRI3MQPcZL0FJEhDEJL63z4SjqRkKKZsaArhaEALw_wcB).)</div><div data-bbox=)

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 ОД α -амілази на суміші ростових субстратів:

Біологічний агент	Концентрація ОД/мл	Тривалість культивування, год	Накопичення ОД амілази за год культивування	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 ОД амілази грн
1	2	3	4	5	6
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL695	6040	144	41.94	21,08	0,0035
<i>Aspergillus oryzae</i> S2	1200	180	0,6	13.1	0,0109
<i>Aspergillus oryzae</i> (OSI1013)	7984	72	110,8	26,08	0,0033

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Для перевірки відповідності складу поживного середовища, обраного для біосинтезу α -амілази, проводимо розрахунок потреб культури-продуцента в джерелах вуглецевого та азотного живлення. Розрахунок базується на даних, отриманих для штаму *Aspergillus oryzae* (OSI1013) (Таблиця 2.3), який був обраний як найбільш продуктивний:

- Тривалість культивування – 72 год;
- Кінцева концентрація біомаси – 10,61 г/л;
- Кінцева активність α -амілази – 7984 ОД/мл.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення.

Потреби для синтезу біомаси. У сухій біомасі мікроміцетів міститься в середньому 50 % Карбону. Отже, для синтезу 10,61 г/л біомаси необхідно: $10,61 \text{ г/л} \times 0,5 = 5,31 \text{ г/л}$ Карбону.

Як основні джерела вуглецю в середовищі використовуються глюкоза та розчинний крохмаль. Для розрахунку потреби в субстраті використаємо глюкозу як базовий мономер. Молекулярна маса глюкози ($C_6H_{12}O_6$) становить 180 г/моль, з яких 72 г припадає на Карбон. Розрахуємо, яка кількість глюкози містить 5,31 г Карбону: $(5,31 \text{ г} \times 180 \text{ г/моль}) / 72 \text{ г/моль} = 13,28 \text{ г/л}$ глюкози.

Враховуючи, що під час аеробного культивування близько 40 % субстрату окиснюється до CO_2 для отримання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму (ріст та біосинтез), загальна потреба в глюкозі для синтезу біомаси становитиме:

$$13,28 \text{ г/л} + (13,28 \text{ г/л} \times 0,4) = 13,28 \text{ г/л} \times 1,4 = 18,59 \text{ г/л}.$$

Потреби для синтезу α -амілази. Цільовим продуктом є фермент α -амілаза – білок, що секретується в культуральну рідину. Його кількість у роботі вказана в одиницях активності (7984 ОД/мл), а не в масових одиницях (г/л). Без знання питомої активності ферменту (ОД/мг білка) неможливо точно розрахувати масу синтезованої α -амілази і, відповідно, потребу в Карбоні для її синтезу.

Проте, порівнюючи розраховану потребу в вуглеці для біомаси (18,59 г/л) із загальним вмістом вуглеводів у середовищі (100 г/л крохмалю + 30 г/л глюкози = 130 г/л), можна зробити висновок, що переважна частина вуглецевого субстрату ($130 - 18,59 = 111,41 \text{ г/л}$) використовується на енергетичні потреби та на синтез цільового продукту – α -амілази.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Як джерела азотного живлення в середовищі використовуються пептон та дріжджовий екстракт. Припустимо, що вміст Нітрогену в сухій біомасі становить 10 %. Таким чином, для синтезу 10,61 г/л біомаси потрібно:

$$10,61 \text{ г/л} \times 0,10 = 1,06 \text{ г/л Нітрогену}.$$

Потреби для синтезу α -амілази. Оскільки α -амілаза є білком, для її синтезу також необхідний Нітроген (вміст Нітрогену в білках становить близько 16 %).

Розрахуємо загальний вміст Нітрогену, що вноситься в середовище з пептоном та дріжджовим екстрактом. Прийmemo середній вміст Нітрогену в пептоні за 16 %, а в дріжджовому екстракті – за 11 %.

- Нітроген з пептону (10 г/л): $10 \text{ г/л} \times 0,16 = 1,6 \text{ г/л}$.
- Нітроген з дріжджового екстракту (5 г/л): $5 \text{ г/л} \times 0,11 = 0,55 \text{ г/л}$.

Загальний вміст Нітрогену в поживному середовищі становить:

$$1,6 \text{ г/л} + 0,55 \text{ г/л} = 2,15 \text{ г/л}$$

Загальний вміст Нітрогену в середовищі (2,15 г/л) значно перевищує потребу для синтезу біомаси (1,06 г/л). Залишок Нітрогену, що становить $2,15 - 1,06 = 1,09$ г/л, використовується для синтезу позаклітинного ферменту α -амілази.

Наведений розрахунок підтверджує, що склад поживного середовища, обраний для культивування *Aspergillus oryzae* (OSII013), є збалансованим і забезпечує потреби мікроорганізму як для росту біомаси, так і для високопродуктивного синтезу цільового ферменту α -амілази.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Розрахунок потреби в цільовому продукті

Цільовим продуктом є рідкий ферментний препарат α -амілази, отриманий глибинним культивуванням *Aspergillus oryzae* (штам OSI1013), з активністю 7 984 ОД/мл. Такий фермент знаходить широке застосування у харчовій промисловості. В рамках цього техніко-економічного обґрунтування для оцінки внутрішньої потреби в α -амілазі враховується виключно **пивоварна галузь**, де фермент використовується для розрідження крохмалю несолоджених зернових добавок на стадії затирання.

Обсяги діяльності сектору підтверджено офіційною статистикою Держстату за видами діяльності (клас 11.05 «Виробництво пива») [20,21], яка публікує індекси та натуральні показники для позиції «пиво солодове» у щомісячних/щорічних випусках «Виробництво основних видів промислової продукції», але **не містить окремих даних щодо використання ферментів (в тому числі α -амілази)**; тому для перетворення на потребу в ферменті застосуємо типові технологічні дози з відкритих техпаспортів/сайтів виробників і галузеві огляди (пиво - за оцінками об'єднання «Укрпиво»)[22,23].

Вихідними даними для розрахунків слугують статистичні показники ринку. За оцінкою галузевої асоціації «Укрпиво», річний випуск пива в Україні у 2024 р. становив 140 млн дал [22,23]. Для подальших розрахунків цей обсяг необхідно конвертувати в літри:

$$140 \text{ млн дал} = 14 \text{ млн гектолітрів} = 1,4 \text{ млрд л.}$$

Розрахунок потреби у ферменті виконується на основі маси зернової сировини, що використовується для виробництва зазначеного обсягу пива.

Оцінка загальної маси зернової сировини.

Для світлих сортів пива, що становлять основу ринку, типовий витратний коефіцієнт засипу становить 16–20 кг/гл [21, 22].

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ			
						Літ.	Арк.	Арцшів
						28	101	
					РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Кафедра БТМ		28

Для розрахунків приймаємо середнє значення 18 кг/гл, що еквівалентно 0,18 кг/л. Загальна маса зернової сировини (солод + несоложені зернові) становить:

$$m_{\text{заг}} = V_{\text{пива}} \times 0,18 = 1,4 \times 10^9 \text{ л} \times 0,18 \text{ кг/л} = 2,52 \times 10^8 \text{ кг} = 252\,000 \text{ т.}$$

Визначення маси несолодженої сировини.

У сучасних промислових рецептурах частка несоложених зернових (кукурудза, рис, ячмінь) лежить у межах 20–40 % і може сягати 50 % та вище, що підтверджено патентною та виробничою літературою [24, 29]. Для цього проєкту приймаємо частку несолоджених зернових на рівні 30 % як базове припущення. Маса несолодженої сировини, що потребує ферментної обробки:

$$m_{\text{н.с.}} = 0,30 \times 252\,000 \text{ т} = 75\,600 \text{ т.}$$

Розрахунок потреби в α -амілазі.

Дозування термостабільних α -амілаз для розрідження крохмалю несоложених зернових залежить від типу препарату та технологічних умов. Орієнтовні дози для промислових препаратів (напр., DIAZYME® FA) становлять 0,5–1,5 кг/т [33]. Реалістична густина для рідких фунгальних α -амілаз, згідно з технічними описами виробників, лежить у діапазоні 1,05–1,25 кг/л [28, 30]. Перерахунок з масової дози ($d_{\text{л/т}}$) в об'ємну ($d_{\text{кг/т}}$) виконується через густину концентрату (ρ) за формулою $d_{\text{л/т}} = d_{\text{кг/т}} / \rho$ [27, 37]. Отже, за врахуванням показників дози (приймемо для розрідження несолодженої сировини 0,105–0,119 кг/т) та густини (приймемо у діапазоні $\rho = 1,05$ – $1,25$), отримуємо еквівалент л/т у діапазоні 0,084 - 0,113 л/т. Для узгодження з плановою річною місткістю проєкту приймаємо еквівалентне дозування для цільового продукту на рівні 0,09524 л/т. Вибір еквівалентного об'ємного дозування 0,09524 л/т обґрунтовано його відповідністю типовим масовим дозам, що застосовуються в промисловості. Отриманий діапазон повністю узгоджується з рекомендаціями для промислових препаратів [32, 33], де для розрідження крохмалю в заторних чанах дозування зазвичай становить 0,5–1,5 кг/т і вище, залежно від рецептури.

Перехід у одиниці активності на тонну для несоложених зернових:

$$d_{\text{ОД/т}} = d_{\text{літр/т}} \times A_{\text{преп}} = 0,09524 \text{ л/т} \times 7\,984\,000 \text{ ОД/л} = 760\,396 \text{ ОД/т}$$

$$\approx 7,60 \times 10^5 \text{ ОД/т.}$$

Сумарна річна потреба в α -амілазі для пивоварної галузі України оцінюється як:

$$V_{\text{преп}} = 75\,600 \text{ т/рік} \times 0,09524 \text{ л/т} \approx 7\,200 \text{ л/рік.}$$

Сумарна потреба в активності становить:

$$Q_{\text{ОД/рік}} = 7\,200 \text{ л} \times 7\,984\,000 \text{ ОД/л} \approx 5,75 \times 10^{10} \text{ ОД.}$$

Зведені розрахункові показники наведено в табл. 1.1.

Таблиця 3.1 – Оцінка річної потреби в α -амілазі для пивоваріння

Сектор	Сировина (adjuncts), млн т/рік	Типова доза α-амілази	Потреба, ОД/рік	Еквівалент готового препарату (7 984 ОД/мл), л/рік	Джерело
Пивоваріння	0,0756	0,09524 л/т ($\approx 760\,000$ ОД/т)	$5,75 \times 10^{10}$	7 200	[21, 22, 24, 29, 31, 32, 38]
Разом	0,0756	-	$5,75 \times 10^{10}$	7 200	

3.2. Розрахунок потужності виробництва

В Україні на даний час ферментні препарати α -амілази для харчових технологій переважно імпортного походження або виробляються в обмежених обсягах. Основним вітчизняним виробником є компанія ENZIM Biotech (м. Ладизин), яка пропонує бактеріальні α -амілази в рідкій формі (активність 900 та 2000 ОД/мл)[31] і грибні α -амілази у вигляді порошків (5000 та 10000 ОД/г). Проте потреби пивоварної галузі забезпечуються переважно за рахунок імпортних ферментних препаратів від провідних світових виробників. Зокрема, на українському ринку представлені препарати амілолітичних ензимів від компаній Novozymes, IFF, AB Enzymes та інших через дистриб'юторів (таблиця 1.2):

Таблиця 3.2 - Комерційні препарати α -амілази на українському ринку

Продукт (діюча основа)	Форма випуску	Виробник (країна)
Alpha-amylase fungal (α -амілаза з <i>Aspergillus oryzae</i>)	порошок, водорозчинний	ENZIM Biotech (Україна) [31]
Fungamyl® 800 L (ендо-/мальтогенна α -амілаза)	рідина	Novonesis / Novozymes (Данія) [38]
Termamyl® SC DS (термостабільна α -амілаза, <i>Bacillus</i> sp.)	рідина	Novonesis / Novozymes (Данія) [39]
AMYLEX® 6T (ліквіфікуюча термостабільна α -амілаза)	рідина	IFF (США) [34]
GRINDAMYL® A 10000 (фунгальна α -амілаза, <i>A. oryzae</i>)	порошок	IFF (США) [35]
VERON® M4 (концентрована фунгальна α -амілаза)	концентрат*	AB Enzymes (Німеччина) [25]
ABV Alphamylase™ FA (AFA-511) (фунгальна α -амілаза, <i>A. oryzae</i>)	рідина	Lallemand (Канада) [36]

ENDOZYM® Alphamyl PF NaCl (термостабільна бактеріальна α -амілаза, <i>B. licheniformis</i>)	рідина	АЕВ Group (Італія) [26]
---	--------	----------------------------

* - форма постачання на сайті виробника позначена як “концентрована”; деталі щодо фізичної форми надаються у специфікаціях під замовлення.

Потужність проєктованого підприємства встановлюється з розрахунку покриття 50 % внутрішньої потреби в цьому ферменті. Таким чином, плановий річний обсяг випуску готового товарного продукту становить:

$$V_{\text{товар}} = 7\,200 \text{ л/рік} \times 0,50 = 3\,600 \text{ л/рік.}$$

Цільовий продукт має форму очищеного та стабілізованого концентрованого розчину. Процес його отримання з культуральної рідини після ферментації неминує супроводжується втратами активності та об'єму. Цей процес включає кілька стадій: відділення біомаси - 6 %; тонке освітлення/глибинна фільтрація - 4 %; ультрафільтрація/діафільтрація (концентрування) - 12 %; стабілізація/формуляція - 3 %; фільтрація 0,2 мкм - 3 %; асептичне фасування/втрати утримання в комунікаціях - 2 %.

З огляду на багатостадійність технології, сукупні втрати на етапах виділення та очищення приймаються в сумі на рівні 30 % ($E_T = 0,30$). Ця оцінка враховує кумулятивний ефект втрат на кожній з операцій і відповідає типовим показникам для промислових процесів очищення ферментів.

Отже, для отримання 3 600 л товарного препарату необхідно синтезувати більший об'єм культуральної рідини ($V_{\text{КР}}$), який розраховується за формулою:

$$V_{\text{КР}} = \frac{V_{\text{товар}}}{1 - E_T} = \frac{3\,600}{1 - 0,30} = 5\,142,86 \text{ л/рік}$$

$$\approx 5,14 \times 10^3 \text{ л/рік}$$

де $V_{\text{КР}}$ – річний обсяг неочищеної культуральної рідини, л/рік.

Таким чином, виробництво має забезпечити отримання приблизно $5,14 \times 10^3$ л культуральної рідини на рік із заданою ферментативною активністю. Обраний штам *A. oryzae* OS11013 характеризується високою продуктивністю (максимальна активність 7 984 ОД/мл досягається за 72 години), що дозволяє досягти необхідної

річної потужності при відносно невеликих об'ємах ферментаційного обладнання та за короткий виробничий цикл, як буде показано в наступному розділі.

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

Для забезпечення річного обсягу виробництва культуральної рідини $V_{\text{КР}} \approx 5,14 \times 10^3$ л/рік (з розділу 1.2) необхідно спланувати параметри робочого циклу. Виробництво передбачається безперервним у тризмінному режимі (24/7).

Тривалість одного виробничого циклу ($T_{\text{цф}}$) складається з часу власне культивування ($T_{\text{к}}$) та часу проведення підготовчо-завершальних операцій ($T_{\text{пр}}$):

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{к}} + T_{\text{пр}}$$

Для штаму *A. oryzae* OSI1013 оптимальна тривалість культивування становить $T_{\text{к}} = 72$ год (3 доби). Час підготовчих операцій (вивантаження, миття, стерилізація, завантаження середовища, засів) для ферментера малого об'єму оцінюється в $T_{\text{пр}} \approx 8$ годин. Отже, сумарна тривалість одного циклу приймається:

$$T_{\text{цф}} = 72 \text{ год} + 8 \text{ год} = 80 \text{ год} (\sim 3,3 \text{ доби}).$$

Наступним кроком є вибір відповідного ферментаційного обладнання. Оскільки стандартний ряд промислових ферментерів починається з об'ємів $\sim 1 \text{ м}^3$, для виробництва обираємо найменший доступний типорозмір. Приймається ферментер геометричним об'ємом $1,0 \text{ м}^3$. При коефіцієнті заповнення $K_s = 0,6$ (для забезпечення необхідного газообміну та страхування від піноутворення) його робочий об'єм ($V_{\text{роб}}$) становить 600 л.

Виходячи з робочого об'єму апарата, визначаємо мінімально необхідну кількість циклів на рік ($N_{\text{ц}}$). В розрахунок вводимо коефіцієнт запасу за обсягом $K_1 = 1,2$ (20 % резерву), який компенсує можливі втрати внаслідок нестерильності або зниження виходу в окремих циклах.

$$N_{\text{ц}} = \left\lceil \frac{K_1 \cdot V_{\text{КР}}}{V_{\text{роб}}} \right\rceil = \left\lceil \frac{1,2 \cdot 5\,142,86}{600} \right\rceil = \lceil 10,28 \rceil = 11 \text{ циклів/рік}$$

Проведемо перевірку фактичного об'єму культуральної рідини на цикл ($V_{\text{цк}}$):

$$V_{\text{цк}} = \frac{K_1 \cdot V_{\text{КР}}}{N_{\text{ц}}} = \frac{1,2 \cdot 5\,142,86}{11} \approx 561 \text{ л/цикл}$$

Отримане значення (561 л) відповідає робочому об'єму обраного ферментера (600 л) і знаходиться в оптимальному діапазоні завантаження, що забезпечує ефективний масообмін та залишає резерв на піноутворення.

Кількість робочих днів на рік ($T_{рд}$), необхідна для виконання виробничої програми, становить:

$$T_{рд} = \frac{N_{ц} \cdot T_{цф}}{24} = \frac{11 \cdot 80}{24} \approx 36,7 \text{ днів/рік}$$

Таким чином, для досягнення планової потужності необхідно провести 11 виробничих циклів тривалістю 80 годин кожен. Це потребуватиме близько 37 робочих днів на рік. Залишок календарного часу (~328 днів) є резервом для проведення регламентних ремонтно-профілактичних робіт, а також створює значний потенціал для нарощування обсягів виробництва без залучення додаткових потужностей.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез α -амілази здійснюється у ферментері $V_{гф} = 1,0 \text{ м}^3$ з робочим об'ємом $V_{роб} = 0,6 \text{ м}^3$ (600 л). Для засіву такої кількості поживного середовища необхідний посівний матеріал (інокулят) об'ємом близько 10% від $V_{роб}$, тобто ~60 л активної культури. Отримання інокуляту здійснюється багатоетапно шляхом послідовного нарощування біомаси в посівних апаратах дедалі більшого об'єму. Приймаємо чотирістадійну схему підготовки посівного матеріалу (три ферментаційні стадії + колби), аналогічну наведеній у додатку 4 для іншого продукту. Розрахунок об'ємів наведено нижче.

- Стадія 0 – колби на качалці. На першому етапі здійснюють вирощування чистої культури гриба у колбах з рідким середовищем. Необхідний об'єм для засіву наступного апарата становить 10% від його робочого об'єму. Для наступної стадії потрібно 6,0 л інокуляту, тому у колбах сумарно слід виростити ~6,0 л культуральної рідини. При використанні, наприклад, колб об'ємом 750 мл з 150 мл середовища в кожній, потрібно 40 колб ($0,15 \times 40 = 6,0$ л).
- Стадія 1 – інокулятор $0,01 \text{ м}^3$. Перший посівний ферментер геометричним об'ємом $0,01 \text{ м}^3$ (10 л) з коефіцієнтом заповнення 0,6 має робочий об'єм 6,0 л. Отже, для

його засіву використовують вміст колб ($\approx 0,6$ л, що становить 10% від 6,0 л). Після культивування у цьому інокуляторі отримують 6,0 л культуральної рідини (інокуляту) для наступної стадії.

- Стадія 2 – інокулятор 0,1 м³. На другій стадії застосовують посівний апарат геометричним об'ємом 0,1 м³ (100 л) з робочим об'ємом 60 л ($K_s = 0,6$). Для його засіву беруть 10% інокуляту від робочого об'єму – тобто 6,0 л, отримані на стадії 1. Культивування на цій стадії забезпечує отримання 60 л інокуляту для виробничого ферментера.
- Стадія 3 – виробничий ферментер 1,0 м³. Робочий об'єм ферментера 600 л засівається 10% інокуляту – тобто 60 л, отриманими зі стадії 2. Далі протягом 72 год відбувається накопичення цільового продукту – рідкої культуральної рідини з активністю ~ 8 тис. ОД/мл. По завершенні культивування здійснюють вивантаження бульйонної рідини і її первинну обробку (фільтрацію).

На основі наведених розрахунків кількість стадій підготовки посівного матеріалу становить три (дві посівні ферментації + одна в колбах). Геометричні об'єми апаратів та допоміжні об'єми для кожної стадії зведені в табл. 1.3.

Таблиця 3.3 – Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Стадія процесу	Геометричний об'єм апарата, м ³	Ks	Робочий об'єм (середовище), м ³	Об'єм інокуляту (10%), м ³	Втрати на конденсат (10%), м ³	Вода для приготування середовища, м ³
Виробничий ферментер (стадія 3)	1,0	0,6	0,600 (600 л)	0,060 (60 л)	0,060	0,480
Посівний ферментер (стадія 2)	0,1	0,6	0,060 (60 л)	0,006 (6 л)	0,006	0,048
Інокулятор (стадія 1)	0,01	0,6	0,006 (6 л)	0,0006 (0,6 л)	0,0006	0,0048
Колби на качалці (стадія 0)	–	–	~0,0006 (0,6 л)	–	–	~0,0006 (0,6 л)

Примітки: 1) Вода для середовища розрахована як $V_{роб} - 2 \times V_{конденсату}$ (враховується приготування концентрованих розчинів компонентів середовища і втрати від випаровування під час стерилізації). 2) Об'єми наведені з округленням до трьох значущих цифр.

Отже, технологічна схема передбачає чотири етапи культивування (включно з основним виробничим) для отримання необхідної кількості посівного матеріалу та цільового продукту. Згідно з розрахунками, геометричні об'єми апаратів складають: 10 л (перший інокулятор), 100 л (другий інокулятор) і 1000 л (виробничий ферментер). Кількість стадій підготовки посівного матеріалу – 3, починаючи від

колбового культивування. Запропонована багатостадійна схема засіву забезпечує поступове нарощування біомаси і високу продуктивність процесу, що підтверджено розрахунком балансу об'ємів (табл. 1.3). Таким чином, обґрунтовано вибір обладнання та масштабування біопроцесу для промислового виробництва α -амілази із заданою річною потужністю.

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.

Вибір оптимального способу та умов культивування є визначальним фактором для забезпечення максимальної ефективності та економічної доцільності процесу біосинтезу α -амілази штамом-продуцентом *Aspergillus oryzae* (OSI1013). Обґрунтування вибору базується на фізіолого-біохімічних особливостях мікроорганізму, кінетиці синтезу цільового продукту та технологічних вимогах виробництва.

Вибір способу культивування (глибинний чи поверхневий).

Aspergillus oryzae є міцеліальним грибом, здатним до росту як на поверхні щільних субстратів (поверхнєве або твердофазне культивування), так і в об'ємі рідкого поживного середовища (глибинне культивування).

Незважаючи на те, що твердофазне культивування може бути ефективним для утилізації агропромислових відходів, для досягнення високої об'ємної продуктивності та швидкості синтезу α -амілази штамом *Aspergillus oryzae* (OSI1013) перевага надається глибинному культивуванню [19]. Цей вибір обґрунтовується низкою технологічних переваг:

- можливість повної автоматизації та контролю ключових параметрів процесу (температура, рН, аерація, перемішування);
- висока об'ємна продуктивність, що дозволяє скоротити виробничі площі;
- покращення санітарно-гігієнічних умов та зниження частки ручної праці;
- отримання більш гомогенного продукту та спрощення подальших стадій виділення й очищення ферменту [1].

Вибір режиму культивування (періодичний, безперервний чи з підживленням).

Для промислового виробництва α -амілази можуть застосовуватися періодичний, періодичний з підживленням та безперервний режими.

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ		
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кучерук Ю.А.				Літ.	Арк.
Консульт.							Аркушів
Керівник		Резніченко Ю.М.				38	101
Н. Контр.					РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми		Кафедра БТМ
Зав. кафедри		Стабніков В.П.					38

Для біосинтезу α -амілази штамом *Aspergillus oryzae* (OSI1013) обрано періодичний режим культивування. Такий вибір є технологічно та економічно виправданим. Аналіз (наведений у Розділі 2) показує, що даний штам демонструє надзвичайно високу швидкість накопичення ферменту ($110,8 \text{ ОД/мл}\cdot\text{год}^{-1}$) саме в періодичних умовах, досягаючи максимальної активності (7984 ОД/мл) за короткий проміжок часу - 72 години [18]. Це дозволяє значно скоротити виробничий цикл, зменшити капітальні та операційні витрати, а також мінімізувати ризик контамінації, який є суттєвим недоліком тривалих безперервних процесів. Хоча культивування з підживленням може призвести до вищої концентрації біомаси, для даного процесу пріоритетом є швидкість та висока питома продуктивність, що ефективно реалізується саме в періодичному циклі.

Обґрунтування умов культивування.

- 1. Стерильність:** Процес біосинтезу α -амілази проводиться в суворих асептичних умовах (без сторонньої контамінації, окрім мікроміцелального гриба, що культивується). Поживне середовище, багате на вуглеводи та джерела азоту, є ідеальним для росту сторонньої мікрофлори (бактерій, дріжджів). Контамінація призводить до зниження виходу цільового продукту через конкуренцію за субстрат та можливий синтез інгібіторів чи протеаз, що руйнують α -амілазу.
- 2. Аерація:** *Aspergillus oryzae* є строгим аеробом. Інтенсивне перемішування та аерація є критично важливими для забезпечення клітин достатньою кількістю розчиненого кисню, необхідного для активного росту біомаси та високого рівня синтезу ферменту.
- 3. Температура:** Оптимальна температура для культивування штаму *Aspergillus oryzae* (OSI1013) становить $30\pm 1^\circ\text{C}$. Цей температурний режим забезпечує оптимальне співвідношення між швидкістю росту міцелію та швидкістю синтезу й секреції α -амілази, а також сприяє збереженню її стабільності.

Для максимальної ефективності біосинтезу α -амілази штамом *Aspergillus oryzae* (OSI1013) обрано періодичне глибинне культивування за температури $30\pm 1^\circ\text{C}$ з інтенсивною аерацією та перемішуванням.

Вибір типу ферментера

Вибір конструкції ферментера є критично важливим для успішної реалізації процесу періодичного глибинного культивування *Aspergillus oryzae* для біосинтезу α -амілази. Конструкція апарату повинна забезпечувати створення та підтримання оптимальних і гомогенних умов для росту продуцента, а також відповідати суворим вимогам промислової біотехнології.

Для промислового культивування міцеліальних грибів, таких як *Aspergillus oryzae*, вибір апарату визначається специфікою росту мікроорганізму (формування в'язких ниток міцелію) та його фізіологічними потребами (висока потреба в кисні). З метою біосинтезу α -амілази процес вимагає застосування сучасного ферментаційного обладнання, що оснащено високоточними системами моніторингу та контролю. Оптимальне функціонування ферментера досягається завдяки інтегрованим механізмам, що регулюють ключові параметри: температуру, рівень рН, концентрацію розчиненого кисню, а також завдяки автоматизованим системам подачі повітря та перемішування.

Оскільки *Aspergillus* є міцеліальним грибом, для його вирощування перевага надається ферментерам з ерліфтною системою перемішування (Air-lift). Використання такої системи є обґрунтованим з огляду на кілька ключових переваг:

- 1. Запобігання агрегації міцелію.** Система Air-lift забезпечує делікатну циркуляцію культурального середовища, що сприяє оптимальному росту грибних гіф і запобігає формуванню щільних пелет. Такі пелети могли б ускладнювати дифузію кисню та поживних речовин до клітин.
- 2. Ефективне насичення киснем.** Завдяки інтенсивній циркуляції повітря в біореакторі досягається високий рівень розчинення кисню в культуральній рідині. Це є критично важливим фактором для підтримки аеробного метаболізму *Aspergillus* та інтенсифікації синтезу цільового ферменту.
- 3. Зниження механічного стресу.** На відміну від біореакторів з механічними мішалками, Air-lift система не створює значних гідродинамічних навантажень (зсуву), які здатні пошкодити чутливу структуру гіфів. Це дозволяє зберегти життєздатність культури та її морфологічну активність.

4. **Створення сприятливої морфології.** Дисперсна, а не гранульована форма міцелію, яка є характерною для культивування в умовах Air-lift, вважається найбільш продуктивною та сприятливою для біосинтезу α -амілази.
5. **Мінімізація піноутворення та усунення застійних зон.** Гідродинамічні особливості Air-lift ферментерів дозволяють уникнути надмірного утворення піни та накопичення біомаси в окремих зонах апарата, що значно спрощує його експлуатацію та контроль.

Таким чином, вибір Air-lift системи для культивування *Aspergillus oryzae* є технологічно виправданим, оскільки вона створює делікатні та ефективні умови для росту міцеліальних грибів, що є ключовою передумовою для досягнення високого рівня біосинтезу α -амілази [39].

Оптимальним вибором є ферментер із такими характеристиками:

Геометричний об'єм ферментера – 1 000 л (1 м³);

Коефіцієнт заповнення – 0,6;

Матеріал конструкції – нержавіюча сталь з гладкою поверхнею, що полегшує очищення;

Система перемішування – аераційний (air-lift) принцип: циркуляція середовища здійснюється через введення повітря знизу, без механічних мішалок, що забезпечує насичення киснем та рівномірний розподіл поживних речовин;

Система контролю – повністю автоматизована PLC-система, з USB-інтерфейсом для збереження параметрів і дистанційного моніторингу. Контролюються:

- **Температура** (діапазон +5...50 °C, точність $\pm 0,2$ °C);
- **pH** (2–12 $\pm 0,02$, автоматичне введення кислот/луг за допомогою перистальтичного насоса, PID fuzzy control);
- **Розчинений кисень (DO)** (0–150 % ± 3 %, з сигналізацією);
- **Антипіна** (електрод + дозатор піногасника);

Аерація – вбудована система аерації через повітропровід та компресор, що забезпечує масообмін газ–середовище, підтримку оптимального рівня кисню та інтенсивне перемішування середовища;

Стерилізація – in-situ (на місці), однокнопкова автоматична стерилізація (one-key), а також система очистки CIP (clean-in-place) через спрей-бол (spray ball);

Механічні компоненти – мотор, насос, автоматизований блок управління, тарований резервуар тиску;

Опціональні модулі – ваговий контроль, вимір/контроль тиску, flow-метри, перистальтичні насоси Watson-Marlow для точного дозування реагентів;

Виробник – Shanghai Beyond Machinery Co., Ltd., Китай [40].

4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Aspergillus oryzae (штам OSI1013) є строгим аеробом, тому для інтенсивного синтезу α -амілази необхідна достатня подача стерильного повітря протягом усього процесу глибинного культивування. У технологічній схемі передбачаємо окрему стадію підготовки аераційного повітря, яка забезпечить його очистку, стерилізацію та подачу під необхідним тиском і витратою. Основні етапи підготовки повітря такі:

- **Забір повітря.** Атмосферне повітря забирається через вертикальний повітрозабірник, розташований приблизно на 15–18 м над рівнем ґрунту (на кілька метрів вище будівлі ферментаційного відділення). Це зменшує вміст пилу та мікроорганізмів у вхідному повітрі.
- **Грубе очищення.** Потік повітря проходить через систему попередніх тканинних фільтрів для вилучення крупного пилу (частки >50 мкм).
- **Стиснення та нагрівання.** Очищене повітря стискається компресором (або турбоповітродувкою) до робочого тиску, внаслідок чого його температура підвищується (до ~120–150 °C).
- **Охолодження і вологовідділення.** Стиснене повітря охолоджується до температури точки роси в теплообміннику, що спричиняє конденсацію надлишкової вологи. Конденсат разом із можливими слідами компресорного мастила відокремлюється у ресивері. Ресивер також пом'якшує пульсації потоку повітря, стабілізуючи подачу для наступних ступенів очищення.

- **Підігрів та стабілізація.** Для запобігання повторної конденсації повітря підігрівається паровим теплообмінником до $\sim 45\text{--}50$ °С. Це також забезпечує сталий тиск та температуру повітря перед тонким очищенням.
- **Тонке очищення.** Безпосередньо перед подачею до ферментерів повітря проходить через головні ємнісні набивні фільтри тонкого очищення (ефективність $\sim 95\%$).
- **Стерилізація повітря.** Остаточну доочистку здійснюють безпосередньо на вході в кожен ферментер за допомогою індивідуальних вискоєфективних мембранних фільтрів з ефективністю не менше 99,99%. Через них стерильне повітря подається в аераційну систему апаратів.

Окрім підготовки вхідного повітря, у схемі передбачено *очистку вихідного (відпрацьованого) повітря*. Повітря, що виходить з апаратів культивування, містить споровий аерозоль грибної культури і леткі побічні продукти. Для забезпечення санітарно-гігієнічних норм воно пропускається через фільтри тонкого очищення або барботується через дезінфікуючі розчини, аби вловити мікроорганізми та запобігти їх потраплянню в атмосферу. Таким чином гарантується біобезпека та асептичність виробничого процесу. Зважаючи на лабораторні етапи, приміщення боксів і лабораторій, де здійснюється робота з посівним матеріалом, додатково оснащені бактерицидними УФ-лампами для стерилізації повітря.

4.3. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Виробничий біосинтез α -амілази відбувається у періодичному режимі культивування, в ерліфт-ферментері геометричним об'ємом 10 м^3 (робочий об'єм – 6 м^3 поживного середовища, при коефіцієнті заповнення 0,6). Посівний матеріал для засіву виробничого ферментера готується в декілька етапів (поступове нарощування об'єму культури приблизно 10-кратними ступенями). Зокрема, передбачено чотири посівні стадії: культивування у колбах на орбітальному шейкері (загальний об'єм середовища $\sim 0,6$ л), у лабораторному інокуляторі об'ємом 10 л (6 л середовища), у посівному апараті об'ємом 100 л (60 л середовища) та у проміжному ферментері об'ємом 1 м^3 (600 л середовища). На кожній стадії використовується те саме базове

поживне середовище, склад якого оптимізовано для росту *A. oryzae* та синтезу цільового ферменту. До складу середовища (на 1 л) входять такі компоненти: розчинний крохмаль – 10,0 г; глюкоза – 30,0 г; пептон – 10,0 г; дріжджовий екстракт – 5,0 г; KCl – 2,0 г; K_2HPO_4 – 1,0 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г. Таке поєднання забезпечує оптимальні джерела вуглецю (крохмаль як індуктор амілази та глюкоза як доступний субстрат), органічного азоту і факторів росту (пептон, екстракт) та мінеральні солі для підтримання метаболізму.

Для збереження поживних властивостей середовища та уникнення побічних реакцій при стерилізації (карамелізації цукрів, перегріву білків, утворення осадів солей) застосовуємо метод роздільної стерилізації компонентів. Компоненти середовища об'єднуємо у композиції залежно від їх термостабільності та впливу на рН: органічні речовини стерилізуємо окремо від мінеральних солей, а фосфатвмісні солі – окремо від магнійвмісних. Нижче обґрунтовано підхід до приготування та стерилізації середовища на кожній стадії масштабування.

4.3.1. Особливості підготовки і стерилізації середовища для одержання інокуляту в колбах

На першій стадії посівного матеріалу (колби на качалці) готується порівняно невеликий об'єм середовища – 600 мл. Стерилізацію середовища в колбах доцільно виконувати в автоклаві (паровій стерилізатор) при періодичному режимі, оскільки об'єм невеликий і це забезпечує надійну стерильність. Згідно зі складом, поживне середовище розділено на три композиції:

- **Композиція А (органічна):** розчинний крохмаль, глюкоза, пептон, дріжджовий екстракт. Ці компоненти є термолабільними (містять вуглеводи та білки), тому їх стерилізують у м'якому режимі – 112 °C (0,05 МПа) протягом 30 хв. Перед стерилізацією композиції А слід прогріти на водяній бані (~70–90 °C) з перемішуванням, щоб розчинити і частково клейстеризувати крохмаль (це покращить подальше засвоєння його грибом). Після, вносимо решту компонентів до колби: глюкозу, пептон, дріжджовий екстракт та перемішуємо до повного

розчинення останніх. Стерилізацію проводимо в тій же колбі, заповненій не більше ніж наполовину, щоб уникнути википання.

- **Композиція Б (стабільні солі):** KCl і MgSO₄·7H₂O. Ці неорганічні солі термостабільні й не взаємодіють між собою, тому стерилізуються разом при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв.
- **Композиція В (фосфат):** KН₂РO₄. Фосфатна сіль стерилізується окремо від магнієвої солі, оскільки при нейтральному рН і високій температурі можливе утворення малорозчинного осаду – фосфату магнію (Mg₃(PO₄)₂). Режим стерилізації KН₂РO₄: 131 °C, 40 хв, 0,15 МПа.

Процес приготування середовища для колбової стадії наступний: компоненти композиції А розчиняють у відмереному об'ємі води та поміщають у велику колбу, яку автоклавують у м'якому режимі. Паралельно у двох менших колбах готують композицію Б (розчиняючи KCl і сульфат магнію) та композицію В (розчиняючи фосфат калію); їх стерилізують окремо при жорсткому режимі. Після охолодження колби Б і В до ~25 °C, їх вміст швидко та асептично переливають у колбу з композицією А. Таким чином отримують повне стерильне середовище, яке після перемішування розливають по 4 колбах (робочий об'єм ~0,15 л на кожну колбу об'ємом 0,75 л). Розрахунок кількості компонентів для приготування 600 мл середовища наведено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1 – Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на шейкері (об'єм середовища – 600 мл)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Розчинний крохмаль	10,0	6,0	А	500
Глюкоза	30,0	18,0		
Пептон	10,0	6,0		

Дріжджовий екстракт	5,0	3,0		
Дистильована вода	500 мл			
KCl (хлорид калію)	2,0	1,2	Б	50
MgSO ₄ ·7H ₂ O (сульфат магнію)	0,5	0,3		
Дистильована вода	50 мл			
KH ₂ PO ₄ (фосфат калію однозаміщений)	1,0	0,6	В	50
Дистильована вода	50 мл			
Загальний об'єм, мл				600

Як видно з табл. 2.1, основна частина води (500 мл) використовується для розчинення органічних компонентів (комп. А), тоді як солі розчиняють в менших об'ємах (по 50 мл для Б і В). Сумарний об'єм води відповідає 600 мл – після змішування композицій отримуємо необхідний об'єм середовища. Зважаючи на дуже малу кількість фосфатної солі та відсутність у цій стадії важких металів, додаткове коригування рН не проводиться (роздільна стерилізація усуває ризик випадіння осаду).

4.3.2. Особливості підготовки і стерилізації середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах та виробничому ферментері

На наступних трьох стадіях підготовки інокуляту процес культивування відбувається у послідовно більших ферментаційних апаратах – інокуляторах об'ємом 10 л, 100 л та 1 м³. Відповідні робочі об'єми середовища становлять 6 л, 60 л та 600 л. Рецептатура середовища залишається незмінною, але методика підготовки дещо відрізняється від лабораторної, оскільки великі об'єми ефективніше готувати із

застосуванням стаціонарних змішувачів-стерилізаторів і з мінімізацією кількості окремих операцій. Для цих стадій приймаємо двокомпонентну схему стерилізації: всі компоненти середовища поділяємо на дві композиції – А та Б:

- **Композиція А:** розчинний крохмаль, глюкоза, пептон, дріжджовий екстракт (усі органічні інгредієнти). Цю композицію готують у концентрованому вигляді в окремому реакторі-стерилізаторі, оснащеному теплообмінною сорочкою та мішалкою. Відповідну наважку крохмалю суспензують у воді; суміш нагрівають до 70–90 °С (подачею пари в сорочку) і витримують ~20 хв для розварювання крохмалю. Після цього, додають решту зважених компонентів: глюкозу, пептон і дріжджовий екстракт. Розчин композиції перемішують для розчинення останніх. Отриману композицію стерилізують при 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа. Отриманий стерильний розчин перекачують перистальтичним насосом в посівний апарат (інокулятор).
- **Композиція Б:** КСl, КН₂РО₄, MgSO₄·7Н₂О (мінеральні солі). Всі солі розчиняють разом у колбі. Щоб уникнути утворення осаду фосфату магнію, після розчинення солей здійснюється *корекція рН*: додаємо до сольового розчину потрібну кількість 6% розчину НСl, щоб знизити рН до ~4,5. У кислих умовах іони Mg²⁺ та НРО₄²⁻ не утворюють нерозчинної сполуки. Солеву композицію Б після підкислення стерилізують при 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа у автоклаві. Охолоджений стерильний розчин солей вносять через спеціальний стерильний дозатор до інокулятора, де вже знаходиться композиція А.

Після того як композиції А і Б змішані в посівному апараті, проводиться *нейтралізація середовища*: до стерильної суміші додають порціями 6% розчин NaOH (стерилізований заздалегідь) до досягнення рН ≈6,0. Це є оптимальним рівнем для росту *A. oryzae* та біосинтезу ферменту. Після коригування рН середовище охолоджують до робочої температури 30 °С і лише потім вносять необхідний об'єм посівного матеріалу з попередньої стадії.

Розраховані кількості компонентів поживного середовища для посівних стадій наведено у таблицях 2.2–2.4. У кожному випадку визначено маси або об'єми

компонентів на потрібний об'єм середовища та особливості приготування композицій.

Таблиця 4.2 – Композиції стерилізації компонентів для середовища інокулятора об'ємом 10 л (робочий об'єм – 6 л)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Розчинний крохмаль	10,0	60,0	А	4,4
Глюкоза	30,0	180,0		
Пептон	10,0	60,0		
Дріжджовий екстракт	5,0	30,0		
Питна вода	3,96 л			
Конденсат (10%)	0,44 л			
КСІ	2,0	12,0	Б	1*
КН ₂ РО ₄	1,0	6,0		
МgSO ₄ ·7Н ₂ О	0,5	3,0		
Питна вода	0,9 л			
Конденсат (10%)	0,1 л			
Загальний об'єм, л				5,4

*- До стерилізації композиції Б у інокуляторі об'ємом 10 л, після внесення розчину солей композиції Б з колб буде додано лічильником ще 0,8 л води у інокулятор

Таблиця 4.3 – Композиції стерилізації компонентів для середовища інокулятора
об'ємом 100 л (робочий об'єм – 60 л)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 60 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Розчинний крохмаль	10,0	600,0	А	44
Глюкоза	30,0	1800,0		
Пептон	10,0	600,0		
Дріжджовий екстракт	5,0	300,0		
Питна вода	39,6 л			
Конденсат (10%)	4,4 л			
КСІ	2,0	120,0	Б	10*
КН ₂ РО ₄	1,0	60,0		
МgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	30,0		
Питна вода	9 л			
Конденсат (10%)	1 л			
Загальний об'єм, л				54

*- До стерилізації композиції Б у інокуляторі об'ємом 100 л, після внесення розчину солей композиції Б з колб буде додано лічильником ще 8 л води у інокулятор

4.3.3. Особливості підготовки і стерилізації середовища для виробничого біосинтезу

Виробнича стадія процесу культивування здійснюється у ферментері геометричним об'ємом 1 м^3 що має робочий об'єм 600 л. Посівний матеріал для цієї стадії (об'ємом 60 л) надходить з попереднього інокулятора (100 л).

Враховуючи об'єм апарата (1 м^3) та необхідність забезпечення високої якості поживного середовища без втрати поживних властивостей (карамелізації цукрів, денатурації білків, випадіння осадів солей), використання установки безперервної стерилізації (УБС) є недоцільним. Тому для виробничого ферментера приймаємо двокомпонентну схему періодичної стерилізації, аналогічну тій, що використовується на стадіях підготовки інокуляту.

Усі компоненти середовища поділяємо на дві композиції - А та Б:

1. Підготовка та стерилізація Композиції А (органічна частина)

До складу композиції входять: розчинний крохмаль, глюкоза, пептон та дріжджовий екстракт.

Приготування і стерилізація здійснюється в окремому реакторі-стерилізаторі (об'ємом 750 л) з теплообмінною сорочкою.

Спочатку у розрахунковому об'ємі води суспензують крохмаль. Суміш нагрівають до $70 - 90^\circ\text{C}$ і витримують близько 20 хв для клейстеризації крохмалю. Після додають решту компонентів (глюкозу, пептон, екстракт) та перемішують мішалкою до повного розчинення останніх. Стерилізацію проводять у цьому ж реакторі в «м'якому» режимі: при температурі 112°C протягом 30 хв (тиск 0,05 МПа). Отриманий стерильний концентрат охолоджують та асептично перекачують у виробничий ферментер.

2. Підготовка та стерилізація Композиції Б (сольова основа)

До складу композиції входять мінеральні солі: KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Приготування композиції здійснюється у реакторі-змішувачі об'ємом 25 л. Після повного розчинення необхідної наважки солей, готовий розчин відцентровим насосом подається до виробничого ферментеру.

У ферментер заливають основну частину води (розрахунковий об'єм з вирахуванням об'єму Композиції А, конденсату та інокуляту). Для запобігання утворенню нерозчинного осаду фосфату магнію ($Mg_3(PO_4)_2$) проводять підкислення розчину: додають 6% розчин HCl до зниження рН 4,5. Стерилізацію Композиції Б проводять у ферментері гострою парою при $131^\circ C$ протягом 40 хв (тиск 0,15 МПа). Під час стерилізації утворюється конденсат, який збільшує об'єм рідини до розрахункового.

Після стерилізації сольової основи у ферментер асептично подають стерильну Композицію А. Суміш охолоджують до $30^\circ C$. Для створення оптимальних умов біосинтезу проводять нейтралізацію середовища: додають стерильний 6% розчин $NaOH$ до досягнення рН 6,08. Після встановлення заданого рН та температури у ферментер вносять 60 л посівного матеріалу.

Таблиця 4.4 – Композиції стерилізації компонентів для середовища інокулятора об'ємом 1 м^3 (робочий об'єм – 600 л)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Розчинний крохмаль	10,0	6,0	А	440
Глюкоза	30,0	18,0		
Пептон	10,0	6,0		
Дріжджовий екстракт	5,0	3,0		
Питна вода	396 л			
Конденсат (10%)	44 л			
KCl	2,0	1,2	Б	100*

K_2HPO_4	1,0	0,6		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,3		
Питна вода	90 л			
Конденсат (10%)	10 л			
Загальний об'єм, л				540

*- До стерилізації композиції Б у інокуляторі об'ємом 100 л, після перекачування розчину солей композиції Б з реактора-змішувача, буде додано лічильником ще 80 л води у ферментер

На кожній із наведених стадій після завершення стерилізації композицій і змішування їх в посівному апараті до середовища додається стерильний піногасник F1154 – 0,6 мл для 6 л, 6 мл для 60 л, 60 мл для 600 л середовища (відповідає 0,1 мл на літр). Завдяки наявності піногаснику, подальше піноутворення значно зменшується (див. підрозділ 2.4). Оскільки процес ведеться у періодичному режимі, а вихідна концентрація вуглеводів (40 г/л) є достатньою, приготування окремого підживлювального розчину не передбачається. Усі компоненти вносяться одразу на етапі підготовки базового середовища.

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

Для успішного культивування продуцента важливо контролювати кислотність середовища як на етапі стерилізації, так і протягом росту культури. У нашій технологічній схемі застосовуються такі титрувальні агенти: розчин хлоридної кислоти (HCl) для підкислення середовища перед стерилізацією та розчин гідроксиду натрію (NaOH) для нейтралізації й підтримання оптимального рН.

Вибір саме цих реагентів обумовлений їх ефективністю та сумісністю з поживним середовищем. *Хлоридна кислота* (неорганічна сильна кислота) обрана для корекції рН перед стерилізацією солей (композиція Б) з таких причин: (1) вона не вступає в побічні реакції з компонентами середовища, окрім нейтралізації лугів; (2)

хлорид-іони не утворюють осадів з катіонами живильного середовища (на відміну від, скажімо, сульфатної кислоти, яка могла б давати осад сульфатів); (3) надлишковий хлорид не шкодить розвитку гриба при низьких концентраціях. Згідно з розрахунками, для зниження рН ~1 л середовища до 4,5 необхідно приблизно 2 мл 6%-го *HCl*. Тому завчасно готуємо необхідний об'єм 6%-го розчину хлоридної кислоти (в концентрації ~1,8 М): він буде використаний для всіх посівних стадій. Наприклад, для 60 л середовища потрібно близько 120 мл такого розчину, для 60 л – ~1,2 л, тощо. Розчин *HCl* готується у хімічно стійкій колбі – спершу відміряють потрібний об'єм води, а тоді при постійному охолодженні і перемішуванні поволі додають концентровану кислоту до отримання 6% концентрації. Увага: розчин *HCl* використовується *тільки* для коригування рН перед стерилізацією композиції Б.

Гідроксид натрію (луг) застосовується на двох етапах: (1) для нейтралізації підкисленого середовища після стерилізації (повернення рН ~6,0 перед засівом); (2) для підтримання стабільного рН протягом культивування. Обираємо 6%-й розчин *NaOH* для першого завдання, оскільки в такій концентрації луг достатньо сильний для корекції рН, але ще відносно безпечний і неагресивний до обладнання (на відміну від більш концентрованих розчинів). 6%-й *NaOH* готуємо на дистильованій воді: потрібну масу гранульованого *NaOH* обережно розчиняють у воді при охолодженні, доводять об'єм до розрахункового і стерилізують розчин в автоклаві (131 °С, 40 хв). Об'єм цього розчину розраховують рівним об'єму витраченої кислоти – для нейтралізації 1 мл 6% *HCl* потрібно приблизно 1 мл 6% *NaOH*. Отже, для 60 л середовища знадобиться ~120 мл 6% *NaOH*.

Для підтримання рН у процесі культивування обираємо більш концентровані розчини – 15%-й *NaOH* та 15%-й *HCl*. Під час росту гриба рН середовища може знижуватися (за рахунок виділення органічних кислот, споживання амонію тощо). Щоб оперативно компенсувати ці зміни без внесення надто великого об'єму рідини, використовують 15%-й луг та кислоту: вони дозволяють мати запас нейтралізуючої здатності у малому об'ємі. Розчини 15% готують аналогічно. Зберігають у герметичній ємності. Виробничий ферментер оснащений системою автоматичного дозування луку та кислоти: при відхиленні рН від заданого ($6,0 \pm 0,2$) спрацьовує насос,

що додає необхідну кількість 15% NaOH або 15% HCl. Таким чином, протягом усього процесу вдається підтримувати оптимальний рівень кислотності, сприятливий для біосинтезу α -амілази.

Для проєктного розрахунку прийнято характерний інтервал сумарної кислотності, що компенсується під час росту мікроміцету, - 0,01–0,02 моль H^+ на 1 л середовища за весь цикл культивування. Для робочого об'єму 600 л це становить 0,8 моль на 1 літр середовища, що відповідає потребі в ≈ 480 мл 15% NaOH. Для періодичних корекцій рівня рН у зворотному напрямку передбачають 480 мл 15% HCl. Такий обсяг дозволяє стабільно підтримувати оптимальний рівень кислотності середовища протягом усього виробничого циклу.

Титрувальні реагенти 6% HCl і 6% NaOH вибрано з метою забезпечення правильного рН на посівних стадіях без утворення осадів і деградації середовища, а 15% NaOH та 15% HCl – для ефективної стабілізації рН в процесі культивування. Застосування саме цих концентрацій є технічно обґрунтованим компромісом між ефективністю нейтралізації та безпечністю виконання операцій. Відповідні розрахунки наведені у табл. 2.5. нижче:

Таблиця 4.5

Розрахунок об'ємів титрувальних агентів для різних стадій культивування

Стадія культивування	Робочий об'єм середовища, л	6% розчин HCl (для підкислення), мл		6% розчин NaOH (для нейтралізації), мл		15% розчин NaOH (для підтримання рН)		15% розчин HCl (для підтримання рН)	
		Об'єм, мл	Особливості приготування	Об'єм, мл	Особливості приготування	Об'єм, мл	Особливості приготування	Об'єм, мл	Особливості приготування

					стерилі зації		стерилі зації		стерилі зації
Вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л	6	~12	Готуються у колбах об'ємів	~12	Готуються у колбах об'ємів	-	-	-	-
Вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л	60	~120	50 мл; 750 мл	~120	50 мл; 750 мл	-	-	-	-
Виробництво культивування у ферментері 1 м ³	600	-*	-*	-*	480 мл. Дозується автоматично за сигналом рН-датчика	Готуються у колбі об'ємом 1 л	480 мл. Дозується автоматично за сигналом рН-датчика	Готуються у колбі об'ємом 1 л	Готуються у колбі об'ємом 1 л

* - для стерилізації виробничого середовища використовується установка безперервної стерилізації (УБС), що не потребує попереднього підкислення та нейтралізації.

4.5. Обґрунтування вибору піногасника

Інтенсивна аерація середовища, необхідна для культивування *Aspergillus oryzae*, неминуче призводить до утворення піни. Піноутворення спричиняють присутні у середовищі *поверхнево-активні речовини* – білки (пептон, дріжджовий екстракт), полісахариди, продукти метаболізму. Надмірна піна в ферментері є небажаною, оскільки: (1) зменшує ефективний робочий об'єм апарату; (2) погіршує масообмін (кисень гірше дифундує через піну у рідину); (3) може спричинити збої в роботі датчиків (рівня, рН, розчиненого кисню); (4) несе ризик винесення культури через піновловлювач та інфікування навколишнього середовища. Тому контроль піни – важлива допоміжна задача.

Існують механічні (ломики піни, рециркуляція піни) та хімічні методи боротьби з піноутворенням. Для процесу біосинтезу α -амілази рекомендовано використовувати хімічний піногасник марки F1154 на основі поліалкіленгліколю. Даний піногасник характеризується високою ефективністю, хімічною інертністю щодо біосистеми, відсутністю токсичної дії на продуцента та стабільністю при стерилізації. Поліалкіленгліколь не впливає на активність α -амілази, не змінює структуру клітинної мембрани і не порушує процесів дихання грибів.

Дозування піногасника здійснюється автоматично за сигналом від датчика рівня піни, встановленого у верхній частині ферментера. Для цього передбачено спеціальну систему подачі антипіну, яка складається з резервуару (ємність об'ємом 10 л), дозувального насоса та стерильного трубопроводу, сполученого з апаратом біосинтезу. Такий спосіб введення забезпечує точність подачі піногаснику та мінімальні коливання концентрації у середовищі. Кількість піногасника F1154, що вводиться у процесі, становить близько 0,1% від робочого об'єму середовища, залежно від інтенсивності аерації. При цьому перед введенням піногасник проходить стерилізацію у окремій посудині при 112 °С протягом 20–30 хвилин. Розрахунок

кількості піногаснику F1154 для кожної стадії культивування наведено нижче у таблиці 4.6.:

Таблиця 4.6

Розрахунок необхідної кількості піногаснику F1154 для різних стадій культивування

Стадія культивування	Робочий об'єм середовища, л	Концентрація піногаснику, мл/л	Необхідний об'єм піногаснику, мл	Ємність для стерилізації та внесення до інокуляторів/ферментеру та кількість
Вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л	6	0,1	0,6	Колба об'ємом 150 мл
Вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л	60	0,1	6,0	
Виробниче культивування у ферментері 1 м ³	600	0,1	60,0	

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА α -АМІЛАЗИ

Таблиця 5.1 – Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу α -АМІЛАЗИ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
РС-1	Реактор-стерилізатор	1	Об'єм: 10 л; матеріал змочуваних частин: SUS316L / SUS304; оснащення: сорочка (міжшар. об'єм $\approx 3,8$ л), кришка з 8 портами, оглядові скла; ущільнення: комбіноване нерж.-графіт механічне; параметри: $t -120 \dots +260$ °C; $p -0,1 \dots 0,3$ МПа; перемішування: 0–460 об/хв; привід: 200 Вт; живлення: 220 В, 50 Гц. Zhengzhou Laboao Instrument Equipment Co., Ltd [41].
ПН-2	Перистальтичний насос	1	Призначення: подача/злив для реактора; діапазон витрат: 0,001–3400 мл/хв (до 3,4 л/хв); швидкість приводу: до 600 об/хв; керування: цифрове, режими безперервний/дозований, інтерфейси дистанц. керування; змочувані частини: трубка Masterflex L/S. Cole-Parmer / Masterflex [42].
I-3	Інокулятор	1	Об'єм: 10 л; матеріал: AISI 316L (контактні частини); СІР; подвійна сорочка; робочий тиск до 1,9 bar(g); мішалка: безщітковий привід, 1–1500 об/хв, імпелери Rushton/Marine/Pitched blade; датчики: рН, рО ₂ , температура (РТ100), тиску; барботер; габаритні розміри: 500×500×1500 мм. Solaris Biotech GENESIS 10 L [43].

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ		
Змн.	Лист.	№ докum.	Підпис	Дата			
Розроб.	Кучерук Ю.А.				Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.						59	101
Керівник	Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ 59		
Н. Контр.							
Зав. кафедри	Стабніков В.П.						
					РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА α -АМІЛАЗИ		

РС-4	Реактор-стерилізатор	1	Об'єм: 75 л; матеріал змочуваних частин: AISI 316L; оснащення: парова сорочка, виконання «pressure/vacuum», змонтований на рамі; параметри: сорочка –1...6 бар, апарат –1...4 бар; мішалка: верхній привід 5 кВт. Bioengineering AG / Centriplant [44].
ПН-5	Перистальтичний насос	1	Тип: промисловий із закритим кроковим двигуном; діапазон витрат: 1,0–30 л/хв; потужність: <300 Вт; керування: 3,2" LCD, RS232/RS485; помпоголово: DZ45 (4 ролики), корпус алюміній/нерж. сталь 304. Aspen / Nanalysis Scientific – модель N6-30L [45].
І-6	Інокулятор	1	Об'єм: 100 л; СІР; матеріал: AISI 316L; тиск до 3,45 bar (50 psig); мішалка нижнього приводу, імелери Rushton (3 шт); швидкість мішалки: 50–500 об/хв; датчики: рН, DO, RTD; вбудовані тензодатчики; габарити: 1220 × 860 × 2390 мм; Eppendorf BioFlo® 610 [46].
ЗЗ-7	Збірник-змішувач	1	Об'єм: 25 л; тип: вертикальний з конічним дном; матеріал: нерж. сталь; оснащення: нагрівальна стрічка (мод.), пропелерна мішалка; габарити: Ø240 × 930 мм. Surplus Select B.V. [47].
Н-8	Відцентровий насос	1	Тип: INOXPA HYGINOX SE-15; матеріал: AISI 316L (проточні), AISI 304 (інші); ущільнення: механічне (C/SiC), EPDM; тиск: 10 бар; t: –10...+120 °С; двигун: 0,25 кВт, 1450 об/хв; продуктивність: 1,5–6 м³/год; під'єднання: DIN 11851. INOXPA S.A.U. [48].
РС-9	Реактор-стерилізатор (композиція А)	1	Об'єм: 750 л; матеріал: AISI 316L; оснащення: сорочка (69 л), вакуум; мішалка: пропелерна, 0,25 кВт, 94 об/хв; тиск: до 3 бар; t макс: 140 °С. Applikon [49].
Н-10	Мембранний насос	1	Тип: пневматичний (AODD) Tapflo T225; матеріал: AISI 316L, діафрагми EPDM/PTFE; продуктивність: до 330 л/хв; тиск: 8 бар; t: –20...+110 °С; під'єднання:

			Clamp 2"; габарити: 360×420×639 мм. Tapflo AB [50].
ФР-11	Виробничий ферментер	1	Об'єм: 1000 л; СІР; матеріал: AISI 316L; мішалка: 3-лопатеві імпелери Lightnin A310, 0–120 об/хв, 2,24 кВт; тиск (MAWP): корпус ≈ 3,1 бар, сорочка ≈ 8,6 бар; датчики: рН, DO, температура, тиск, рівень; габарити: 3048×1524×3632 мм; Dakota Systems BRX1000 [51].

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічний процес виробництва ферментного препарату α -амілази за участю мікроміцету *Aspergillus oryzae* складається з допоміжних та основних стадій. До стадій допоміжних робіт (ДР) належать: підготовка титрувальних розчинів для регуляції рН, приготування та стерилізація поживних середовищ, підготовка стерильного аераційного повітря. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносяться: підготовка посівного матеріалу (інокуляту) та безпосередньо виробничий біосинтез α -амілази. Технологічну й апаратурну схеми виробництва наведено у графічній частині проєкту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря для процесу культивування забирають через спеціальний повітрязабірник, розташований на висоті $\sim 15\text{--}18$ м над рівнем землі (вище ферментаційного відділення). Забір на такій висоті дозволяє зменшити вміст пилу та мікрофлори у вхідному повітрі.

ДР 1.2. Очищення повітря від грубих домішок

Потік повітря, що надходить від повітрязабірника (ДР 1.1), спочатку проходить через систему попередніх фільтрів грубої очистки (тканинні або сітчасті фільтри). На цьому етапі видаляються великі частки пилу (понад 50 мкм), що дозволяє знизити загальну контамінацію повітря.

ДР 1.3. Стискання та первинний нагрів

Очищене попередньо повітря стискається компресором до робочого тиску (близько 0,3–0,5 МПа). Внаслідок адіабатичного стискання температура повітря підвищується приблизно до 120–150 °С.

ДР 1.4. Охолодження та видалення зайвої вологи

Стиснене гаряче повітря направляють до теплообмінника-охолоджувача, де воно охолоджується до температури точки роси (близько 25 °С).

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кучерук Ю.А.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркцнів
Консульт.							62	101
Керівник		Резніченко Ю.М.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.						62		
Зав. кафедри		Стабніков В.П.						

При цьому відбувається конденсація надлишкової вологи. Конденсат разом із можливими слідами компресорного мастила відокремлюється у ресивері. Ресивер також слугує демпфером, згладжуючи пульсації повітряного потоку після компресора і стабілізуючи тиск подачі.

ДР 1.5. Підігрів повітря

Охолоджене осушене повітря спрямовують у теплообмінник-нагрівач, де підігрівають до $\sim 45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ за допомогою пари низького тиску. Це запобігає повторній конденсації вологи та забезпечує стабільні параметри (температуру, відносну вологість) перед тонким очищенням.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

На наступному етапі повітря проходить через основні ємнісні фільтри тонкого очищення (ефективність $\sim 95\%$), розташовані перед входом повітря в біореактори. Дані фільтри затримують більшість залишкових пилових часток і мікроорганізмів.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

Остаточна стерилізація повітря здійснюється безпосередньо перед подачею в кожен ферментер. Повітря на вході в апарати проходить через індивідуальні мембранні мікрофільтри (гідрофобні фільтри тонкого очищення) з ефективністю не менше 99,99%. Через ці фільтри стерильне повітря подається в аераційну систему кожного біореактора (ТП 4.5 - ТП 4.7, ТП 5.1) для підтримання культивування.

ДР 2. Приготування допоміжних розчинів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl для інокуляторів 10 л та 100 л.

Для підготовки 132 мл 6%-го розчину хлоридної кислоти (HCl) відміряють 110 мл дистильованої води, яку заливають у хімічно стійку колбу об'ємом 250 мл. Потім, дотримуючись правил техніки безпеки, обережно, при постійному перемішуванні на холодній бані, додають 22 мл концентрованої (36%) HCl. Після внесення всього об'єму кислоти суміш ретельно перемішують протягом 5–10 хвилин до повної гомогенізації. Готовий розчин охолоджують та зберігають у герметично закритій колбі.

ДР 2.1.1. Приготування 15% розчину HCl для виробничого ферментера 1 м³.

Для підготовки 480 мл 15%-го розчину хлоридної кислоти (HCl) відміряють 280 мл дистильованої води, яку заливають у хімічно стійку колбу об'ємом 750 мл. Потім, дотримуючись правил техніки безпеки, обережно, при постійному перемішуванні і на холодній бані, додають 200 мл концентрованої (36%) HCl. Після внесення всього об'єму кислоти суміш ретельно перемішують протягом 5–10 хвилин до повної гомогенізації. Готовий розчин охолоджують та зберігають у герметично закритій колбі.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для інокуляторів 10 л та 100 л

Для нейтралізації середовищ в інокуляторах необхідно підготувати невелику кількість лугу. На технічних вагах зважують 8 г гранульованого NaOH. У колбі об'ємом 350 мл розчиняють наважку у 132 мл дистильованої води. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 30 хвилин. Цей розчин використовують для стадій ТП 4.5 та ТП 4.6.

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація 15% розчину NaOH для виробничого ферментера 1 м³

Для нейтралізації середовища у виробничому ферментері (ФР-11) необхідно близько 480 мл 15%-го розчину NaOH. На технічних вагах зважують 90 г NaOH, наважку переносять до колби об'ємом 1 л. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 30 хвилин.

ДР 2.3. Приготування і стерилізація розчину піногасника

Кількість 10% водної емульсії піногасника F1154, необхідна для забезпечення всіх стадій виробничого циклу, складає приблизно 66,6 мл. Для приготування розчину з запасом готують 100 мл емульсії. Для приготування розчину, беруть колбу 350 мл, вносять, виміряної з мірного циліндру, 90 мл дистильованої води. До колби додають 10 мл піногасника F1154. Суміш ретельно перемішують протягом 10-15 хвилин до утворення стабільної гомогенної емульсії білого кольору. Готову емульсію герметично закривають марлеватним корком та стерилізують в автоклаві при 131°C (0,1 МПа) протягом 30 хвилин. Стерильний розчин піногасника зберігають у

захищеному від світла місці та використовують для автоматичної подачі у інокулятори/виробничий ферментер на всіх стадіях культивування.

ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на орбітальних шейкерах

Для першого етапу культивування інокуляту (лабораторна стадія) готують 0,6 л поживного середовища. Вказаний об'єм розподіляють між чотирма колбами Ерленмейера місткістю 750 мл (робочий об'єм однієї колби – 150 мл). Формула середовища на 1 л включає: розчинний крохмаль – 10,0 г; глюкоза – 30,0 г; пептон – 10,0 г; дріжджовий екстракт – 5,0 г; KCl – 2,0 г; K_2HPO_4 – 1,0 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г; вода – до 1 л. Компоненти середовища об'єднують у три композиції (А, Б, В) для окремої стерилізації.

ДР 3.1.1. Підготовка та стерилізація композиції А.

На технічних вагах відважують 6 г розчинного крохмалю, 18 г глюкози, 6 г пептону та 3 г дріжджового екстракту. Спочатку, сухий компонент крохмаль переносять у конічну колбу ємністю 1 л. Відміряють 500 мл дистильованої води і додають до суміші, після чого інтенсивно перемішують на гарячій водяній бані (70-90°C) до утворення однорідної суспензії. Після, вносять наважки глюкози, пептону та дріжджового екстракту та перемішують до їх повного розчинення. Стерилізацію композиції А проводять в автоклаві за щадного режиму (112 °C, 0,05 МПа) протягом 30 хвилин, щоб уникнути карамелізації вуглеводів. Після завершення циклу стерилізації проводять мікробіологічний контроль стерильності середовища.

ДР 3.1.2. Підготовка та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах зважують 1,2 г хлориду калію (KCl) і 0,3 г сульфату магнію 7-водного ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Солі переносять у чисту колбу ємністю 150 мл, додають 50 мл дистильованої води і перемішують колбу круговими рухами до повного розчинення солей. Отриманий розчин (композиція Б) стерилізують окремо в автоклаві при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хвилин. Після стерилізації проводять контроль середовища на відсутність контамінації.

ДР 3.1.3. Підготовка та стерилізація композиції В.

В окрему стерильну колбу ємністю 150 мл відважують 0,6 г дигідрофосфату калію (K_2HPO_4) і додають 50 мл дистильованої води. Розчин перемішують до повного розчинення солі. Стерилізацію композиції В проводять окремо від композиції Б (що містить магнієві солі) для запобігання утворенню осаду $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ при високій температурі. Стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хвилин. Після автоклавування проводять мікробіологічний контроль стерильності.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Для наступної стадії культивування (лабораторний інокулятор на 10 л) готують 6,0 л поживного середовища. Склад середовища ідентичний попередньому (на 1 л), а робочий об'єм апарата становить 6 л (к.з. $\approx 0,6$). Компоненти середовища об'єднують у дві композиції – А (органічна частина) та Б (мінеральна частина) – з роздільною стерилізацією.

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах відважують 60 г розчинного крохмалю, 180 г глюкози, 60 г пептону та 30 г дріжджового екстракту. Спочатку, завантажують розчинний крохмаль у допоміжний реактор-змішувач об'ємом 10 л (РС-1). За допомогою лічильника подають 4,4 л питної води в реактор і вмикають механічну мішалку. Для кращого розчинення, розчин нагрівають парою в сорочці реактора до 70–90 °С при постійному перемішуванні протягом 20–30 хвилин до повного розварення крохмалю. Після, вносять наважки глюкози, пептону та дріжджового екстракту та перемішують розчин до їх повного розчинення. Отриманий концентрований розчин органічних компонентів (композиція А) стерилізують окремо при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хвилин. Після стерилізації проводять відбір проб на стерильність і асептично перекачують стерильну композицію А через перистальтичний насос (ПН-2) у 10-літровий інокулятор (І-3).

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних вагах відважують 12 г KCl , 3 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 6 г K_2HPO_4 . Солі завантажують безпосередньо в колбу об'ємом 750 мл, заливають 200 мл питної води, відміряної на мірному циліндрі, перемішують до повного розчинення солей. Після,

вміст з колби переносять до І-3, наповненого 0,8 л питної води через лічильник. Вмикають мішалку інокулятора для рівномірного розподілу розчину солей. Щоб запобігти утворенню нерозчинного осаду фосфату магнію під час стерилізації, рН сольового розчину (композиція Б) доводять до ~4,5 додаванням нестерильного 6%-го розчину HCl (приготованого в ДР 2.1). Стерилізацію композиції Б проводять у посівному апараті гострою парою при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хвилин. Після охолодження середовища до робочої температури відбирають пробу для мікробіологічного контролю.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

Для третьої стадії підготовки посівного матеріалу готують 60 л поживного середовища (робочий об'єм 100-літрового інокулятора становить 60 л, к.з.=0,6). Склад середовища залишається незмінним, компоненти об'єднують у композиції А і Б з урахуванням масштабування.

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А.

За допомогою технічних вагів зважують 0,6 кг розчинного крохмалю, 1,8 кг глюкози, 0,6 кг пептону та 0,3 кг дріжджового екстракту. Спочатку, сухий компонент крохмаль завантажують у реактор-стерилізатор об'ємом 75 л (РС-4). До реактора через лічильник подають 44 л питної води. Вмикають механічну мішалку і подають пару в сорочку реактора для нагрівання розчину до 70–90 °С. Суміш витримують при цій температурі 20–30 хвилин для повного розварювання крохмалю. Після, вносять наважки глюкози, пептону та дріжджового екстракту та перемішують розчин до їх повного розчинення. Отриману композицію А стерилізують при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хвилин, після чого відбирають пробу на стерильність і асептично перекачують стерильний концентрат перистальтинчим насосом (ПН-5) в інокулятор об'ємом 100 л (І-6).

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б.

На технічних вагах відважують 0,12 кг KCl, 0,03 кг MgSO₄·7H₂O та 0,06 кг KН₂РO₄. Солі переносять до колби об'ємом 3 л, додають 2 л питної води перемішують до повного розчинення. Отриманий розчин переносять у інокулятор 100 л (І-6), куди

було додано 8 л питної води через лічильник. Вмикають мішалку та перемішують до повного розчинення солей, підігрівуючи розчин до 40–45 °С (глухою парою в сорочці). Для уникнення випадіння осаду фосфатів магнію рН сольового розчину доводять до ~4,5 6%-м розчином НСІ (з ДР 2.1). Стерилізацію композиції Б здійснюють у апараті парою при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хвилин. Після охолодження до робочої температури проводять контроль стерильності середовища.

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у виробничому ферментері об'ємом 1 м³

На четвертій посівній стадії готують ~600 л середовища (робочий об'єм проміжного ферментера 1 м³ становить 600 л, к.з.=0,6). Склад середовища аналогічний; компоненти знову розподіляють на композиції А і Б.

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А.

На ваговому дозаторі зважують 6 кг розчинного крохмалю, 18 кг глюкози, 6 кг пептону та 3 кг дріжджового екстракту. Спочатку, сухий компонент крохмаль завантажують у допоміжний реактор-змішувач об'ємом 750 л (РС-9). До реактора через лічильник об'єму подають 440 л питної води. Вмикають механічну мішалку та подають пару в сорочку, нагріваючи суміш до 70–90 °С. Витримують при цій температурі 20–30 хвилин для повного розварювання крохмалю. Після, вносять наважки глюкози, пептону та дріжджового екстракту та перемішують розчин до їх повного розчинення. Стерилізують у тому ж реакторі-стерилізаторі. Простерилізовану при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хвилин композицію А охолоджують, відбирають пробу на стерильність і асептично перекачують мембранним насосом (Н-10) у виробничий ферментер об'ємом 1 м³ (ФР-11).

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б.

На ваговому дозаторі відважують 1,2 кг КСІ, 0,3 кг MgSO₄·7H₂O та 0,6 кг КН₂РО₄. Солі завантажують в збірник-змішувач з конічним дном (ЗЗ-7) об'ємом 25 л, додають 20 л питної води. Вмикають мішалку та перемішують розчин при 40–45 °С (з підігрівом) до повного розчинення солей. Отриманий розчин перекачують відцентровим насосом (Н-8) до виробничого ферментеру (ФР-11). Щоб уникнути утворення осаду фосфату магнію під час стерилізації, отриманий розчин солей

підкислюють до рН $\sim 4,5$ додаванням 15%-го HCl (з ДР 2.1.1). Стерилізацію композиції Б проводять у апараті парою при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хвилин. Після охолодження до робочої температури відбирають пробу для контролю стерильності.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру продуцента *Aspergillus oryzae* (штам OSI1013) зберігають на скошеному агаризованому середовищі (картопляно-декстрозний агар, КДА) в пробірках. Для підтримання життєздатності та стабільності властивостей штаму кожні 2–3 місяці проводять його пересів на свіже поживне середовище (освоєння нових похідних культур). Пробірки зі штамом зберігають у холодильнику при $+4\pm 2$ °C до використання.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

З метою активації росту культуру із пробірок зі скошеним КДА висівають на чашки Петрі з тим самим агаризованим середовищем. Інкубацію чашок проводять при 30 ± 1 °C протягом 24–48 годин, поки не з'явиться помітний ріст грибниці та спороношення. Далі з однієї чашки переносять отриману культуру на декілька нових похідних середовищ: асептично пересівають споривий матеріал на 6 свіжих пробірок зі скошеним КДА. Пробірки інкубують у термостаті при 30 ± 1 °C наступні 72 години, отримуючи необхідну масу грибних спор для постановки посіву.

ТП 4.3. Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі

Для приготування активного посівного матеріалу культури *A. oryzae* здійснюють накопичення спор на поверхні твердого поживного середовища. Після 72 годин інкубації на скошеному КДА зріла поверхнева культура, що містить споривий шар, використовуються для отримання суспензії спор. Асептично на поверхню кожної агаризованої культури в чашці Петрі наливають невеликий об'єм стерильного фізіологічного розчину, що містить 0,05% поліоксіетиленсорбітану (Tween-80) для покращення змочування та диспергування спор. Стерильною бактеріологічною петлею обережно змивають спори з поверхні міцелію. Отриману суспензію спор

збирають у стерильну колбу або пробірку. За допомогою лічильної камери (гемоцитометра) визначають концентрацію спор у суспензії. Отримана суспензія спорового матеріалу слугує «маточною» культурою для засіву рідких середовищ.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на орбітальних шейкерах

Поживне середовище, підготовлене у стадії ДР 3.1 (композиції А, Б, В), після стерилізації змішують. У стерильних умовах об'єднують вміст усіх трьох композицій, переливаючи їх у одну велику колбу (ємністю 1 л) і ретельно перемішують. Потім отримане стерильне середовище порційно розливають у 4 стерильні колби місткістю 750 мл (приблизно по 150 мл в кожну, що відповідає коефіцієнту заповнення 0,2). Кожну колбу засівають робочою культурою *A. oryzae*, використовуючи підготовлену суспензію спор (ТП 4.3). Засів проводять у асептичних умовах, рівномірно розподіляючи суспензію між колбами. Культивування проводять на орбітальному шейкері-інкубаторі протягом 72 годин при температурі 30 ± 1 °С і частоті обертання 200 об/хв. Після завершення росту у кожній колбі здійснюють мікробіологічний контроль на стерильність (відсутність сторонньої мікрофлори). Отриманий за 3 доби інокулят (суспензія міцелію у кожній колбі) об'єднують і використовують для засіву наступної стадії – лабораторного інокулятора об'ємом 10 л.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

В стерильний інокулятор об'ємом 10 л (І-3) асептично вводять підготовлене стерильне середовище: спочатку 4,4 л концентрованої органічної композиції А (від ДР 3.2.1) перекачують перистальтичним насосом (ПН-2) до 1 л стерильної композиції Б (від ДР 3.2.2), що знаходиться в апараті. Після заливки поживного середовища, безпосередньо перед внесенням посівного матеріалу, середовище нейтралізують до оптимального рівня $\text{pH} \approx 6,0$ шляхом додавання стерильного 6%-го розчину NaOH (із стадії ДР 2.2). Потім через засівний пристрій у апарат вносять 0,6 л суспензії інокуляту, отриманого на попередній стадії (від ТП 4.4). Після засіву в інокуляторі вмикають ерліфтну систему аерації та перемішування, яка забезпечує делікатну циркуляцію середовища без механічних мішалок. Температуру культивування підтримують на рівні 30 ± 1 °С автоматичною подачею пари або охолоджувальної води в сорочку апарата. Для запобігання надмірному піноутворенню в середовище

дозовано додають стерильний піногасник у оптимальному обсязі (ДР 2.3). Процес культивування у 10-літровому інокуляторі триває 72 години. Протягом усього періоду через кожні 4–6 годин відбирають проби для мікробіологічного контролю стерильності та чистоти культури. Культивування завершують після досягнення необхідної біомаси грибів (близько 10,6 г/л сухої маси клітин), що відповідає запланованим показникам розрахунку, і отриманий інокулят використовують для засіву наступного 100-літрового апарата.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

В стерильний посівний апарат об'ємом 100 л (І-6) асептично перекачують 44 л концентрованої композиції А (від ДР 3.3.1) перистальтичним насосом (ПН-5) до 10 л стерильної композиції Б (від ДР 3.3.2), що знаходиться в апараті. Після змішування компонентів середовища здійснюють підняття рН до 6,0 шляхом додавання стерильного 6%-го NaOH (ДР 2.2) – нейтралізація проводиться перед внесенням живої культури. Далі через засівний клапан додають 6 л інокуляту, вирощеного на попередній стадії (від ТП 4.5). У 100-літровому інокуляторі так само використовують ерліфт-систему для аерації і перемішування середовища, підтримують температуру 30 ± 1 °С (подачею пари/холодної води в сорочку) та періодично додають піногасник (ДР 2.3). Культивування триває ~72 години за аналогічних умов. Контроль асептичності процесу здійснюють регулярним відбором проб (кожні 4–6 год). Процес завершують, коли концентрація біомаси досягає ~10,6 г/л, після чого отриманий об'єм інокуляту (~60 л) направляють на засів наступного, виробничого ферментера 1 м³.

ТП 5. Біосинтез α -амілази

ТП 5.1. Виробниче культивування в ферментері об'ємом 1 м³

У виробничий ферментер об'ємом 1 м³ (ФР-11), після приготування та стерилізації Композиції А (РС-9) об'ємом 440 л перекачують до ферментера мембранним насосом (Н-10), який містить підготовлену стерильну Композицію Б об'ємом 100 л, перед внесенням посівного матеріалу доводять рН до значення 6,0 стерильним розчином NaOH (ДР 2.2.1) – це забезпечує оптимальні умови на початку

ферментації. Далі через трубу перетискування вносять 60 л посівного матеріалу (від ТП 4.6), отриманого у інокуляторі об'ємом 100 л.

Вмикають систему перемішування та аерації: стерильне повітря (підготовлене в ДР 1) безперервно подається через барботер у нижню зону ферментера, забезпечуючи інтенсивне насичення культуральної рідини киснем та необхідний масообмін. Температуру у ферментері підтримують на рівні 30 ± 1 °С за допомогою автоматизованої системи регулювання подачі пари і холодної води в сорочку апарата. Для попередження надмірного піноутворення в процесі ферментації дозовано додають стерильний піногасник (ДР 2.3).

Культивування у виробничому ферментері триває 72 години. Протягом цього періоду через кожні 4–6 годин проводять відбір проб для контролю чистоти культури та динаміки процесу. Ферментацію ведуть до досягнення максимальних технологічних показників: ферментативна активність α -амілази в культуральній рідині сягає ~ 7984 ОД/мл, а концентрація біомаси – близько 10,6 г/л (сухої маси). По досягненню пікової активності ферменту процес біосинтезу зупиняють. Культуральну рідину охолоджують і скеровують на подальші стадії вилучення та очищення цільового продукту. Таким чином завершується основний технологічний процес отримання α -амілази.

РОЗДІЛ 7. ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ α -АМІЛАЗИ

Після завершення процесу культивування штаму *Aspergillus oryzae*, цільовий фермент α -амілаза знаходиться у культуральній рідині, з якої її необхідно виділити та очистити від біомаси продуцента та інших компонентів поживного середовища [11].

Взагалі технологія виділення та очищення α -амілази складається із таких стадій:

- 1. Стабілізація культуральної рідини.** Після завершення ферментації культуральну рідину оперативно охолоджують для зниження активності протеолітичних ферментів та запобігання термічній денатурації α -амілази. За необхідності, рН розчину коригують до оптимального для стабільності ферменту значення, щоб мінімізувати втрати активності на подальших етапах [12].
- 2. Відокремлення біомаси.** На цьому етапі з культуральної рідини видаляють міцелій гриба. Оскільки міцеліальна біомаса *A. oryzae* утворює в'язку суспензію, найбільш підходящим методом є фільтрація [11]. Для цього можуть використовуватись рамні фільтр-преси або ротаційні вакуум-фільтри, що дозволяє ефективно відокремити тверду фазу (біомасу) від рідкої (фільтрату, що містить фермент) [12].
- 3. Тонке освітлення.** Після відокремлення основної маси біомаси у фільтраті залишаються дрібнодисперсні та колоїдні частинки, які можуть ускладнити подальші етапи очищення, зокрема забиваючи пори ультрафільтраційних мембран. Для їх видалення застосовують мікрофільтрацію або глибинну фільтрацію, що дозволяє отримати прозорий розчин перед концентруванням [12].
- 4. Концентрування та часткове очищення.** На цьому етапі освітлений фільтрат концентрують для зменшення об'єму та одночасного видалення низькомолекулярних домішок (залишків поживного середовища, солей, метаболітів). Найбільш поширеним промисловим методом для цього є **ультрафільтрація**. Процес полягає у пропусканні розчину через напівпроникну мембрану, яка затримує макромолекули ферменту (молекулярна маса α -амілази

НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ

Змн. Лист. № докум. Підпис Дата

Розроб. Кучерук Ю.А.

Літ. Арк. Архів

Консульт.

73 101

Керівник Резніченко Ю.М.

РОЗДІЛ 7. ОСНОВНІ ЕТАПИ
ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ

Кафедра БТМ

Н. Контр.

Зав. кафедрою Стабніков В.П.

А М І Л А З И

становить близько 55 кДа [14]), але пропускає воду та низькомолекулярні сполуки. Таким чином, в одній операції поєднується концентрування та часткове очищення [11]. За потреби, для більш глибокого очищення від солей, процес може бути доповнений **діафільтрацією** – додаванням буферного розчину до концентрату з подальшим фільтруванням, що дозволяє «вимити» залишкові домішки [12].

5. Тонке («поліруюче») очищення. Необхідність цього етапу залежить від вимог до кінцевого продукту. Для багатьох харчових та технічних застосувань чистоти, досягнутої після ультрафільтрації, достатньо [11]. Однак для отримання високочистого ферменту (наприклад, для аналітичних або фармацевтичних цілей) застосовують хроматографічні методи. Типова послідовність може включати:

- **Осадження сульфатом амонію.** Дозволяє селективно осадити білки, включаючи α -амілазу, та додатково сконцентрувати продукт [14].
- **Іонообмінна хроматографія.** Використовується для розділення білків за їх сумарним зарядом. Для α -амілази часто застосовують аніонообмінники, наприклад, DEAE-целюлозу [14].
- **Гель-фільтрація (молекулярно-ситова хроматографія).** Завершальний етап, що дозволяє розділити білки за їх молекулярною масою та отримати високоочищений препарат ферменту [14].

6. Стабілізація та отримання товарної форми. Очищений концентрат ферменту переводять у стабільну товарну форму. Для рідких препаратів додають стабілізатори (наприклад, гліцерин, сорбіт) та консерванти. Альтернативним підходом є отримання твердого препарату шляхом ліофілізації або розпилювальної сушки. Сучасним методом отримання стабільного та багаторазового у використанні препарату є іммобілізація ферменту, наприклад, шляхом включення у структуру гідрогелевих частинок, що значно підвищує його стабільність при зберіганні та у повторних циклах використання [15].

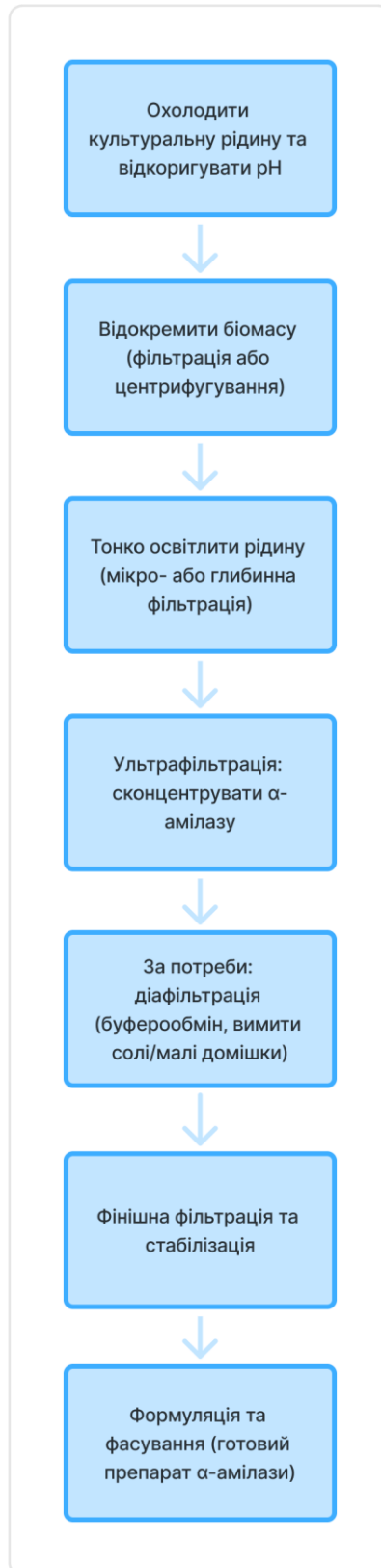


Рис 7.1. Схематичне зображення процесу виділення і очищення α-амілази

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж культивування періодично (кожні 4 год) відбирають проби культуральної рідини як на етапах вирощування посівного матеріалу, так і під час виробничого біосинтезу ферменту. Відібрані проби аналізують для проведення мікробіологічного контролю, а також технологічного контролю ключових показників росту і біосинтезу: концентрації біомаси продуцента, активності ферменту α -амілази, рівня джерела вуглецевого та азотного живлення у середовищі. Це дозволяє своєчасно оцінювати динаміку процесу та за необхідності вносити корективи.

8.1. Мікробіологічний контроль

Зважаючи на те, що культивування *Aspergillus oryzae* проводиться в асептичних умовах, необхідно здійснювати мікробіологічний контроль на всіх етапах, щоб підтвердити відсутність контамінації. Мікробіологічний контроль здійснюють для:

1) перевірки стерильності:

- поживних середовищ (композицій А,Б та В) для вирощування інокуляту і для біосинтезу цільового продукту (α -амілази);
- інших компонентів середовища та допоміжних розчинів, що стерилізуються перед використанням (6-% NaOH та 15% NaOH);

2) виявлення сторонньої мікробіоти:

- у посівному матеріалі (культури-інокуляті) *A. oryzae*;
- у культуральній рідині під час виробничого біосинтезу ферменту.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома способами: висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

8.1.1. Висів на агаризовані поживні середовища

Висівом на агаризовані поживні середовища можна перевіряти як стерильність середовищ, так і відсутність сторонньої мікробіоти при культивуванні. Нижче наведено методики для обох випадків.

Перевірка стерильності середовищ.

					НУХТ БТЕК 05.01.24 КР ПЗ		
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Кучерук Ю.А.				Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.						76	101
Керівник	Резніченко Ю.М.				РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		Кафедра БТМ 76
Н. Контр.							
Зав. кафедри	Стабніков В.П.						

Відразу після стерилізації поживного середовища проводять мікробіологічний контроль його стерильності. У стерильних асептичних умовах відбирають пробу простерилізованого середовища (наприклад, 0,5 мл) стерильною піпеткою або бактеріологічною петлею. Пробу висівають на чашки Петрі з відповідними агаризованими середовищами. Для виявлення можливого бактеріального контамінанта використовують м'ясо-пептонний агар (МПА), а для виявлення пліснявих грибів та дріжджів – сусло-агар (СА). Висів проводять рівномірно, розподіляючи пробу по поверхні агару стерильним шпателем або штрихом петлі. Засіяні чашки інкубують у термостаті: МПА – при 37 ± 1 °C протягом 48 год, СА – при $28\text{--}30$ °C протягом 72–120 год. Поживне середовище вважається стерильним і придатним до використання, якщо після інкубації на поверхні агару відсутній ріст будь-яких мікроорганізмів [52, 53].

Перевірка мікробіологічної чистоти біологічного агента.

З відібраної проби культуральної рідини *Aspergillus oryzae* проводять висів на щільні поживні середовища для перевірки чистоти культури. У стерильних умовах бактеріологічною петлею здійснюють посів досліджуваної культури на чашки Петрі з МПА та СА методом виснаженого штриха для отримання ізольованих колоній [54]. Чашки інкубують у термостаті при температурі, оптимальній для росту *A. oryzae* (30 ± 2 °C), протягом 3 діб. Після інкубації оцінюють наявність сторонньої мікрофлори: на чашках повинні бути присутні лише колонії *Aspergillus oryzae* (штаму-продуцента) (рис.8.1).

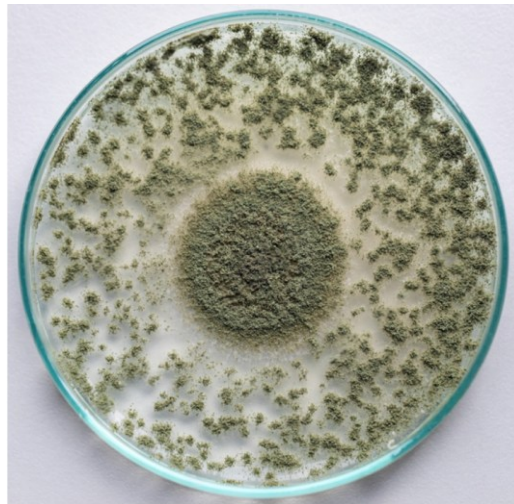


Рис.8.1. Вирощена культура *Aspergillus oryzae* на поживному середовищі СА [16].

Чиста культура *A. oryzae* утворює однорідні колонії з характерною пухнастою, оксамитовою текстурою та забарвленням, яке змінюється від білого до жовтувато-зеленого або оливково-коричневого в міру дозрівання спор. Візуально колонії ростуть швидко: на скошеному агарі молоді колонії мають білувато-жовтий колір, що поступово переходить у світло-оливковий чи жовто-зелений; за 7 діб при 25 °С колонія досягає діаметра ~7–8 см, край рівномірний і гладкий. Однорідність забарвлення та текстури колоній свідчить про чистоту культури. Наявність же на чашці колоній іншого кольору, форми чи консистенції (наприклад, слизових бактерійних колоній або нальоту дріжджів) вказує на контамінацію культури або домішок іншого штаму [54].

8.1.2. Мікроскопіювання

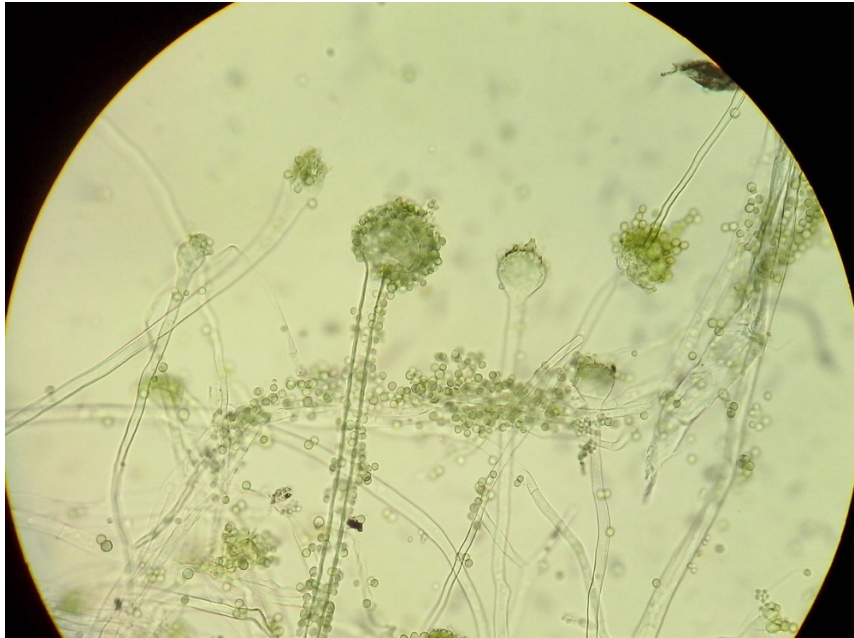


Рис.8.2. Конідієносці з конідіями мікроміцета *Aspergillus oryzae* під світловим мікроскопом [55].

Методом мікроскопіювання додатково перевіряють відсутність сторонньої мікробіоти при культивуванні. У асептичних умовах готують мікроскопічні препарати типу «роздавлена крапля» з різних ділянок колонії *A. oryzae*. Для цього стерильною петлею беруть невелику кількість міцелію з поверхні колонії, розміщують у краплині стерильної води або фізіологічного розчину на предметному склі і злегка притискають покривним скельцем. Препарат досліджують під світловим мікроскопом (за потреби – з імерсійною системою). У препараті чистої культури повинні бути присутні лише елементи, характерні для *Aspergillus oryzae*: септований, розгалужений міцелій; довгі шорсткі конідієносці, що завершуються великою сферичною везикулою; стеригми (одно- або двоярусні), на яких формуються ланцюжки круглих чи овальних конідій. Виявлення під мікроскопом клітин бактерій, дріжджів або будь-яких структур, що не відповідають морфології *A. oryzae*, вказує на наявність контамінації [54].

За відсутності сторонньої мікробіоти мікроскопічна картина однорідна: видно лише характерні для гриба септовані гіфи діаметром $\sim 2\text{--}7$ мкм, що утворюють типові тонкі розгалуження. У високо-продуктивних штамів можуть спостерігатися

потовщені гіфи (>10 мкм) в складі міцелію. Конідієносці несуть кулясті або субкулясті везикули, від яких відходять ряди фіалід (стеригм) – найчастіше двоярусні (бісеріатні), що допомагає відрізнити *A. oryzae* від близького виду *A. flavus* [56]. На стеригмах формуються ланцюжки конідій; зрілі конідії кулясті чи злегка овальні, 4,5–8 мкм у діаметрі, зі стінкою від гладенької до злегка шорсткої, жовтувато-зеленуватого кольору, який надає колоніям характерного оливкового відтінку [57].

8.2. Технологічний контроль

Технологічний контроль у процесі виробництва α -амілази охоплює аналіз концентрації біомаси продуцента, визначення активності цільового ферменту, а також моніторинг вмісту головних джерел живлення в культуральному середовищі – вуглецевого та азотного. Оперативний контроль цих показників є невід’ємною частиною управління процесом культивування, оскільки дозволяє оцінювати швидкість споживання поживних субстратів, прогнозувати динаміку росту та синтезу продукту, а також вчасно виявляти уповільнення або зупинку розвитку культури.

8.2.1. Визначення концентрації біомаси

Визначення концентрації біомаси *Aspergillus oryzae* є ключовим показником, що відображає ефективність росту культури-продуцента. Оскільки *A. oryzae* – міцеліальний гриб, для кількісної оцінки його біомаси застосовують гравіметричний (ваговий) метод, який полягає у вимірюванні сухої ваги міцелію. Цей метод дозволяє точно визначити накопичення біомаси в процесі культивування.

Процедура визначення сухої біомаси (ваговим методом):

- 1. Відбір та фільтрація проби.** З ферментера в асептичних умовах відбирають точно визначений об’єм культуральної рідини (20–50 мл). Пробу фільтрують через попередньо висушений до постійної ваги та зважений на технічних вагах мембранний або паперовий фільтр (розмір пор $\sim 0,45$ мкм). Для прискорення фільтрації бажано застосовувати вакуум-фільтр.
- 2. Промивання біомаси.** Міцелій на фільтрі промивають декількома порціями дистильованої води (зазвичай 2–3 рази, об’єм кожної порції приблизно дорівнює об’єму відібраної проби). Промивання необхідне для видалення залишків

розчинних компонентів середовища (солей, цукрів, пептонів тощо), які можуть спотворити результати зважування.

- 3. Висушування.** Фільтр з отриманою біомасою переносять у сушильну шафу і висушують при температурі 100–105 °С до досягнення постійної ваги. Вага вважається постійною, якщо різниця між двома послідовними зважуваннями (з інтервалом 1–2 години) не перевищує 0,0005 г.
- 4. Зважування та розрахунок.** Після висушування фільтр з біомасою охолоджують у ексікаторі до кімнатної температури (щоб уникнути поглинання вологи з повітря) і зважують на технічних вагах.

Концентрацію сухої біомаси X (г/л) розраховують за формулою:

$$X = (m_2 - m_1) / V,$$

де m_2 – маса фільтра з сухою біомасою, г; m_1 – маса чистого сухого фільтра, г; V – об'єм відібраної проби культуральної рідини, л.

Отримане значення X характеризує концентрацію біомаси гриба в культуральній рідині (г/л). Даний метод є точним і надійним для кількісної оцінки росту і накопичення біомаси продуцента в процесі культивування [18].

8.2.2. Визначення активності ферменту α -амілази

Ключовим показником ефективності процесу є ферментативна активність цільового продукту – α -амілази. Для її визначення в пробах культуральної рідини застосовують метод, заснований на вимірюванні швидкості ферментативного гідролізу крохмалю. Продукти гідролізу крохмалю (відновлюючі цукри) кількісно визначають методом з 3,5-динітросаліциловою кислотою (ДНС-метод) – аналогічно до описаного вище контролю вуглецевого живлення. У результаті гідролізу внутрішніх α -1,4-глікозидних зв'язків у молекулі крохмалю накопичуються олігосахариди (мальтоза, мальтотріоза тощо), які мають відновлюючі властивості. Швидкість утворення цих продуктів прямо пропорційна активності α -амілази у пробі.

Процедура визначення активності α -амілази:

- 1. Підготовка зразка ферменту.** Пробу культуральної рідини очищають від біомаси шляхом центрифугування (наприклад, 10 000 g, 10 хв) або фільтрації. Отриманий прозорий супернатант, що містить позаклітинну α -амілазу, використовують для

аналізу. За необхідності супернатант розводять у відповідному буферному розчині.

2. **Підготовка субстрату.** У пробірку вносять 1,0 мл субстратного розчину – 1%-й розчин розчинного крохмалю в 0,02 М фосфатному буфері (рН 6,9), який містить 0,0067 М NaCl (хлорид натрію виступає як активатор реакції). Пробірку зі субстратом прогривають на водяній бані при 30–40 °С протягом 5 хвилин (для термостатування до температури реакції).
3. **Запуск ферментативної реакції.** До прогрітого субстратного розчину додають 1,0 мл підготовленого зразка ферменту. Суміш швидко перемішують та інкубують при тій самій температурі (30–40 °С) протягом точно визначеного часу (наприклад, 5 хвилин). За цей час α -амілаза гідролізує частину крохмалю до мальтози й інших відновлюючих цукрів.
4. **Зупинка реакції.** Після закінчення інкубації ферментативну реакцію негайно зупиняють, додаючи 2,0 мл ДНС-реактиву [18]. ДНС-реактив (розчин 3,5-динітросаліцилової кислоти в лужному середовищі) при нагріванні відновлюється утвореними в реакції цукрами, змінюючи колір розчину на червоно-коричневий.
5. **Визначення продуктів гідролізу.** Пробірку з реакційною сумішшю після додавання ДНС-реагенту нагривають на киплячій водяній бані протягом 5 хвилин для розвитку забарвлення, потім охолоджують до кімнатної температури. До охолодженої суміші додають фіксований об'єм дистильованої води (наприклад, 10 мл) і вимірюють оптичну густину отриманого розчину при 540 нм на спектрофотометрі. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації утворених відновлюючих цукрів. Паралельно ставлять контрольний (холостий) дослід, у якому ферментний зразок додають у субстрат після внесення ДНС-реактиву (тобто реакція зупинена з самого початку). Це дозволяє врахувати фоновий вміст відновлюючих цукрів у вихідному зразку ферменту.
6. **Розрахунок активності.** Кількість мальтози, що утворилася за час реакції (в мікромолях або мг), визначають за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами мальтози. Величину активності α -амілази розраховують у одиницях активності (ОД). За 1 ОД активності α -амілази приймають кількість

ферменту, яка каталізує утворення 1 μмоль відновлюючих цукрів (у перерахунку на мальтозу) за 1 хвилину при стандартних умовах (рН 6,9; 30 °С).

Активність ферменту (A , ОД/мл) обчислюють за формулою:

$$A = (C \times V_{рек} \times k) / (t \times V_{ферм}),$$

де C – концентрація мальтози, утвореної за час реакції (μмоль/мл); $V_{рек}$ – загальний об'єм реакційної суміші, мл; k – коефіцієнт розведення зразка ферменту; t – тривалість інкубації, хв; $V_{ферм}$ – об'єм ферментного препарату, доданого в реакційну суміш, мл.

Підставляючи експериментально отримані значення C , $V_{рек}$, t , $V_{ферм}$ (з урахуванням розведення k), обчислюють активність α-амілази у досліджуваному зразку. Зазвичай результати виражають в ОД/мл або ОД/л культуральної рідини. Наведений метод є стандартним для визначення амілолітичної активності і широко застосовується у біотехнологічній практиці [13, 27].

8.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення

Основними джерелами вуглецю в середовищі для культивування *A. Oryzae* є вуглеводи – розчинний крохмаль і глюкоза. У процесі росту та синтезу ферменту культура споживає ці субстрати, тому необхідно контролювати їх залишкову концентрацію (в перерахунку на загальний вміст редукувальних цукрів). Для цього використовують хімічний ДНС-метод з 3,5-динітросаліциловою кислотою (реактивом Миллера), вперше детально описаний Бернфельдом і широко застосовуваний у ферментаційних технологіях.

Принцип методу: При нагріванні в лужному середовищі альдегідні групи відновлюючих цукрів окиснюються, відновлюючи 3,5-динітросаліцилову кислоту (жовтого кольору) до 3-аміно-5-нітросаліцилової кислоти, яка має інтенсивне червоно-коричневе забарвлення. Інтенсивність забарвлення після реакції пропорційна концентрації редукувальних цукрів у пробі, її вимірюють спектрофотометрично при 540 нм.

Процедура визначення редукувальних цукрів (ДНС-метод):

1. Готують серію стандартних розчинів глюкози або мальтози з відомою концентрацією (наприклад, 0,2–2,0 мг/мл). Це необхідно для побудови калібрувальної залежності.
2. Кожен стандартний розчин та дослідний зразок (фільтрат культуральної рідини, за потреби розведений) в об'ємі 1 мл змішують з 1–2 мл ДНС-реактиву в пробірці. ДНС-реактив містить 3,5-динітросаліцилову кислоту, NaOH та тартрат натрію-калію, що стабілізує колір і запобігає окисненню реагенту киснем повітря.
3. Пробірки нагрівають на киплячій водяній бані 5–15 хв, щоб відбулася реакція і розвинулося забарвлення розчину.
4. Швидко охолоджують пробірки у холодній воді до кімнатної температури.
5. Доливають у кожну пробірку фіксований об'єм дистильованої води (наприклад, 10 мл) для розведення та стабілізації забарвленого розчину в діапазоні, зручному для фотометричних вимірювань.
6. Вимірюють оптичну густину отриманих розчинів на спектрофотометрі проти холостої проби (бланку), що містить всі реактиви, окрім цукру.
7. За результатами вимірювань будують калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації цукру для стандартних зразків. За цим графіком визначають концентрацію редукувальних цукрів у дослідному зразку культуральної рідини.

Результати дозволяють контролювати, наскільки повно використані вуглецеві субстрати середовища. Зниження концентрації редукувальних цукрів у середовищі з часом свідчить про споживання крохмалю і глюкози культурою; на основі цих даних можна коригувати тривалість процесу або додавати субстрат у разі потреби [13, 27].

8.2.4. Визначення концентрації джерела азотного живлення

До джерел азоту у середовищі для *A. oryzae* входять органічні сполуки – пептон та дріжджовий екстракт (в основному вони містять амінокислоти, пептиди та інші легкоасимільовані форми азоту). Для оперативного контролю азотного живлення визначають концентрацію амінного (амонійного) азоту в культуральній рідині – саме ця форма азоту є доступною для асиміляції мікроорганізмом. Одним з поширених

методів кількісного аналізу амінного азоту є **формольне титрування** (метод Соренсена).

Принцип методу: У нейтральному середовищі формальдегід реагує з аміногрупами амінокислот з утворенням метиленових похідних і виділенням еквівалентної кількості кислот. Внаслідок цього буферні властивості амінокислот зникають, і всі вільні аміногрупи можна титрометрично врахувати за об'ємом лугу, витраченого на нейтралізацію виділеної кислоти. Кінцева точка фіксується за зміною рН розчину.

Процедура визначення амінного азоту (формольне титрування):

1. Готують зразок культуральної рідини: відфільтрований або центрифугований супернатант, очищений від клітин міцелію. Відбирають точний об'єм фільтрату (наприклад, 20 мл) і переносять у посудину для титрування. Додають ~60 мл дистильованої води для збільшення загального об'єму розчину.
2. При безперервному перемішуванні розчин титрують 0,05–0,1 М розчином NaOH до досягнення рН 8,2 (контролюють рН-метром). Цей етап нейтралізує всі вільні кислоти в пробі.
3. До нейтралізованого розчину додають 10 мл 36–38%-го розчину формальдегіду (попередньо теж нейтралізованого до рН 8,2) і продовжують титрування тим самим розчином NaOH до досягнення кінцевої точки титрування – рН 9,2. Формальдегід зв'язує аміногрупи амінокислот, вивільняючи еквівалентну кількість кислоти, яку і нейтралізують лугом.
4. Реєструють об'єм лугу, витрачений на титрування від рН 8,2 до рН 9,2. Цей об'єм пропорційний вмісту амінного азоту в пробі. Паралельно проводять контрольний (холостий) дослід: замість проби культуральної рідини титрують 20 мл дистильованої води, додаючи ті ж реагенти (NaOH, формальдегід) – для врахування власної кислотності формальдегіду.
5. Розраховують концентрацію амінного азоту (C_{NH_2} , г/л або ммоль/л) за формулою, враховуючи об'єм лугу, витрачений на титрування, нормальність (молярність) лугу та об'єм взятої проби. За потреби використовують поправки на холосте

титрування. Приклад розрахунку наведено у відповідному додатку (розрахункові формули Соренсена).

Контроль вмісту амінного азоту дозволяє оцінити інтенсивність споживання азотного джерела культурою. Зменшення концентрації амінного азоту в процесі ферментації вказує на активний ріст мікроорганізму та синтез білкових сполук. Якщо аміний азот вичерпано, це може стати лімітуючим фактором і вимагати зупинки процесу або додавання азотвмісних компонентів у середовище [58].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. de Souza, P. M., & de Oliveira e Magalhães, P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004> з розділ 3.1
2. An, Y., Tran, P. L., Yoo, M.-J., Song, H.-N., Park, K.-H., Kim, T.-J., Park, J.-T., & Woo, E.-J. (2023). The Distinctive Permuted Domain Structure of Periplasmic α -Amylase (MalS) from Glycoside Hydrolase Family 13 Subfamily 19. *Molecules*, 28(10), 3972. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.3390/molecules28103972>
3. Worthington Biochemical Corporation. *Amylase, Alpha – References*. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.worthington-biochem.com/products/amylase-alpha/references>
4. ENZIM Biotech. Alfalad, α -амілаза, Україна. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://enzim.prom.ua/ua/p641751388-alfalad-alfa-amilaza.html>
5. Hot Rod. α -amylase, 100 г, побутова фасовка. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://hot-rod.com.ua/alfa-amilaza-hot-rod-a-amylase-100g?gclid=Cj0KCQjw0qTCBhCmARIsAAj8C4ZeicEgw4HF1GX_fJi1d3pJ2rNofU-EUV8dSzFpSDW67Id8lcxoffIaArrbEALw_wcB
6. Novozymes. Termamyl® SC 4X, пивоваріння. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://beerco.com.au/products/novozymes-termamyl-sc-4x?srsId=AfmBOorskaq5DeOeSCOwoqrPIIfipGXe24B-QHbS_nlpsCGx681ePLUC&utm_source=
7. Novozymes. Fungamyl 800 L, сиропи/випічка. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.univarsolutions.com/fungamyl-800-1-16173848?srsId=AfmBOop8dF3ggrv8XXn-3Ew3FfNxBzXrIngSyVFt6zIEFc6zjjF6ogX2&utm_source=
8. Novozymes. BAN® 480 L, крохмаль/мийні засоби. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.univarsolutions.co.uk/7136?srsId=AfmBOoo-aZQuiL9gk6ziRzEE_J5VNYfecT5ZfxKs3xEdTvdb7XYRO2c_&utm_source=

9. PMP Fermentation Products, Inc. *Amizyme*® [Product brochure]. [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://pmpinc.com/images/TX8_Brochure.pdf
10. Ahmad, M. A., Isah, U., Raubilu, I. A., Muhammad, S. I., & Ibrahim, D. (2020). An overview of the enzyme: Amylase and its industrial potentials. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 12(1), 352–358. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://doi.org/10.4314/bajopas.v12i1.53S>
11. Guajardo, E., & Schrebler, R. (2024). Upstream and Downstream Bioprocessing in Enzymatic Biocatalysis: A Review of Recent Advancements. *Pharmaceutics*, 16(1), 13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010013>
12. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP). (2019). Scientific Opinion on the safety evaluation of the food enzyme α -amylase from *Aspergillus oryzae* (strain DP-Bzb41). *EFSA Journal*, 17(11), e05899. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5899>
13. Melnichuk, N., Braia, M. J., Anselmi, P. A., Meini, M. R., & Romanini, D. (2020). Valorization of two agro-industrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste Management*, 106, 155–161. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025>
14. Pham, V. H. T., Kim, J., Shim, J., Chang, S., & Chung, W. (2022). Purification and Characterization of Strong Simultaneous Enzyme Production of Protease and α -Amylase from an Extremophile-*Bacillus* sp. FW2 and Its Possibility in Food Waste Degradation. *Fermentation*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010012>
15. Tincu, C. E., Bouhadiba, B., Atanase, L. I., Stan, C. S., Popa, M., & Ochiuz, L. (2023). An Accessible Method to Improve the Stability and Reusability of Porcine Pancreatic α -Amylase via Immobilization in Gellan-Based Hydrogel Particles Obtained by Ionic Cross-Linking with Mg^{2+} Ions. *Molecules*, 28(12), 4695. <https://doi.org/10.3390/molecules28124695>
16. VistaCreate. (2025). *Champignon filamenteux* [Stock photograph]. VistaCreate. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://create.vista.com/uk/photos/champignon-filamenteux/>

17. Naili, B., Sahnoun, M., Bejar, S., & Kammoun, R. (2016). Optimization of submerged *Aspergillus oryzae* S2 α -amylase production. *Food Science and Biotechnology*, 25, 185–192. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0028-4>
18. Ghobadi, N., Ogino, C., Ogawa, T., & Ohmura, N. (2016). Using a flexible shaft agitator to enhance the rheology of a complex fungal fermentation culture. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 1793–1801. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1653-2>
19. Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Santhosh Kumar, S. K., et al. (2021). Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC Biotechnology*, 21, 33. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00686-7>
20. Державна служба статистики України (офіційні щомісячні добірки «Виробництво основних видів промислової продукції»: пиво). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://km.ukrstat.gov.ua/ukr/statinf/pr/ovpp/ovpp0519.htm>
21. Державна служба статистики України. КВЕД-2010: клас 11.05 «Виробництво пива» - офіційні пояснення до класифікації. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://kved.ukrstat.gov.ua/KVED2010/11/KVED10_11_05.html
22. Об'єднання підприємств пивної галузі України («Укрпиво»). Виробництво пива в Україні у 2024 р. - \approx 140 млн дал. Офіційні повідомлення, цит. за профільними ЗМІ. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://open4business.com.ua/en/beer-production-in-ukraine-increased-by-4-8-in-2024/>
23. Укрінформ. В Україні торік виробництво пива зросло на 4,8%. Укрінформ. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.ukrinform.ua/rubric-economy/3948472-v-ukraini-torik-virobnictvo-piva-zroslo-na-48.html>
24. ФЕРМЕНТАЦІЯ. Купити Фермент альфа-амілаза Thermo на 100 кг зерна для приготування напоїв, ціна - інтернет-магазин ФЕРМЕНТАЦІЯ. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://fermentaciia.in.ua/ua/p2127159639-ferment-alfa-amilaza.html>

25. AB Enzymes. VERON® (лінійка для випічки; грибні α -амілази, зокрема варіанти типу «M4» у специфікаціях під запит). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.abenzymes.com/en/your-industry/baking-flour-milling-and-pasta/>
26. AEB Group. ENDOZYM® Alphamyl PF NaCl - термостабільна бактеріальна α -амілаза (*B. licheniformis*) для пивоваріння. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.aeb-group.com/media/catalogo-unico/endozym_alphamyl_pf_nacl-2211/docs/en/ENDOZYM_ALPHAMYL_PF_NACL_TDS_EN_1261021_FOOD_Italy.pdf
27. Bernfeld, P. (1955). Amylases, α and β . In S. P. Colowick & N. O. Kaplan (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 1, pp. 149–158). Academic Press. [Електронний ресурс] – Режим доступу: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5)
28. DEEPROCESS (каталог постачальників). Liquid Fungal Alpha Amylase (FA-280) - рідка грибна α -амілаза для переробки зерна. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.deeprocess.com/home/supplier/details/id/53069.html>
29. Enzymes.Bio. Грибковий фермент альфа-амілаза для пекарів. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://enzymes.bio/uk/product/fungal-alpha-amylase-enzyme-for-bakers/>
30. Enzymes.bio. Liquid Fungal Alpha-amylase (CAS 9013-01-8) - активність 20 000 U/ml; грибна α -амілаза (виробництво: *Aspergillus oryzae*). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://enzymes.bio/product/liquid-fungal-alpha-amylase-enzyme-cas-9013-01-8>
31. ENZIM Biotech. Альфа-амілаза. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://enzim.ua/index.php?page=alphaamylase&lng=uk>
32. Gusmer Enterprises, Inc. (2020–2021). Gusmer brewing catalog 2020–21. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://catalogs.gusmerenterprises.com/view/5491115/8/>
33. Gusmer Enterprises, Inc. (2024–2025). Gusmer brewing catalog 2024–25. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://catalogs.gusmerenterprises.com/view/161337014/12-13/>

34. IFF. AMYLEX® 6T - ліквіфікуюча термостабільна α -амілаза для крохмалепереробки/пивоваріння. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.gusmerenterprises.com/catalog/distilling/distilling-enzymes/liquefaction-enzymes-2/>
35. IFF. GRINDAMYL® A 10000 - грибна α -амілаза для хлібопекарських сумішей (лінійка GRINDAMYL®; продукт присутній на ринку). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.zauba.com/USA-import-grindamyl-a-1000-data.html>
36. Lallemand Biofuels & Distilled Spirits. ABV Alphamylase™ FA (AFA-511) - грибна α -амілаза (*Aspergillus oryzae*) для пивоваріння/дистилювання. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.lbds.com/products/abv-alphamylase-afa-511>
37. Novozymes (Novonosis). Fungamyl® 800 L - грибна α -амілаза для хлібопечення; рекомендована доза 6–31 ppm (5–25 FAU/кг борошна). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.ulprospector.com/es/na/Food/Detail/4497/342022/Fungamyl-800-L>
38. Novozymes (Novonosis). Termamyl® SC / SC DS - термостабільна α -амілаза. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://beerco.com.au/products/novozymes-termamyl-sc-4x>
39. Cerrone, Federico & O Connor, Kevin. (2025). Cultivation of filamentous fungi in airlift bioreactors: advantages and disadvantages. Applied Microbiology and Biotechnology. 109. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13422-4>.
40. Alibaba. Airlift Bioreactor for Nucleic Acid Fermentation. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Airlift-Bioreactor-for-Nucleic-Acid-Fermentation_1600407483640.html?utm_source=
41. Zhengzhou Laboao Instrument Equipment Co., Ltd. 10 L jacketed stainless steel chemical reactor (LSR-10L) [Product page]. LABOAO. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.laboao.com/products/stainless-steel-reactor/10l-jacketed-stainless-steel-chemical-reactor>
42. Cole-Parmer (Masterflex). (2015). MASTERFLEX® L/S® Digital Pump Drive (07551-xx) - Operating manual. Fisher Scientific. [Електронний ресурс] – Режим доступу:

<https://www.fishersci.at/shop/products/masterflex-l-s-computer-compatible-digital-pump-w-easy-load-ii-pump-head-600-rpm/15661877>

43. Solaris Biotech. (2025). GENESIS: Benchtop SIP fermenter/bioreactor – Catalogue [PDF]. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://bioprocess-eng.co.uk/wp-content/uploads/2025/01/Solaris-Biotech-catalogue-GENESIS.pdf>
44. Centriplant Rebuilds & Tank Co Ltd. 13423 – 75 litre stainless steel 316L steam jacketed reactor [Product description]. Centriplant. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.centriplant.co.uk/equipment/uncategorized/13423-75-litre-stainless-steel-316l-steam-jacketed-reactor/>
45. Drifton A/S. N6-30L flow rates peristaltic pump [Product page]. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.drifton.eu/shop/11-industrial-peristaltic-pumps/2583-n6-30l-flow-rates-peristaltic-pump/>
46. Eppendorf. BioFlo® 610 mobile SIP fermentation system [Brochure]. [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/144668_Brochure/New-Brunswick_Fermentors-Bioreactors_Brochure_BioFlo-610_Compact-Mobility.pdf
47. Surplus Select B.V. (2025, December 1). Stainless steel pressure tank with agitator - 25 litres (RVS Apparatenfabriek Het Noorden; 316 SS; conical bottom; Tri-Clamp; –1/3.5 bar; 150 °C; Ø24 cm × 93 cm) [Product page]. Surplus Select. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.surpluselect.eu/tanks-silos/stainless-steel-tanks/stainless-steel-pressure-tank-with-agitator-25-litres/3.8a4172>
48. INOXPA S.A.U. (2017). Centrifugal pump Hyginox SE (Technical datasheet FT.HYGINOXSE.3.EN-0517). INOXPA S.A.U. [Электронный ресурс] - Режим доступа: https://www.inoxpa.com/uploads/document/Fitxa%20tecnica/Components/Bombes/HYGINOX%20SE/FT.HYGINOXSE.3_EN.pdf
49. Applikon bioreactor 750 l – stainless steel reactor (SKU 360U951). A. Foeth B.V. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.foeth.com/en/reactors/stainless-steel-reactors/applikon-bioreactor-750ltr-stainless-steel-reactor-360u951/>

50. Tapflo. T225 – 2" sanitary diaphragm pump: Technical data and materials. Tapflo AB. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tapflo.lv/ru/products/diaphragm/sanitary-series-pumps/t225-2>
51. Dakota Systems 1000 L bioreactor, model BRX1000: Operator's manual [PDF]. HGP Auction (2010). [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.hgpauction.com/wp-content/uploads/2018/10/Lot-500-1000L-BR-Operators-Manual_4Jun2010-801.pdf
52. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
53. Лабораторний практикум з курсу «Технічна мікробіологія» для бакалаврів галузі знань 18 «Виробництво та технології» спеціальності 181 «Харчові технології» денної та заочної форм навчання (Доповнений та перероблений) / Укл. Л.В. Капрельянц, Л.М. Пилипенко, А.В. Єгорова, О.М. Кананихіна, Т.О. Велічко, О.О. Киличенчук, Т.В. Шпирко, Л.В. Труфкаті. – Одеса: ОНТУ, 2020. – 80 с.
54. Zhang, L., Kang, L., & Xu, Y. (2023). Phenotypic, genomic, and transcriptomic comparison of industrial *Aspergillus oryzae* used in Chinese and Japanese soy sauce: Analysis of key proteolytic enzymes produced by koji molds. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e00836-22. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00836-22>
55. Yulianna.x. (2016, April 26). *Aspergillus oryzae.jpg* [Photograph]. Wikimedia Commons. [Електронний ресурс] - Режим доступу: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_oryzae.jpg
56. Daba, G.M., Mostafa, F.A. & Elkhateeb, W.A. The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. *Bioresour. Bioprocess.* 8, 52 (2021). [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00408-z>
57. Itani, A., Motomura, H., Oda, K., Yamashita, H., Sakai, K., Kusumoto, K.-i., Shigeto, S., Ichikawa, T., Mubarak, H. M., Fukuma, T., Katayama, T., Maruyama, J.-i., Masuo,

S., Takaya, N., Takeshita, N., ... Takeshita, N. (2025). The increase in cell volume and nuclear number of the koji-fungus *Aspergillus oryzae* contributes to its high enzyme productivity. *eLife*, 14, RP107043. [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://doi.org/10.7554/eLife.107043.1>

58. National Health and Family Planning Commission of the PRC. (2016). GB 5009.235-2016: National Food Safety Standard - Determination of Amino Acid Nitrogen in Foods.

Using a flexible shaft agitator to enhance the rheology of a complex fungal fermentation culture

Narges Ghobadi¹ · Chiaki Ogino¹ · Tomohiro Ogawa² · Naoto Ohmura¹

Received: 2 May 2016 / Accepted: 12 July 2016 / Published online: 20 July 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The rheology behavior of biological fluids particularly when the viscosity is high and rheology is complex, is an important issue to understand, particularly for studies in mass-transfer and for solving technical problems with mixing in stirred bioreactors. In this paper, the use of a Swingstir[®] impeller during the fermentation of *Aspergillus oryzae* resulted in decreases from the parameters of a power-law model, in viscosity and in the thixotropic behavior of a cultivation broth. The results showed that both the K_{1a} and the alpha amylase activity were improved when using the Swingstir[®] in comparison with Fullzone[®] impeller (FZ) at the same level of energy consumption. Increasing the pellet porosity during mixing via the Swingstir[®] resulted in increases in oxygen mass transfer and the average shear stress.

Keywords Fermentation · Rheology · Swingstir[®] · Fullzone · *Aspergillus oryzae*

Introduction

1794

Bioprocess Biosyst Eng (2016) 39:1793–1801

exposure to shear stress on the fungal cells (by focusing on the most complex fermentation interval) were compared with a fermentation culture agitated by a FZ, (Kobe Elco Co., Ltd. Kobe, Japan), which is representative of large and close-clearance impellers with strong fluid recirculation loop that was already used in the fermentation process [8].

Materials and methods

Strain and inoculum preparation

Wild type *A. oryzae* (OS1013) was used. The fungi were maintained in petri dishes of agar. After inoculation, the dishes were incubated at 30 °C for 5–6 days and subsequently stored at 4 °C. A spore suspension was obtained by washing the petri dish in a solution of 0.05 wt% Tween-80 [Polyoxyethylene (20) Sorbitan monooleate, Wako Co., Kyoto, Japan]. The spores were dislodged using a sterile inoculation loop and the number of spores was determined using a hemocytometer (Bürker Türk) (NanoEnTek Inc., Gyeonggi, Korea). The inoculum of *A. oryzae* was prepared in 100 mL Erlenmeyer flasks containing 15.0 mL of nutrient broth with 1.50×10^7 spores mL⁻¹. The medium was aseptically inoculated with suspended spores. After inoculation, the flasks were incubated for 3 days on an incubator shaker at 30 °C and 200 rpm.

Fermentation experiments and fermenter configuration

The fermentation experiments were performed in a laboratory-scale, 2.0 L, stirred-tank batch bioreactor, (DPC-3A Jar, ABLE BIOTT Co., Tokyo, Japan) with a working volume of 1.5 L. Fermentations were conducted in a cylindrical bioreactor with a vessel internal diameter, H , of 0.114 m, and with a flat bottom and broth height to vessel diameter ratio of 1.3. Agitation was provided by two different impellers (Fig. 1): (a) the FZ, and (b) a Swingstir[®]. The FZ consisted of two large paddle impellers with the upper paddle shifted at 45° in the rotating direction. The

the impeller or shaft particularly when the behavior of the liquid changes from a Newtonian to a non-Newtonian state. The use of typical radial impellers results in a high-viscosity region near the agitators [1]. Also when using large blades, the fluid distribution is homogenous, and stagnant zones disappear but this results in wasted biomass (due to the high cross-section area of the blade, Fig. 5 in Appendix 1), as the cells are attached to the flat blades which increase the risk of contamination [2]. In this study, an agitator equipped with a frictionless and flexible seal was used as the main mixer element in the fermentation of *Aspergillus oryzae* to investigate the effect of a flexible agitator on the rheology of a fermentation culture and to determine if this could enhance the productivity. Many investigators have used rheological techniques for fungal morphology control and characterizations. Those studies focused on apparent viscosity, consistency index (K), and flow index (n), on the micro-, macro- and process-scale levels [3–5]. The Swingstir[®] (Kobe Elco Co., Ltd. Kobe, Japan) [6], was designed with a flexible shaft for an improvement in accessories to inhibit contamination, by avoiding exposure of microorganisms to high shear stress, and by decreasing

Swingstir[®] was composed of three blades. The length of each blade was 0.45 m, and the lower and upper widths of the blades were 0.005 and 0.015 m, respectively. The length of the flexible shaft together with the impeller, was 0.161 m (Fig. 1). The other details of the two impellers along with the shaft of the fermenter are shown in Fig. 1. In this study, the bioreactor was equipped with monitors, which were used to measure and control the foam, temperature, pH, stirring rate, torque, and dissolved oxygen (DO). The fermentation medium (1.5 L) was made up of the following (in g/100 mL): glucose 3; KCl 0.2; KH₂PO₄ 0.1; MgSO₄·7H₂O 0.05; peptone 1.0; yeast extract 0.5 (all from Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan); and soluble starch, 10 (Nacalai Tesque, Co., Kyoto, Japan). An external jacket was used to maintain the broth temperature at 30 °C. The fermenter was run for 72 h. The fermented broth was sampled, then filtered using a 150 mL–20 µm bottle-top filter (non-pyrogenic and sterile filter, Corning Inc., California, USA), and the supernatant was assayed for alpha amylase activity.

Alpha amylase activity assay, glucose concentration and dry cell weight measurement

Alpha amylase activity was measured for a 1.0 mL fermentation mixture containing 0.5 mL of 2.0 % (w/v) soluble starch in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) and the enzyme solution. The reaction was carried out for different intervals at 30 °C, and the reducing sugar produced was determined via the dinitrosalicylic acid (DNS) method with glucose as the standard. One unit of the enzyme was defined as the amount of enzyme that would produce reducing sugars corresponding to 1 µmol of glucose from soluble starch in 1 min under the assay conditions. The culture samples were also analyzed to assay the quality of the glucose (Appendix 2). This was spectrophotometrically determined via 3,5-dinitrosalicylic acid reaction at 540 nm [9].

Biomass were measured in units of dry cell weight (DCW). The fermentation broth was diluted up to five times and filtered. Cell pellets were re-suspended and

Table 1 Effect of Swingstir® on rheological behavior and enzyme activity of submerged culture in comparison with FZ impeller at the same P_v ($=690 \text{ W m}^{-3}$)

Fermentation time (h)	K_{app} (Pa s ^r)	n_{app}	K_{La} (h ⁻¹)	Enzyme activity (U m ⁻¹ L ⁻¹)	Shear rate (S ⁻¹)	μ_{app} (Pa s)	Average stress (Pa)
48							
Swingstir®	8.16	0.20	168	5000 ± 500	4.1	0.50 ± 0.06	10
FZ	36.60	0.36	101	4000 ± 340	5.0	0.48 ± 0.06	119
72							
Swingstir®	49.40	0.20	131	7984 ± 150	4.1	0.55 ± 0.05	65
FZ	299.00	0.30	60	5687 ± 167	5.0	0.70 ± 0.08	754

Table 2 Effect of Swingstir® impeller on macro- and micro morphology of *A. oryzae* at the same energy consumption

Fermentation time (h)	Pellet diameter (mm)	Hyphae thickness (µm)	Hyphae length (µm)	N_p	DCW (g L ⁻¹)	Re	$Y_{P/DCW}$ (U mL ⁻¹ g ⁻¹ L ⁻¹)	$Y_{P/E}$ (U mL ⁻¹ W ⁻¹)
48								
Swingstir®	5.7 ± 0.5	4.1 ± 0.2	49.00 ± 3.50	7.0	4.45 ± 0.95	6.90	1123	4830
FZ	5.4 ± 0.42	4.0 ± 0.57	48.00 ± 6.6	6.0	7.37 ± 1.59	54.33	542	3864
72								
Swingstir®	6.4 ± 0.4	4.3 ± 0.5	49.90 ± 6.0	30	10.61 ± 1.56	3.76	752	7714
FZ	6.3 ± 0.56	4.6 ± 0.57	47.56 ± 4.2	7.5	10.78 ± 1.25	32.30	527	5494

$Y_{P/DCW}$ yield production (alpha amylase activity) based on DCW, $Y_{P/E}$ yield production (alpha amylase activity) based on power consumption

[17] Amylases, α and β

By PETER BERNFELD

Assay Method

A large number of valuable methods have been described for the assay of amylase. They are based on one or another of the following phenomena observed in the enzyme digests: (1) increase in reducing power of a solution of amylopectin or soluble starch; (2) change of the iodine-staining properties of the substrate; (3) decrease of the viscosity of a starch paste. All three phenomena are characteristic for the action of α -amylases; only the first one, however, can be used for the assay of β -amylase. The assay method described below¹ is based on the increase in reducing power and is applicable for both α - and β -amylases. Although any method for the determination of reducing sugars may be used, the one described here has proved to be simple, reliable, and rapid. It was first employed by Sumner² for the assay of saccharase.

Reagents

Dissolve 1 g. of potato amylopectin, or 1 g. of Schoch's B fraction from corn,³ or, if neither is available, 1 g. of soluble starch, Merck, in 100 ml. of 0.02 M phosphate buffer, pH 6.9, containing 0.0067 M NaCl (for assay of human salivary α -amylase). For assay of sweet potato β -amylase, dissolve 1 g. of the substrate in 0.016 M acetate buffer, pH 4.8.

Dissolve at room temperature 1 g. of 3,5-dinitrosalicylic acid in 20 ml. of 2 N NaOH and 50 ml. H₂O, add 30 g. of Rochelle salt, and make up to 100 ml. with distilled H₂O. Protect this solution from CO₂.

Procedure. 1 ml. of properly diluted enzyme is incubated for 3 minutes at 20° with 1 ml. of the substrate solution. The enzyme reaction is interrupted by the addition of 2 ml. of dinitrosalicylic acid reagent. The tube containing this mixture is heated for 5 minutes in boiling water and then cooled in running tap water. After addition of 20 ml. of H₂O, the optical density of the solution containing the brown reduction product is determined photometrically, by means of a green filter,⁴ and a blank is prepared

¹ G. Noelting and P. Bernfeld, *Helv. Chim. Acta* **31**, 286 (1948).

² J. B. Sumner and S. F. Howell, *J. Biol. Chem.* **108**, 51 (1935); J. B. Sumner, *J. Biol. Chem.* **62**, 287 (1924-25).

³ T. J. Schoch, *Advances in Carbohydrate Chem.* **1**, 247 (1945); see also Vol. III [2].

⁴ Filter No. 540 in an Evelyn photoelectric colorimeter, or filter No. 54 in a Klett-Summerson photoelectric colorimeter.

in the same manner without enzyme. A calibration curve established with maltose (0.2 to 2 mg. in 2 ml. of H₂O) is used to convert the colorimeter readings into milligrams of maltose.

Amylase Activity. Amylase activity is expressed in terms of milligrams of maltose (C₁₂H₂₂O₁₁·H₂O) liberated in 3 minutes at 20° by 1 ml. of the enzyme solution, even though, in the case of α-amylatic action, the actual reaction products are dextrans rather than maltose. *Specific activity* is expressed as amylase activity per milligram of protein. Protein is determined by either micro-Kjeldahl or according to Lowry.⁵ When the Kjeldahl method is used with solutions containing ammonium sulfate, NH₃ is previously eliminated by distillation in the presence of MgO.

Sector / Industry	National Standard
Classification of Chinese Standard	C53
Word Count Estimation	7,782
Date of Issue	2016-08-31
Date of implementation	2017-03-01
Older Standard (superseded by this standard)	SB/T 10310-1999; GB/T 5009.40-2003; GB/T 5009.39-2003
Regulation (derived from)	Announcement of the State Administration of Public Health and Family Planning 2016 No.11

GB 5009.235-2016: PDF in English

GB 5009.235-2016

GB

NATIONAL STANDARD OF THE
PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

National Food Safety Standard -

Determination of Amino Acid Nitrogen in Foods

ISSUED ON: AUGUST 31, 2016

IMPLEMENTED ON: MARCH 01, 2017

Issued by: National Health and Family Planning Commission of the PRC

Table of Contents

Foreword ...3

1 Scope ...4

2 Principle ...4

3 Reagents and materials ...4

4 Instruments and apparatuses ...6

5 Analysis steps ...6

6 Description of the analysis result ...7

7 Precision ...7

8 Principle ...8

9 Reagents and materials ...8

10 Instruments and apparatuses ...9

11 Analysis steps ...9

12 Description of the analysis result ... 10

13 Precision ... 10

14 Others ... 10

National Food Safety Standard -

Determination of Amino Acid Nitrogen in Foods

1 Scope

This Standard specifies the method for determination of amino acid nitrogen in soy

4.2 10 mL micro-basic burette.

4.3 Analytical balance: the sensitivity is 0.1mg.

5 Analysis steps

5.1 Soy sauce sample

Weigh 5.0 g of sample into a 50 mL beaker; use water to wash it into a 100 mL volumetric flask for several times; add water to the scale; mix and take 20.0 mL into a 200 mL beaker; add 60 mL of water; turn on the magnetic stirrer; use sodium hydroxide standard solution [$c(\text{NaOH}) = 0.050 \text{ mol/L}$] to titrate until the pH meter indicates a pH of 8.2; record the number of milliliters of the sodium hydroxide standard titration solution which is consumed to calculate the total acid content. Add 10.0 mL of formaldehyde solution and mix. Use sodium hydroxide standard titration solution to further titrate until the pH reaches 9.2; record the number of milliliters of the sodium hydroxide standard titration solution which is consumed. At the same time, take 80 mL of water; firstly, use sodium hydroxide standard solution [$c(\text{NaOH}) = 0.050 \text{ mol/L}$] to adjust to pH 8.2; then add 10.0 mL of formaldehyde solution; use sodium hydroxide

standard titration solution to titrate to pH 9.2; do a reagent blank test.

5.2 Grain paste and soybean paste samples

Evenly stir the grain paste or soybean paste sample; place it in a mortar, and rapidly ground it to a state that no visible particles are seen in 10 minutes; place it in a grinding bottle for use. Use a weighing bottle of a known weight to weigh 5.0 g of the sample which is evenly stirred; use 50 mL of distilled water at about 80°C to wash it into a 100 mL beaker for several times; cool it, and transfer it to a 100 mL volumetric flask; use a small amount of water to wash the beaker for several times; merge the cleaning mixture into a volumetric flask; add water to the scale; mix and filter. Pipette 10.0 mL of filtrate; place it in a 200 mL beaker; add 60 mL of water; turn on the magnetic stirrer; use sodium hydroxide standard solution [$c(\text{NaOH}) = 0.050 \text{ mol/L}$] to titrate until the pH meter indicates pH 8.2; record the number of milliliters of sodium hydroxide standard titration solution that is consumed, so as to calculate the total acid content. Add 10.0 mL of formaldehyde solution and mix. Use sodium hydroxide standard titration solution to further titrate until the pH reaches 9.2; record the number of milliliters of the sodium hydroxide standard titration solution which is consumed. At the same time, take 80 mL of water; firstly, use sodium hydroxide standard solution [$c(\text{NaOH}) = 0.050 \text{ mol/L}$] to adjust to pH 8.2; then add 10.0 mL of formaldehyde solution; use sodium hydroxide standard titration solution to titrate to pH 9.2; do a reagent blank test.

Every milliliter of the solution is equivalent to 1.0 mg of ammonia-nitrogen (it can be stably stored in the refrigerator below 10°C for more than 1 year).

9.3.2 Ammonia-nitrogen standard working solution (0.1 g/L): use a pipette to accurately measure 10 mL of ammonia-nitrogen standard stock solution (1.0 mg/mL) in a 100 mL volumetric flask; add water to dilute to the scale; mix. Every milliliter of this solution is equivalent to 100 µg of ammonia-nitrogen (it can be stably stored in the refrigerator below 10°C for 1 month).

10 Instruments and apparatuses

10.1 Spectrophotometry.

10.2 Electric constant-temperature water bath (100°C ± 0.5°C).

10.3 10 mL glass colorimetric tube with a plug.

11 Analysis steps

11.1 Sample pretreatment

Weigh 1.00 g of sample into a 50 mL volumetric flask; add water to dilute to the scale; mix well.

11.2 Preparation of the standard curve

Accurately extract 0 mL, 0.05 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL, 1.0 mL of ammonia-nitrogen standard working solution (equivalent to 0 µg, 5.0 µg, 10.0 µg, 20.0 µg, 40.0 µg, 60.0 µg, 80.0 µg, 100.0 µg of NH₃-N) into a 10 mL colorimetric tube respectively. Add 4 mL of sodium acetate-acetic acid buffer solution (pH 4.8) and 4 mL

of color developer to each colorimetric tube; use water to dilute to the scale; mix well. Place it in a water bath at 100°C to heat for 15 min; then take it out; after it is cooled to room temperature in the water bath, transfer it to a 1 cm cuvette; use a zero-tube as the reference; measure the absorbance at a wavelength of 400 nm; draw the standard curve or calculate the linear regression equation.

11.3 Determination of the sample

Accurately extract 2 mL of sample dilution solution into a 10 mL colorimetric tube. Add 4 mL of sodium acetate-acetic acid buffer solution (pH 4.8) and 4 mL of color developer; use water to dilute to the scale; mix well. Place it in a water bath at 100°C to heat for 15 min; then take it out; after it is cooled to room temperature in the water bath, transfer it to a 1 cm cuvette; use a zero tube as the reference; measure the absorbance at a wavelength of 400 nm. Compare the sample absorbance with the standard curve quantitatively or substitute it into the linear regression equation to calculate the sample

Source: Above contents are excerpted from the PDF -- translated/reviewed by: www.chinesestandard.net / Wayne Zheng et al.



Phenotypic, Genomic, and Transcriptomic Comparison of Industrial *Aspergillus oryzae* Used in Chinese and Japanese Soy Sauce: Analysis of Key Proteolytic Enzymes Produced by Koji Molds

Lijie Zhang,^a Le Kang,^a  Yan Xu^a

^aLaboratory of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Lijie Zhang and Le Kang contributed to this manuscript equally. Author order was determined on the basis of seniority.

ABSTRACT *Aspergillus oryzae*, which generates numerous enzymes for the breakdown of raw materials, is an essential koji mold in soy sauce production. For better soy sauce productivity and flavor quality, China and Japan have developed their own industrial *A. oryzae* strains at distinct evolutionary branches for use in soy sauce production for decades. However, systematic comparison between the two national industrial strains has been poorly conducted, and thus we have not been able to generate adequate knowledge, especially regarding what are the key hydrolytic enzymes produced by *A. oryzae* during koji production. This study sequenced and assembled three high-quality genome sequences of industrial *A. oryzae* originating from China and Japan. Based on the genome sequences, a phylogenetic tree analysis was performed and revealed the evolutionary distances between the two national industrial koji molds. Meanwhile, a comparative phenotypic analysis revealed that the two national industrial strains differed in growth and catalytic characteristics, particularly in proteolytic enzyme activities. To investigate the molecular mechanism underlying the phenotypic difference, we conducted systematic comparative genome and transcriptome investigations. We found minor differences in the quantity and diversity of proteolytic enzyme genes between Chinese and Japanese koji molds, while the protease secretion ratio and transcriptional level were dissimilar. We identified 58 potential important enzymes associated with high protein breakdown efficiency during industrial koji fermentation by combining comparative phenotypic and transcriptome data. More research is required to confirm the function of these putative key hydrolytic enzymes.

IMPORTANCE *Aspergillus oryzae* is widely used as an industrial koji mold for soy sauce brewing due to its powerful raw material decomposition capability. Although various proteases in *A. oryzae* have been identified, it remains a challenge to find essential enzymes involved in soy sauce production. Generally, the industrial *A. oryzae* used in soy sauce brewing has excellent proteolytic activity. Based on this, we analyzed key proteolytic enzymes according to a comparison of the genome and transcriptome between three industrial strains. This study found little difference in gene numbers and mutations of proteolytic enzymes between three industrial *A. oryzae* strains. However, variations in protease secretion ratio and transcriptome were discovered between industrial strains. Based on that, we generated 58 candidate key proteolytic enzymes. This work comprehensively analyzed three industrial koji molds, revealing genome development under separate artificial domestication and helping in the study of key proteolytic enzymes during soy sauce production.

Editor Yanbin Yin, University of Nebraska—Lincoln

Copyright © 2023 Zhang et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Yan Xu, yxu@jiangnan.edu.cn.

The authors declare no conflict of interest.

Received 6 March 2022

Accepted 11 January 2023

Published 6 February 2023

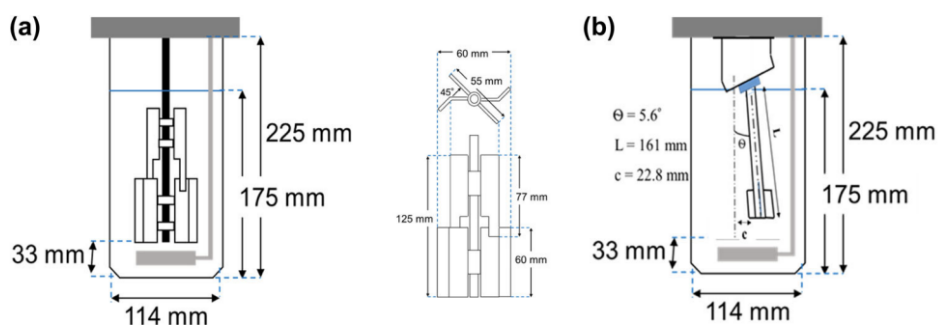
humidity. Seed koji was produced by using 14 g of wheat bran, 6 g of wheat flour, and 14 mL of water in a 250-mL Erlenmeyer flask. Mixtures were autoclaved at 121°C for 20 min, cooled to 40°C, and inoculated with the freshly pure conidia suspension of *A. oryzae* and then cultivated at 30°C for 72 h.

Physicochemical properties and enzymatic activities assay. Total nitrogen and soluble nitrogen were determined by the Kjeldahl azotometer (Kjeltec 8000; FOSS) (39). Amino nitrogen was determined by using the formol titration method, according to the National Standard of the People's Republic of China GB5009.235-2016 (40). The content of glucose at different fermentation stages was measured by the SBA-40X biosensor (Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, China). As previously reported, concentrations of amino acids in mature koji were determined by using a Hitachi amino acid analyzer (41).

Insufficient rate of r.t. agitation was provided by two different impellers (Fig. 1): (a) the FZ, and (b) a Swingstir®. The FZ consisted of two large paddle impellers with the upper paddle shifted at 45° in the rotating direction. The

Biomass were measured in units of dry cell weight (DCW). The fermentation broth was diluted up to five times and filtered. Cell pellets were re-suspended and

Fig. 1 Illustration of the geometrical design of **a** FZ and **b** Swingstir® impellers



Springer

washed with 20 mL distilled water and filtered again. The pellets were then transferred to a pre-weighted plate that was dried in an oven at 100 °C until reaching a constant weight.

Morphology analysis

from the beginning to the end of the fermentation process. Based on the torque values, the dimensionless power consumption [$N_p (= P/\rho N^3 D^5)$] of fermentation culture was measured

$$P_v = (2\pi NT)/V. \quad (3)$$

The viscosity of the fermentation culture after each