

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

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

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

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 р.

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

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 р.

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

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

на тему: Одержання ліпази культивуванням *Rhizopus japonicus*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

Бондарук Дарія Володимирівна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Сулейко Тетяна Леонідівна  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

Рецензент Годлевська Л.О.  
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2021 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Факультет Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерії»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ”      квітня      2021 року

## **ЗАВДАННЯ**

**НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

Бондарук Дарії Володимирівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи « Одержання ліпази культивуванням *Rhizopus japonicus*»

керівник роботи Сулейко Тетяна Леонідівна, асистент,

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від “30”\_03\_2021 року № 228-к

Строк подання студентом проекту (роботи) 02.06.2021

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Rhizopus japonicus*, цільовий продукт: ліпаза

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту ліпази РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтезцільового цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми виробництва . РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва ліпази РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва ліпази. РОЗДІЛ 10  
Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 2 аркуші формату А3. Апаратурна схема виробництв– 3 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки виробничого біосинтезу(ділянка сушіння) 1 аркуш формату А4

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
9	Клименко Олег Миколайович доцент, ктн., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання « 01» квітня 2021 року

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	01.04.2021- 05.04.2021	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	05.04.2021- 11.04.2021	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	11.04.2021- 16.04.2021	
4.	Біосинтез цільового продукту	16.04.2021- 19.04.2021	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	19.04.2021- 26.04.2021	
6.	Специфікація обладнання	26.04.2021- 04.05.2021	
7.	Опис технологічної схеми.	04.05.2021- 08.05.2021	
8.	Контроль виробництва	08.05.2021- 15.05.2021	
9.	Автоматизація ділянки виробництва	15.05.2021- 16.05.2021	
10.	Охорона довкілля	16.05.2021- 18.05.2021	
11.	Оформлення пояснювальної записки	18.05.2021- 27.05.2021	
12.	Виконання графічної частину проекту	21.05.2021- 27.05.2021	

Здобувач \_\_\_\_\_ Бондарук Д.В.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи \_\_\_\_\_ Сулейко Т.Л  
(підпис) (прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічного процесу виробництва ферментного препарату ліпази для сільськогосподарських потреб (продуцент *Rhizopus japonicus* 1403) у вигляді порошку для добавки у корм.

Технологія виробництва препарату включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва), основний технологічний процес представлений такими послідовностями: біосинтез цільового продукту, який здійснюється у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup>, та підготовчі етапи для біосинтезу (у ферментерах об'ємами 0,63 м<sup>3</sup>, 70 л, 7 л та в 2 колбах на качалці. Поживне середовище готується в окремими композиціями у реакторах. Друга частина представлена виділення цільового продукту ліпази з культуральної рідини після виробничого біосинтезу, зокрема (фільтрування, концентрування, стандартизація, сушіння у розпилювальній сушарці) стадії пакування, маркування, відвантаження та знешкодження відходів, що наведені на технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційна робота містить 140 сторінок друкованого тексту, 20 таблиць 27 рисунків та складається з 10 розділів, списку використаної літератури (107 джерел), та графічної частини (креслення формату А1, А3 та А4).

**Ключові слова:** продуцент, *Rhizopus japonicus* 1403 виробничий біосинтез, ферментація, фермент, ліпаза, екзометаболіт, виділення, фільтрування, стандартизація, наповнювач, розпилювальна сушка, активність.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	8
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	14
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	18
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	20
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	23
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	24
3.1. Потреба у цільовому продукті	24
3.2. Розрахунок потужності виробництва	28
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	29
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	34
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	34
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	35
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	37
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	37
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	37
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	39
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	41
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	52
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	52
5.3. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях	69

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	71
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.	78
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	96
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів	96
8.2. Мікробіологічний контроль	103
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	108
8.3.1. Концентрація біомаси	108
8.3.2. Концентрація цільового продукту	109
8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	110
8.4. Показники якості готового продукту	113
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	116
РОЗДІЛ 10 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	122
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	122
10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва	124
10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	124
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	126
10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів	127
10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів	129
ЛІТЕРАТУРА	130
ДОДАТКИ	141

## Вступ

Біотехнологія є молодого галуззю, але вже добре себе зарекомендувала. Синтез ферментів мікроорганізмами для практичного їх використання привертає увагу вчених і технологів багатьох країн, і виробництво мікробних ферментів в даний час розширюється. Це пов'язано, перш за все, з тим, що в останні десятиліття ХХ століття значно зросла кількість харчових і кормових продуктів, вироблених з додаванням ферментних препаратів. Незважаючи на те що багато робіт, присвячених ферментах, а особливо ліпаз, важко назвати такі, в яких вони охарактеризовані досить повно з точок зору властивостей і структури білка, будови активного центру, каталітичної дії, специфічності, кінетичних і термодинамічних характеристик [1].

Ферменти і їх ферментативні комплекси широко застосовуються в самих різних областях діяльності: в харчовій, текстильно-шкіряної, фармацевтичної і косметичної і галузях промисловості, в медицині і сільському господарстві, органічному синтезі і біохімічному аналізі [2].

Виробництво ферментних препаратів займає одне з провідних напрямків у розвитку біотехнології в усьому світі. Їх застосування в промисловості дозволяє інтенсифікувати безліч технологічних процесів, збільшити обсяги продукції, підвищити її якість і знизити собівартість, а так само заощадити на сировині [3].

У 21 столітті високих технологій людство прагне замінити енергоємні і шкідливі для навколишнього середовища виробництва процесами, що використовують потенціал природи.

Білки – природні молекули нанометрової величини, які виконують в клітці всі необхідні функції, починаючи від структурної і закінчуючи транспортною та каталітичною. Досить велика кількість сучасних виробників переходить на використання ферментів як каталізаторів, що мають ряд переваг в порівнянні з хімічним синтезом. Ферментативні реакції відрізняються специфічністю, не вимагають високих температур та, що більш важливо, не утворюють шкідливих

### НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ

#### Вступ

**Кафедра БТМ**

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Літ.	Арк.	Аркуші
Розроб.		Бондарук Д.В..					
Керівник		Сулейко Т.Л.				6	146
Консультант							
Н.Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					

побічних продуктів – ксенобіотиків [4]. Як продуцентів різних гідролаз використовуються культури міцеліальних грибів, дріжджів і бактерій. Серед бактерій активні продуценти ліпаз відносяться до роду *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*. Серед дріжджів кращими продуцентами є представники роду *Candida* (*C. lipolytica*, *C. paralipolytica*, *C. cylindraceae*). Висока ліпазна активність відзначається у грибів роду *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*.

**Актуальність роботи.** Застосування грибів роду *Rhizopus* для отримання ферментів представляє інтерес в тому, що можливе використання не тільки ферментів, що виділяються в культуральну рідину, але і самих клітин грибів, як джерело мікробного білка і вітамінів. В результаті цього технологічний процес в цілому стає безвідходним виробництвом [4]. Для протидії негативним ефектам некрохмалистих полісахаридів (НПС) у кормах для птиці їх збагачують екзогенними ферментами, що доповнюють недостатню або відсутню ферментативну активність травних секретів шлунково-кишкового тракту. Екзогенні НПС-ферментів розглядають як перспективну альтернативу кормовим антибіотикам у якості стимуляторів росту [5]. Були дослідження, які проведені на бройлерах кросу Хаббард, в 2017 році із застосуванням ферментного препарату. Головним підсумком даного експерименту, що підтверджує високу економічну ефективність ліпази, є показник собівартості виробництва 1 кілограма м'яса, який у дослідній групі був нижче, ніж у контрольній [6]. Даний препарат широко використовується, адже для його синтезу не потрібно затрачати великі кошти і мікроорганізм за короткий час здатний синтезувати велику кількість ліпаз, який для нас становить значний інтерес. Ще однією перевагою є те що ферментні препарати, а саме ліпази не досить широко синтезують в Україні, тому не має високої конкуренції.

**Новизна роботи.** Попит на даний тип продукції різко зростає, адже в Україні досить розвинено сільськогосподарське виробництво. Ліпази мають досить широкий спектр дії і можна використовувати в багатьох галузях. Новизною є використання штаму *Rhizopus japonicus* 1403, який за 60 годин ферментації на середовищі з індуктором, що накопичує ліпазу з активністю 1350 Од/мл та вказує на те, що даний штам мікроорганізму є одним із кращих продуцентів даного препарату [7].

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.

Основну частину промислово важливих ферментів світового ринку на сьогодні становлять гідролази, до яких віднося ліпазу, що може використовуватись у багатьох галузях господарства. Ліполітичні ферменти поширені в організмах різного рівня біологічної організації, але вирішити технологічні завдання можна тільки за допомогою їх мікробного синтезу. [8].

За класифікації ферментів ліпаза має назву триацілгліцерацілгідролаза (**КФ 3.1.1.3**), її рекомендована робоча назва – триацілгліцеролліпаза; фермент має ще назви: стеапсин, трибутираза, ліпаза тригліцеридів.

Ліпази є різного походження і тому вони сильно відрізняються одна від одної за специфічністю дії, спорідненістю до різних субстратів, розчинністю, оптимальному рН й іншим властивостям. Так, наприклад, ліпаза насіння рицини є нерозчинною у воді, має оптимум рН 4,7...5,0; панкреатична ліпаза – розчинна, й оптимум рН її дії знаходиться в слаболужному середовищі. Для мікробних ліпаз-ферментів з молекулярною масою 30...55 кДа, оптимальна температура дії не перевищує 65°C, оптимальний рН більшості досліджених ліпаз знаходиться в слабокислій і нейтральній зоні [9].

Серед бактерій активні продуценти ліпаз відносяться до роду *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium*. Серед дріжджів кращими продуцентами є представники роду *Candida* (*C. lipolytica*, *C. paralipolytica*). Висока ліпазная активність відзначається у грибів роду *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Oospora Humicola*.

Відповідно до позиційної специфічності ліпази можна розділити на дві групи.

- Перша група не мають позиційної специфічності і відщеплює ацильні групи з усіх трьох положень триацілгліцеролів. Ця група ліпаз синтезується *Galctomices geotrichium*, *Candida cylindracea*, *Pseudomonas fragy* ін.;

					НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарук Д.В..			РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Сулєйко Т.Л.					8	140 г
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

- Друга група ліпаз звільняє жирні кислоти позиційно-специфічно. Якщо специфічність дії ліпаз пов'язана з 1 і 3 становищем ацилгліцеринів, останні гідролізуються з утворенням 1,2(7,8)-диацилгліцеринів і 2-моноацилгліцеринів. Такі ліпази продукують *Rhodotorula pilimanae*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus microsporus* і ін [9].

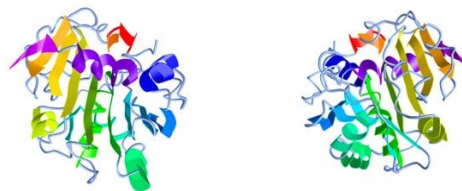
Ліпаза *R. oryzae* (ROL) - це білок, синтезований як форма попередника, що містить попередню послідовність 26 амінокислот, а потім послідовність 97, приєднану до N-кінця зрілої послідовності 269 амінокислот (рис 1.1). Усі відомі ліпази з роду *Rhizopus* мають однакову ідентичну структуру, навіть незважаючи на те, що деякі амінокислотні заміни можна виявити при порівнянні їх первинних послідовностей, не тільки між різними видами, а й між різними ізолюваними штамми одного виду.



**Рисунок 1.1** Схематичне зображення ліпази *R. oryzae* (ROL). Стрілки означають потенційні точки N- глікозилювання .

ROL містить чотири потенційні сайти N-глікозилювання (рис. 1), які дотримуються консенсусної послідовності Asn-X-Ser / Thr, де X - будь-яка амінокислота замість проліну [10] .

3D-структура ліпази з *R. Oryzae* були кристалографічно вирішені і показали, що всі ліпази мають загальну структуру складчастості  $\alpha / \beta$  гідролази, яку також можна знайти в інших гідролазах. Що стосується ROL, то він містить дев'ять  $\alpha$ -спіралей та вісім  $\beta$ -ланцюгів, утворюючи молекулу, яка стабілізується трьома дисульфідними зв'язками між залишками 29–269, 40–43 та 235–244 [ 11,12].



**Рисунок 1.2.** Тривимірна структура ліпази *R. delemar* (= *oryzae* ) з двох різних точок зору.

## Характеристика «Мегаліпаза ТС».

Виробник: ТОВ «Мегавланд»

**Активність:** 10 000 од / г

**Форма:** порошок

**Колір та запах:** від світло-жовтого до коричневого, з характерним запахом.

**Тип ліпази:** грибкова

**Термін зберігання:** 12 місяців

**Норма введення:** 150-300 грам / тонну

**Термостабільність:** 90 max ° С

**Фасовка:** 25 кг

**Температура зберігання:** від 0 ° С до 20 ° С [13].

**Застосування в промисловості.** Останнім часом значну частку ринку промислових ферментів (близько 70%) становлять гідролази, що включають ліпази, що застосовуються в процесах переестерифікації жирів, органічному синтезі, для поділу рацемічних сумішей і отримання ароматичних добавок. Найбільші успіхи досягнуті в застосуванні ліпаз в складі біокаталізаторів для переестерифікації жирів, отримання біопалива і в якості добавок до поверхнево-активних речовин [14].

Області використання ліполітичних ферментів наведені нижче у таблиці 1.1.

*Таблиця 1.1*

### Промислове використання мікробних ліпаз [15].

Галузь використання	Дія	Продукт
Продукти на основі молока	Гідроліз молочних жирів, модифікація вершкового масла	Ароматизуючі агенти сиру і масла
Хлібопекарські виробництва	Поліпшення аромату і продовження терміну зберігання	Хлібобулочні вироби
Напої	Поліпшення аромату	Напої
Харчові приправи	Поліпшення якості	Майонез, інші приправи
Переробка м'яса та риби	Поліпшення аромату і видалення жиру	М'ясні і рибні продукти

		Продовження табл. 1.1.
Лікувальне харчування	Трансестерифікація	Дієтична їжа
Хімікати	Синтез	Хіральні з'єднання і реагенти
Фармацевтичні виробництва	Трансестерифікація, гідроліз	Препарати для нормалізації травлення
Косметика	Синтез	Емульгатори, зволожуючі агенти
Виробництво шкіри	Гідроліз	Шкіряні вироби
Виробництво паперу	Гідроліз	Паперові вироби
Хімчистка	Гідроліз	Видалення забруднень

**Харчова промисловість.** Ліпаза з *Mucor miehei* замінюють тваринну підшлункову естеразу, що викликає утворення специфічного букета в твердих італійських сирах. Грибні ліпази прискорюють дозрівання сиру Чеддер і покращують аромат та забарвлення сирів. Ферментні препарати ліпаз у великих обсягах застосовують сьогодні у борошномельній та хлібопекарській промисловості, забезпечує можливість переробки борошна з нестабільними хлібопекарськими властивостями, формування певних властивостей тіста, поліпшення якості хлібобулочних виробів різноманітного асортименту, стабілізацію якості і продовження терміну зберігання свіжості хліба. Також, використовують дріжджі і міцеліальні гриби у виробництві ферментованих м'ясних продуктах, беруть участь в ароматоутворенні, а також прискорення дозрівання ковбас.

Тому перелік галузей харчової промисловості, в яких використовується фермент ліпаза, з кожним днем зростає. Це сироваріння, виробництво хліба, круп'яних і макаронних виробів, кондитерська промисловість, приготування безалкогольних напоїв, виробництво рослинних олій, отримання дієтичних жиркових продуктів тощо [16].

**Харчова добавка.** Ліпаза (Lipases) зареєстрована в якості харчової добавки з міжнародним кодом E1104. Основне застосування ліпази – підсилювач смаку і аромату [17].

**Біопаливо.** Також у сучасному світі на даний момент є актуальна тема з біопаливом. У даній сфері з метою отримання біодизелю з рослинної олії ферментативним способом, виділена високоактивна ліпаза з бактерії *Pseudomonas aeruginosa* [18].

**Медицина та фармацевтична галузь.** Перші ферментні препарати мікробного походження з'явилися в Японії. Перевага препаратів на основі мікробіологічних ферментів є відсутність ризику інфікування хворого різними зоонозами, низька ймовірність алергії, збереженні активності в широкому діапазоні температур, що полегшує умови зберігання. До 2004 року таблетки Солізим як діючої субстанції містили ліпазу з *Penicillium solitum*, таблетки Сомілаза – комплекс ліпази з *Penicillium solitum* і  $\alpha$ -амілази з *Bacillus subtilis*. В результаті проведених спільних робіт лабораторії біохімічної фармакології ДП ДНЦЛЗ і фахівців ВАТ «Вітаміни» (м.Умань) було налагоджено відтворення добре відомих ферментних препаратів Сомілаза і Солізим на основі імпортованих субстанцій - мікробіологічної ліпази (ліпаза AP) і амілази (грибкова діастаза) (виробництво Японії). Ліпаза AP екстрагована і очищена в компанії «Amano Pharmaceutical Ltd.» з культури гриба *Aspergillus filamentous* [19].

**Косметологія.** Сучасна косметологія звернула на властивості ферментів на їх унікальні можливості в різних напрямках: anti-age і ліфтингові програми, лікування целюліту, корекція фігури, догляд за проблемною шкірою та ін. [20]. Рекомбінантна Ліпаза PB500 має мікробіологічне походження, отримана з *Thermus thermophilus* і проводиться в *E. coli*. Перевага ліпази PB500 - відсутність гормон-чутливості, що пояснює її сильнодіючу активність і відсутність побічних ефектів [21].

**Перобка відходів.** Перспективність ферментативного гідролізу жирової фракції відходів ліпазою продуцента *Rhizopus* для удосконалення технології переробки відходів оліє-жирової галузі харчової та переробної промисловостей [22].

**Органічний синтез.** Прикладом використання ліпазами синтезу є отримання глікозилгліцеридів, які використовуються в якості протипухлинних засобів, і ефірів алкілглікозидів і  $\alpha$ -гідроксикислот, які використовуються в якості натуральних компонентів косметичних засобів, значно поліпшують еластичність шкіри [23].

**Побутова хімія.** Ліпази – розщеплюють жири, целюлозні комплекси мають «поліруючим» ефект, прибираючи і запобігаючи появі ковтунів на одязі. При цьому ефективність миючих засобів з ферментами залежить від температури і рН миючого розчину. Першою ліпазою для пральних порошоків була Lipolase, в 1988 році введена на ринок Новозаймс. Також, ліпазу для миючих засобів випускають інші виробники ферментів, наприклад, Genencor (тепер частина DuPont) під торговою маркою Lumafast, і Gist-Brocades (тепер частина DSM) під торговою маркою Lipomax [24].

**Висновок.** Використання ліпаз у господарстві є вигідним як з економічної, так і з екологічної точки зору. Перелік галузей виробництва, в яких ці ферменти вже успішно використовуються або плануються до використання, постійно розширюється. На даний час головним джерелом отримання ліполітичних ферментних препаратів є широке коло мікроорганізмів різних таксономічних груп

## РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

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

Мікробні ліпази складають важливу групу біотехнологічних цінних ферментів. Причина технологічного потенціалу є: висока швидкість росту, потужний ферментний апарат, можливості проводити генетичні маніпулювання з мікроорганізмами [14,15].

Продуцентами ліполітичних ферментів мікробного походження можуть бути гриби, бактерії, актиноміцети. Згідно літературним даним більшість бактерій накопичують внутрішньоклітинну ліпазу тоді, як актиноміцети, гриби та дріжджі – переважно позаклітинну. Згідно літературним даним дріжджовими культурами – ефективними продуцентами ліпази – є представники роду *Candida* (*C. lipolytica*, *C. paralipolytica*, *C. cylindraceae*). Бактерії родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium*; актиноміцетів – *Streptomyces flavogriseus*, *Thermoactinomyces vulgaris*.

У промисловості частіше використовують мікроскопічні гриби. Високою ліполітичною активністю характеризуються гриби родів: *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Oospora*, *Humicola*.

Біотехнологічні способи отримання ферментаційних препаратів є найбільш ефективним та доцільним. Також визначальм фактором для максимального виходу фермента є не тільки вибір високоактивного продуцента, а й створення найбільш оптимальних умов культивування з урахуванням всіх нюансів [14,15]. Дані засвідчують, що для всіх штамів потрібне постійне перемішування і підтримка певного значення рН та температурного оптимуму. Завдяки підтримці всіх цих параметрів можна підвищити синтез цільового продукту на високому рівні.

Штам дріжджів *Rhizopus japonicus* 1403, володіє високою ліполітичною активністю

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ</b>					
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b>					
Розроб.	Бондарук Д.В.							Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Сулейко Т.Л								14	1404
Консультант								<b>Кафедра БТМ</b>		
Н.Контр.										
Затверд.	Пирог Т.П.									

до 1350 од./мл. Умови культивування та поживне середовище не є досить складними. Час культивування не досить тривалим всього 60 годин [7]. Другим продуцентом є рекомбінатний штам дріжді *Yarrowia lipolytica* Y-3323– продукує ліпазу з активністю 9000 од./мл. Умови культивування є схожими до попереднього продуцента тільки в даному випадку самий час культивування є тривалішим [25].

Є ще продуценти ліпази - *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-11302 володіє нижчою активністю продукування ферменту, *Candida parapsilosis* М10 та *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3600 мають активність, що виражені в од/г, тому ми не можемо їх порівнювати з іншими продуцентами [26,27,28].

Узагальнюючу характеристику особливостей одержання ферменту ліпази з використанням різних продуцентів наведено нижче в таблиці 2.1.

На прикладі таблиці можемо порівняти, за допомогою якого мікроорганізму буде відбуватися найбільш доцільне виробництво препарату.

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТІВ ЛІПАЗИ

Продуцент	Склад поживного середовища г/л	Ліполітична активність	Час культ. (год)	Умови культивування	Література
<i>Yarrowia lipolytica</i> Y-3323	YNB із додаванням глюкози (5 мас. %), оливкової олії (5 мас. %) сечовини (0,8 мас. %).	9000 од/мл	72	температура культивування -30 °С Швидкістю обертання 250 об./хв	Рекомбинантний штамм дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> — продуцент ліпазы: Пат. 2451075 РФ: МПК7 C12N9/20 / Т.В. Выборная, Т.В. Юзбашев, Т.И. Соболевская и др.; заявитель и патентообладатель Федерал. гос. унитарное предприятие “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов”. — № 2011113670/10: Заявлено 08.04.2011: Опубл. 20.05.2012
<i>Rhizopus japonicus</i> 1403	Соева макуха 17; Олеїнова кислота 3,5; Кукурудзяний екстракт 7; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4	1350 од/мл	60	pH 6,8-7,0, температура культивування- 30°С Постійне перемішування	(Оптимизация условий биосинтеза липазы / С.А. Шеламова, Н.А. Жеребцов, В.В. Щеголев // Ферментная и спиртовая промышленность. - - №4. - С.26-28) <a href="https://patents.google.com/patent/RU2233325C1/ru">https://patents.google.com/patent/RU2233325C1/ru</a>



## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Посівний матеріал вирощують в колбах ємністю 750 мл, що містять 100 мл середовища на качалці, що робить 250 об / хв протягом 20-24 год при 30°C. Інокулят передають в ферментаційне середовище.

Склад середовища, г/л:

- Соева макуха - 17;
- Олеїнова кислота - 3,5;
- Кукурудзяний екстракт - 7;
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  - 4.

Умови культивування *R. japonicus* 1403: рН 6.8-7.0 процес ферментації проводять методом глибинного культивування при температурі 30 °С, Т = 60 год. Вихід після ферментації становить 1350 од/мл [7].

Дана порівняльна характеристика (див. табл. 2.1) є недостатньою, адже ми не можемо повністю визначити всі переваги культивування мікроорганізмів. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента потрібно порівняти вартість приготування 1 літра поживного середовища, використуваних двома кращими продуцентами згідно порівняльної характеристики продуцентів (табл.2.1).

## Вартість компонентів поживних середовищ

Продуцент	Склад поживного середовища г/л	Ціна компонента грн./кг(л)	Вартість компонента (грн.)на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>Rhizopus japonicus</i> 1403	Соевий жмих 17	16.5	0.28	1,2,3,4
	Олеїнова кислота 3,5	12.76	0.05	
	Кукурудзяний екстракт 7	35	0.25	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4	36	0.15	
	Вартість середовище за літр – 0.73 грн.			
<i>Yarrowia lipolytica</i> Y-3323	YNB 6.9	97 євро/100 г*	6.7 євро=225.48 грн*	5,6,7,8
	оливкова олія- 50	105	5.25	
	Сечовин- 8	28	0.23	
	Глюкоза - 50;	60	3	
	Вартість середовище за літр –233.96 грн.			

**Примітка:**\* курс євро на 18.05.2021 1 євро=33.6538 грн

Ціни наведено станом на 18.05.2021 р.

- <https://prom.ua/ua/p1399680037-soevyj-zhmyh-makuha.html?>
- <https://novohim.com.ua/ua/catalog/promislova-ximiya-j-sirovina-ole%D1%97nova-kislota-chista-bez-zapaxu/>
- <https://agro-smart.com.ua/product/ekstrakt-kukuruznyy>
- <https://him-element.com.ua/20-%D1%84%D0%BE%D1%81%D1%84%D0%B0%D1%82%D0%BD%D1%8B%D0%B5-%D1%83%D0%B4%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8F/p/226-%D0%B4%D0%B8%D0%B0%D0%BC%D0%BC%D0%BE%D0%BD%D0%B8%D0%B9%D1%84%D0%BE%D1%81%D1%84%D0%B0%D1%82-%D0%B4%D0%B0%D1%84>
- <https://www.dia-m.ru/catalog/reactive/mikrobiologicheskie-sredy-komponenty-dobavki-shtammy-mikroorganizmov/sredy-dlya-molekulyarnoy-biologii/sreda-difco-yeast-nitrogen-base-13217555/>
- <https://prom.ua/ua/p976701341-oliya-olivkova-olimp.html?>
- <https://plants-club.ua/superfosfat-podviynyy-1-kh8953>
- <https://prom.ua/ua/p652096022-glyukoza.html>

Умовна вартість 1 од./мл цільового продукту при культивуванні

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Ліполітична активність од/мл	Умовна вартість одиниці активності, грн/од	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту, синтезованого за год.
<i>Rhizopus japonicus</i> 1403	0.73	1350	0.0005	60	22.5
<i>Yarrowia lipolytica</i> Y-3323	233.96	9000	0.026	72	125

Дані, наведені у табл. 2.2, засвідчують, що середовище для культивування *Yarrowia lipolytica* Y-3323 майже в 320 разів дорожче, ніж середовище для культивування *Rhizopus japonicus* 1403. Але для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент потрібно розрахувати умовну вартість цільового продукту – ліпази (табл. 2.3), ми розрахували умовну вартість продукту двох продуцентів. Узагальнивши всі дані, можна зробити висновок, що доцільніше використовувати для одержання ліпази продуцент *Rhizopus japonicus* 1403.

Даний штам є найкращим для промислового синтезу і подальшого використання у різноманітних сферах виробництва.

### 2.3. МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНІ ТА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОЗНАКИ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Ризопус (*Rhizopus*) — рід цвілевих, умовно-патогенних нитчастих грибів, який налічує 11 видів. У побуті гриби цього роду відомі під спільною назвою «головчата цвіль» або «чорна цвіль»

**Будова.** Гриби роду *Rhizopus* характеризуються розгалуженим міцелієм, що складаються з трьох типів гіфів: столони (дугоподібно вигнуті гіфи), ризоїдів, якими прикріплюється до субстрату і зазвичай негалуджених спорангієносців. На кінцях спорангієносців знаходяться округлені, чорні спорангії. У спорангіях утворюються численні нерухомі багатоядерні спорангіоспори для безстатевого розмноження. *Rhizopus* може розмножуватися і статевим шляхом, коли присутні два сумісних і

фізіологічно різних міцеліїв. При статевому процесі утворюють зигоспори. Швидко зростаючі колонії змінюють свій колір від білого до темного [29].

### **Морфологія**

*Rhizopus* характеризується швидко зростаючим грибом, де ріст за оптимальних температур швидкий - 1,6 мм на годину (майже 0,5 мкм на секунду - достатньо, щоб мати можливість безпосередньо візуалізувати гіфальне подовження в реальному часі під мікроскопом) [30]. Швидко росте, хороше спороутворення при культивуванні на агаризованих середовищах, наприклад, сусло-агар. На картопляно-дріжджевому агарі при 37 С створюються колонії до 1 см висоту, спочатку світло-сірі, а згодом попільно-сірі. Ризоїди прості чи слабо розвинені, світло-коричневі. Спорангіоносії прості, прямі чи слабо вигнуті, відходять по 1-3 від шийки ризоїда чи гіфів, 82-520\*5-13 мкм. Спорангії 45-90 мкм в діаметрі. Міцелій несептований. При високому рівні поживних речовин розмножується нестатевим шляхом, продукуючи азигоспори. [31,32,33].

### **Культуральні ознаки**

Характер росту на щільних поживних середовищах – рівномірне радіальне розповсюдження міцелію. Колонії різного розміру, в залежності від віку. Поверхня колоній шорсткувата, край рівний. На синтетичному агаризованому середовищі Чапека з пептоном росте добре. На 1 добу колонії без кольору, волокнистий міцелій. На 2-3 добу утворюються спори. На середовищі з кукурудзяним екстрактом утворює повітряний міцелій. Пігментація повітряного міцелію – від білого до насиченого брудно-жовтого (в залежності від віку колонії) [32].

### **Відношення до Карбону.**

Найбільш допустимими джерелами вуглецю є глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, крохмаль, гліцерин, із жирів – бавовняна, оливкова, гірчична, соняшникова, персикова олія та свинячий і кашалотний жир.

### **Відношення до Азоту**

Засвоює нітрати, найкраще азот в амонійній формі. Із органічних джерел азоту, асимілює пептон, желатин, казеїн, дріжджовий екстракт, сечовину, кукурудзяний екстракт.

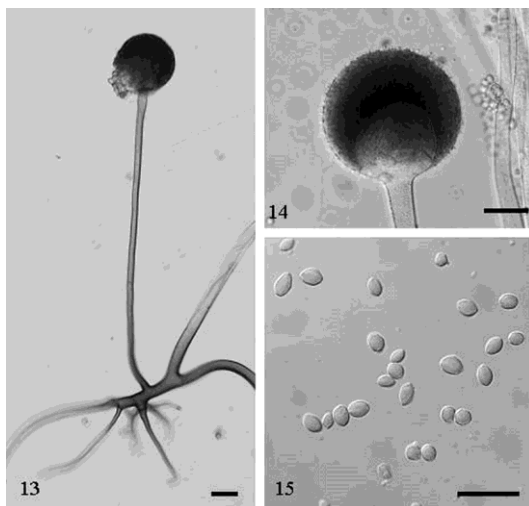
**Відношення до температури:**

Мезофіл, температура 20-43 °С. Оптимальна 28-30 °С

**Відношення до кислотності середовища:**

Росте в широких межах рН від 3,0 до 9,0. Оптимум 7,0-8,0 [32].

Штам є продуцентом ліпази. Найкращий ріст і біосинтез ліпази відбувається на середовищі з кукурудзяним екстрактом [33]. Далі наведено фото *Rhizopus oryzae* під мікроскопом ( рис 2.1) та штамп на рису від Angel Brand Jiuqu (рис 2.2)



**Рис. 2.1** *Rhizopus oryzae* (BCRC 33888) під мікроскопом [34].



**Рис 2.2** *Rhizopus* (чистий штам, вирощений на рису від Angel Brand Jiuqu [35]).

## 2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Таблиця 2.4

Таксономія в базі даних згідно МусоБанк [36].

Таксономічна група	Класифікація:
Домен:	<i>Еукаріоти (Eukaryota)</i>
Царство:	<i>Гриби (Fungi)</i>
Підцарство:	<i>Нижчі гриби</i>
Відділ:	<i>Зигомікотові гриби (Zygomycota)</i>
Клас:	<i>Мисормисотіна</i>
Порядок:	<i>Мукоральні (Mucorales)</i>
Родина:	<i>Мукорові (Mucoraceae)</i>
Рід:	<i>Ризопус (Rhizopus)</i>
Вид	<i>Японікус</i>

### **Синоніми:**

*Rhizopus arrhizus* А. Фіш., (1892)

Ризопус столоніфер Вульємін, (1902)

*Rhizopus japonicus* Вуїл. (1902)

*Rhizopus nodosus* Намзил. (1906)

*Rhizopus nodosus* Ганзава (1912)

*Rhizopus Oryzae*. [37].

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### 3.1 ПОТРЕБА ВИКОРИСТАННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Основну частину промислово важливих ферментів світового ринку на сьогодні становлять гідролази. Ліпази можуть використовуватись у багатьох галузях господарства, де необхідний частковий або повний гідроліз жирів та олій. Вони широко застосовуються в харчовій, фармацевтичній та легкій промисловості, в медицині, в препаративній хімії та біохімії, у виробництві мийних засобів, для очищення стічних вод і каналізаційних комунікацій [38]. На сьогодні в Україні промислове виробництво ферментів ліполітичного комплексу не налагоджено. Стимулюючим фактором у виробництві ліпаз є відсутність стабільних високоактивних промислово цінних продуцентів з новими властивостями, необхідними для тієї чи іншої галузі [39].

**Сільське господарство.** У тваринництві основними концентрованими кормами є ячмінь, овес, жито, непродовольча пшениця і продукти їх переробки. Потенціал цих кормів при годівлі тварин із однокамерним шлунком не повною мірою використовується організмом через значний вміст клітковини. Низька перетравність зернових зумовлена тим, що окрім клітковини в них у значних кількостях містяться інші некрохмалисті полісахариди зокрема  $\beta$ -глюкани і пентозани. Проте в тварин, особливо моногастричних, не виробляються власні ферменти, які могли б розщеплювати некрохмалисті полісахариди, через що вони майже не засвоюються організмом, при цьому некрохмалисті полісахариди перешкоджають доступу власних ферментів організму до інших поживних речовин та знижують їх перетравність. Підвищення перетравності поживних речовин дало б можливість отримати додаткову продукцію за тих самих витрат кормів.

Кормові ферменти не впливають безпосередньо на мікрофлору кишківника, але вони позитивно діють на корми.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ</b>			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарук Д.В.			<b>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування</b>	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Сулейко Т.Л.					24	143
Консультант						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н.Контр								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Ферменти на відміну від гормонів і біостимуляторів діють не на організм тварин, а на компоненти корму в шлунково-кишковому тракті, вони не накопичуються в організмі та продуктах птахівництва і тваринництва. Вони не входять до складу кінцевих продуктів реакції, не витрачаються в їх процесі і після закінчення залишаються в колишній кількості. Через це, ведення кормових ферментів у комбікорми для тварин і птиці дає такі позитивні ефекти:

- підвищення перетравності поживних речовин та полегшення її всмоктування в тонкому відділі кишечника;
- компенсація дефіциту власних травних ферментів у молодняку та в стресових ситуаціях;
- підвищення кормової цінності раціонів;
- зниження витрат кормів на одиницю продукції;
- зростання продуктивності тварин і птиці, при тих же затратах на виробництво [39,40].

Основними споживачами кормових ферментів є птахівництво і свинарство. За розрахунками, потенціал ринку становить 16,4 тис. тонн (11,8 тис. тонн - птахівництво; 4,6 тис. тонн - свинарство) [41].

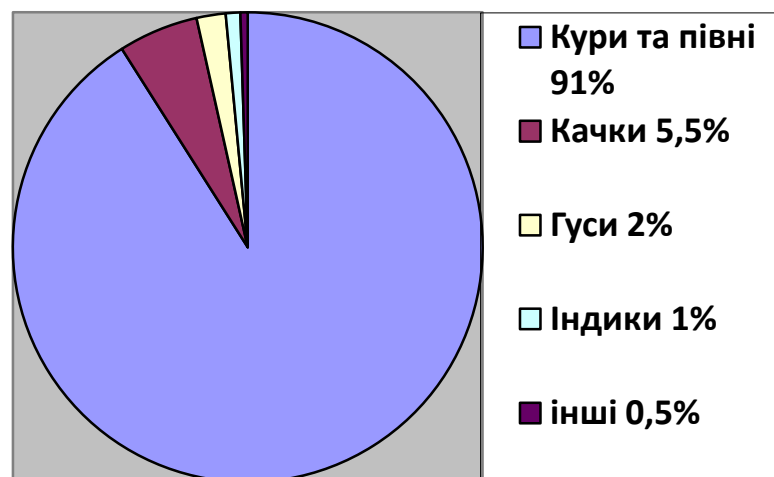
В даному проекті, розглянуто використання ліпази у кормових ферментах для птахів. У зв'язку з інтенсивним вирощуванням птиці в нашій країні попит на кормові ферменти в найближчі роки збільшиться.

Зарубіжні кормові ферменти представлені в формі порошків, розчинів, гранул і мікрогранул. Сухі ферментні препарати, на відміну від рідких концентрованих форм, можна вводити в премікси, білково-вітамінно-мінеральні добавки, а у разі їх термостабільності – в розсипні комбікорми перед гранулювання [42].

Вітчизняне птахівництво стало одним із найбільш економічно привабливих та конкурентоспроможних видів агробізнесу, про що свідчить динаміка зростання виробництва м'яса птиці і яєць. Особливістю сучасного стану розвитку даної галузі впродовж останнього десятиліття є динамічне зростання чисельності поголів'я птиці усіх видів, нарощування обсягів виробництва, збільшення внутрішнього попиту та експорту продукції [43].

Поголів'я сільськогосподарської птиці в Україні у всіх категоріях господарств станом на 1 січня 2019 року склало 211647,7 тис. голів, що на 3,3 % більше від чисельності птиці аналогічного періоду 2018 року - 204830,9 тис. голів – дані з Державного комітету статистики України. За інформацією Державного комітету статистики України промислові підприємства наростили поголів'я на 5,6% порівняно з 2018 р– до 118812,2 тис голів. У господарствах населення поголів'я птиці зросло на 0,5% – до 92801,8 тис. голів. Дані наведені без урахування тимчасово окупованої Автономної Республіки Крим, міста Севастополя і ОРДЛО [44].

Загальна структура утримання свійської птиці за видами в усіх категоріях господарства виглядає наступним чином (рис.3.1):



**Рис.3.1** Структура утримання свійської птиці за видами

Далі наведена таблиця 3.1. чисельності поголів'я сільськогосподарської птиці по областях України [44].

**Чисельність поголів'я сільськогосподарської птиці по категорії  
господарств у розрізі областей України.**

(тис. голів)

№	Область	Господарства всіх категорій		Сільськогосподарськ і підприємства		Господарства населення	
		2019	2018	2019	2018	2019	2018
	Україна	21588,6	204830,9	118812,9	112512,3	92841,6	92318,6
1	Вінницька	32588,6	29670,4	24107,1	21127,8	8481,5	8542,6
2	Волинська	7560,1	7844,1	4634,9	4874,4	2925,2	2969,7
3	Дніпропетровська	19521,9	18548,7	15325,4	14481,0	4196,5	4067,7
4	Донецька	5146,7	3893,2	3181,3	2021,9	1965,4	1871,3
5	Житомирська	7491,7	7398,5	583,1	724,2	6908,6	6674,3
6	Закарпатська	3240,7	3047,4	к	58,9	к	2988,5
7	Запорізька	4784,6	5167,5	2527,0	2672,9	2257,6	2494,6
8	Івано-Франківська	4812,7	4225,4	17772,7	11772,8	3040,0	3052,6
9	Київська	28389,2	29508,6	19913,4	21880,0	8475,8	7628,6
10	Кіровоградська	4996,7	4835,0	157,4	28,9	4839,3	4806,1
11	Луганська	996,8	880,9	к	к	к	к
12	Львівська	9114,4	8532,8	3615,7	3220,0	5498,7	5312,8
13	Миколаївська	2554,2	2723,6	739,1	745,2	1815,1	1978,4
14	Одеська	3173,5	4148,4	135,9	176,2	3037,6	3972,2
15	Полтавська	5650,3	5376,3	2692,2	2583,0	2958,1	2793,3
16	Рівненська	7332,4	7372,9	2213,2	2260,9	5119,2	5112,0
17	Сумська	4892,8	4923,8	1259,1	1096,2	3633,7	3827,6
18	Тернопільська	5241,8	4736,1	2043,4	1526,8	3198,4	3209,3
19	Харківська	8081,9	7543,3	3557,5	4125,4	2271,4	2471,6
20	Херсонська	5828,9	65970,0	3557,5	4125,4	2271,4	2471,6
21	Хмельницька	7091,6	6864,9	4519,2	4383,8	2572,4	2481,1
22	Черкаська	26032,7	24363,6	21200,1	19772,7	4832,6	4590,9
23	Чернівецька	3531,2	3132,7	1036,4	625,5	2494,8	2480,2
24	Чернігівська	3619,3	3495,9	240,5	231,6	3378,8	3264,3

**Примітка \*:** к-дані не оприлюднюються з метою забезпечення виконання вимог Закону України «Про державну статистику» щодо конфіденційності

Продукція біотехнологій сьогодні на ринку України представлена як правило іноземними компаніями: США (фірми Enzyme Development Corp., Equichem International Inc., Chr. Hansen, Wright Group The, Aalto Scientific, «Miles Chemical», «Rohm&Haas»), Японії («Amano Enzyme» Co. Ltd., «Meito», «Nagase»), Нідерландах (Clea Technologies B.V., «Gist Brocades»), Франції («Rapidase»), Індії (Advanced enzymes), Китаї («Sekisui Enzymes»), Білорусь («Фермент») [45,46].

В Україні єдиним великим біотехнологічним підприємством залишається Ладижинський завод біо- та ферментних препаратів «Ензим», а також діють кілька дрібних виробників.

Загальною тенденцією для України є те, що сучасні потреби промисловості у ферментних препаратах більш ніж на 90 % задовольняються за рахунок імпорту. На частку українських виробників припадає менше 10 % [47].

Так, як на ринок імпортуються препарати та є певні підприємства, які забезпечують потреби України у сфері птахівництва, можна взяти певий регіон і виробляти продукцію, а саме, ферментні препарати, для нього. Згідно таблиці 3.1, Черкаська область є одним із лідерів птахівництва в Україні.

Отже, можна припустити, що даний регіон може зацікавити пропозиція забезпечення власної потреби ферментного препарату за рахунок впровадження виробництва в їхній області, що дасть їм змогу зменшити витрати на закупівлю та час отримання даних препаратів за кордону.

Продуцент ліпази *Rhizopus japonicus* 1403, активність становить 1350 од/мл. Середня концентрація такого цільового продукту в культуральній рідині становить (Ркр, г/л) від 1 до 2 г/л. Для подальших розрахунків прийmemo 2 г/л [7].

### **3.2 Розрахунок потужності виробництва**

Відомо, що на вирощування затрати комбикормів становлять 4,9-5,1 кг/гол. Ліпази для корму потрібно вводити 200 г (0,0002 т) на 1 тонну [47].

В Черкаській області станом на 2019 р. число птахів було 21200,1 тис. голів у сільськогосподарських підприємствах.

Загальна кількість курей та півнів буде:

$$21200,1 * 91/100 = 19292,1 \text{ тис. голів} = 19\ 292\ 100$$

Загальна кількість корму:

$$19\,292\,100 \cdot 0,005 = 96460,5 \text{ (т)}$$

Загальна кількість ліпази на рік:

$$96460,5 \cdot 0,0002 = 16,4 \text{ (т)}$$

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

Для забезпечення сільськогосподарської птиці в ферментованих кормах в Черкаській області за рік необхідно одержати  $G_{\text{ГП}} = 16,4$  умовних тон ферментного препарату із стандартною активністю  $A_{\text{ст}} = 10\,000$  од.ГЦС/г та вмістом вологи  $W_{\text{в}} = 0,12$  (частка). Дану кількість ферменту потрібно отримати за  $T_{\text{рД}} = 310$  робочих днів, останній весь час, пропонуємо, синтезувати ліпазу для інших потреб даного регіону у тваринництві.

Відомо, що ліпаза з концентрацією в культуральній рідині  $R_{\text{кр}} = 2$  г/л та активністю  $A_{\text{кр}} = 1350$  од.ГЦС/мл утворюється при культивуванні на середовищі наступного складу – соєва макуха 17; олеїнова кислота 3,5; кукурудзяний екстракт 7;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  4 [7].

### **3.4 .Розрахунок кількості виробничих циклів**

3.4.1. Кількість ферменту за добу в умовних кг:

$$G_{\text{ГПД}} = G_{\text{ГП}} / T_{\text{рД}} = 16,4 \cdot 1000 / 310 = 53 \text{ кг/добу.}$$

3.4.2. Кількість ферменту в умовних кг за цикл з врахуванням втрат при його виділенні  $G_{\text{цк}} = G_{\text{ГПД}} \cdot T_{\text{цф}} \cdot (1 - W_{\text{в}}) / 24 \cdot (1 - E_{\text{св}}) = 53 \cdot 70 \cdot (1 - 0,12) / 24 \cdot (1 - 0,2) = 170$  ум.кг/цикл,

де  $T_{\text{цф}}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (60 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год). Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год). Сумарний час складає 70 години.

3.4.3. Кількість одиниць активності ферменту, що знаходяться в умовних кг з врахуванням втрат активності при виділенні за цикл

$$A_{цк} = A_{ст} \cdot 1000 / (1 - E_a) = 10\,000 \cdot 1000 / (1 - 0,18) = 1,2 \cdot 10^7 \text{ од.ГцС}$$

3.4.4. Кількість одиниць активності культуральної рідини в товарних кг за цикл

$$A_{крт} = A_{кр} \cdot 10^3 / P_{кр} \cdot 10^{-3} = 1350 \cdot 10^3 / 2 \cdot 10^{-3} = 6,75 \cdot 10^8 \text{ од.ГцС/цикл}$$

3.4.5 Кількість ферменту в товарних кг за цикл

$$G_{цкт} = A_{цк} \cdot G_{цк} / A_{крт} = 1,2 \cdot 10^7 \cdot 193 / 6,75 \cdot 10^8 = 3 \text{ тов.кг/цикл}$$

3.4.6. Об'єм культуральної рідини, що зливається за цикл, з врахуванням втрат виділення цільового продукту становитиме:

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цкт} \cdot (1 - W_B) / [P_{кр}(1 - E_{св})] = 1,4 \cdot 3 \cdot (1 - 0,12) / [2 \cdot (1 - 0,2)] = 2,3 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

3.4.7. Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{ц} = G_{гп} / G_{цк} \cdot (1 - W_B) = 16,4 \cdot 1000 / 170 \cdot (1 - 0,12) = 109,6$$

Приймаємо 110 циклів

Кількість поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) в ферментері до культивування становить:

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 2,3 / (1 - 0,15) = 2,7 \text{ м}^3.$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{пс} = V_{ф} / (1 + X_{ф}) = 2,7 / (1 + 0,1) = 2,4 \text{ м}^3.$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{пмф} = V_{ф} - V_{пс} = 2,7 - 2,4 = 0,3 \text{ м}^3.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера  $K_z = 0,6$  його геометричний об'єм ферментера складатиме  $V_{гф} = V_{ф} / K_z = 2,7 / 0,6 = 4,5 \text{ м}^3$ .

### 3.5 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу

За виробничий цикл отримують  $V_{кр} = 2,3 \text{ м}^3$  культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.1} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 2,3 / (1 - 0,1) = 2,7 \text{ м}^3,$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{роб.1} = 2,7 \text{ м}^3$ .

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап} = 0,5-0,6$  розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{ф}$ ), що становить  $V_{ф} = V_{роб.1} / K_{зап} = 2.7 / 0,6 = 4.5 \text{ м}^3$ .

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 2.7 / (1 + 0,1) = 2,4 \text{ м}^3,$$

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

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 2.7 - 2.4 = 0.3 \text{ м}^3.$$

Для одержання  $0,3 \text{ м}^3$  інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 0.3 / (1 - 0.1) = 0.33 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 0.33 / (1 + 0.1) = 0.3 \text{ м}^3,$$

де  $X_{па} = 0.1$  – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 0.33 - 0.3 = 0.03 \text{ м}^3 \text{ або } 30 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{роб.2} = 0,33 \text{ м}^3$  можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом  $V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 0,33 / 0,6 = 0,55 \text{ м}^3$ .

Приймаємо ферментер об'ємом  $V_{сф} = 0,63 \text{ м}^3$ , уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.  $K_{з1} = V_{роб.2} / V_{сф} = 0,33 / 0,63 = 0,52$ .

Для одержання 30 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 30/(1-0,10) = 33,3 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{пс3} = V_{роб.3}/(1+X_{ін}) = 33,3/(1+0,1) = 30,3 \text{ л,}$$

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

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 33,3 - 30,3 = 3 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{роб.3} = 33,3$  л можна одержати під час культивування в інокуляторі геометричним об'ємом  $V_{ін3} = V_{роб.3}/K_{зап} = 33,3/0,6 = 55,5$  л. Приймаємо за об'ємом інокулятор  $V_{сф} = 70$  л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.3}/V_{сф} = 33,3/70 = 0,5.$$

Для одержання 3 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.4} = V_{пм3}/(1-E_{ін}) = 3/(1-0,10) = 3,3 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі.

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити:

$$V_{пс4} = V_{роб.4}/(1+X_{ін}) = 3,3/(1+0,1) = 3 \text{ л,}$$

де  $X_{ін} = 0,10$  – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить  $V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 3,3 - 3,0 = 0,3$  л.

Кількість інокуляту  $V_{роб.4} = 3,3$  л можна одержати під час культивування дріжджів в малому інокуляторі геометричним об'ємом  $V_{ін4} = V_{роб.4}/K_{зап}$

=3,3/0,6 =5,5 л. Приймаємо за об'ємом інокулятор  $V_{сф} = 7$  л , уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{з1} = V_{роб.4} / V_{сф} = 3,3 / 7 = 0,5.$$

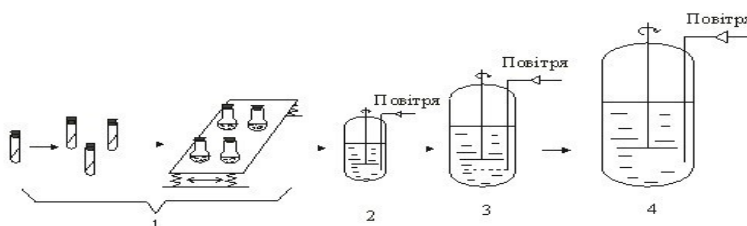
Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора  $V_{пм4} = 0,3$  л можна одержати культивуванням дріжджів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом  $V_{колб} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ .

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 300 / (750 \cdot 0,2) = 2.$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 2 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу ліпази у ферментері об'ємом  $5 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи (рисунок 2.1).



**Рис 3.2** Схема приготування посівного матеріалу *Rhizopus japonicus* 1403

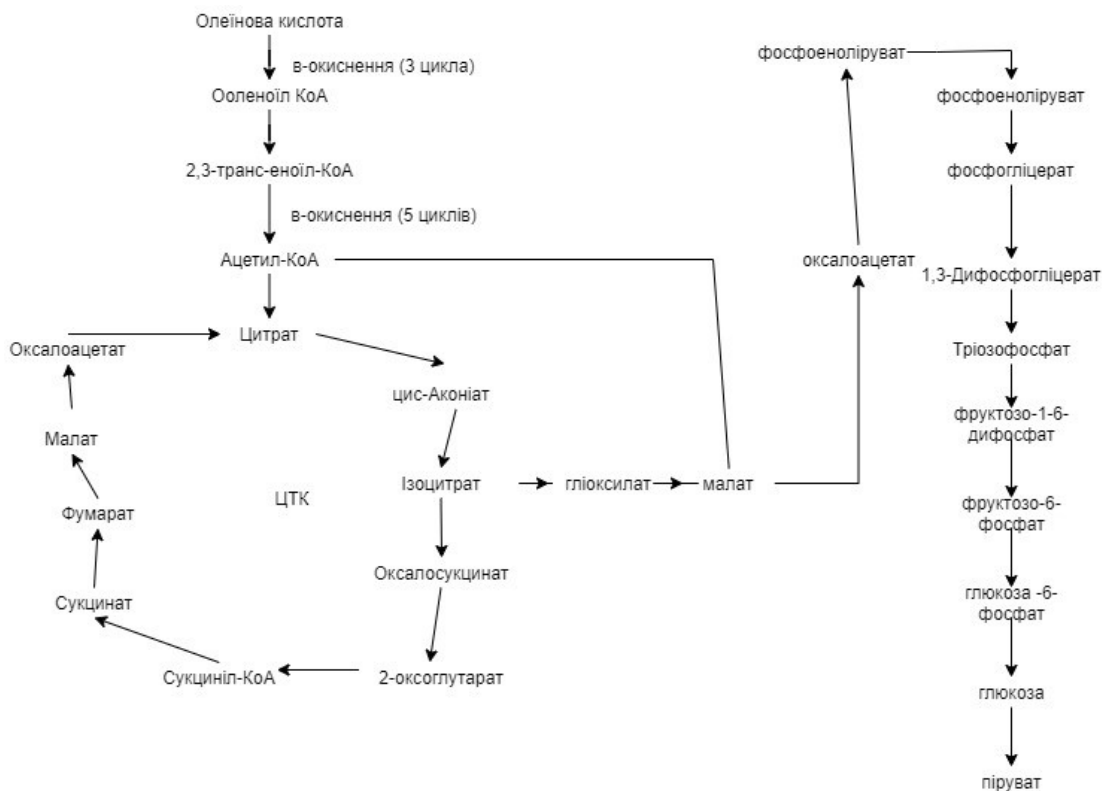
1 – вирощування в лабораторії (на скошеному агаризованому середовищі в пробірках і на рідкому поживному середовищі в колбах на качалці); 2–4 – вирощування в інокуляторах та посівному апараті об'ємом ( $\text{м}^3$ ): 2 – 0,007; 3 – 0,07; 4 – 0,63;

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу ліпази приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом  $5,5 \text{ м}^3$ , один інокулятор об'ємом  $0,63 \text{ м}^3$ , один інокулятор об'ємом 70 л і один інокулятор об'ємом 7 л та 2 качалочні колби.

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

*Rhizopus japonicus* 1403 як джерело вуглецю може використовуватт олеїнову килсоту. Даний субстрат піддається  $\beta$ -окисненню до ацетил-КоА. Цей субстрат мікроорганізм використовує за рахунок глюконеогенезу. Схему метаболізму наведено згідно даних KEGG (рис.4.1).[48] Так як вибраного біологічного агента немає у базі даних KEGG ,ми вибираємо найбільш спорідненого представника згідно даних MucosBank[36]. У *Trichoderma reesei* QM6a функціонує шлях глюконеогензу [49]. Схему метаболізму *Trichoderma reesei* QM6a наведено згідно даних KEGG [50].



**Рис 4.1** Катаболізм ростового субстрату.

<b>НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ</b>				
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Бондарук Д.В.		
Керівник		Сулейко Т.Л.		
Консультант				
Н.Контрр				
Затверд.		Пирог Т.П.		
<b>РОЗДІЛ 4</b>				
<b>Біосинтез цільового продукту</b>				
		Літ.	Арк.	Акрушіє
			34	140 <sup>34</sup>
<b>Кафедра БТМ</b>				

## 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Ліпаза-це фермент, а як відомо ферменти- це білки. Синтез фермента складається з біосинтезу амінокислот – складових білків. Інформація стосовно амінокислотного складу білків з яких складається фермент відсутня, тому в схемі будуть зазначені всі амінокислоти. Під час росту на середовищі, що як субстрат містить олеїнову кислоту , шляхом окиснення утворюється ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК).

Ліпаза – фермент, до складу якого входять 20 амінокислот (рис. 4.2).

Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін, ізолейцин) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК.

Амінокислоти глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін) утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).

Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники ароматичних амінокислот – фосфорибозилпірофосфат (попередник гістидину) і еритрозо-4-фосфат. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники фенілаланіну, тирозину і триптофану.

Гліцерат-3-фосфат є попередником серину, гліцину і цистеїну.

Піруват – попередник аланіну, валіну, лізину і лейцину. Піруват утворюється з фосфоенолпірувату (фермент піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40 ]). З 2-оксоглутарату за допомогою ферменту глутамат-синтази (NADPH) [КФ: 1.4.1.13 ] утворюється амінокислота глутамат, яка під дією ферменту глутамін синтетази [КФ: 6.3.1.2 ] перетворюється на глутамін. Глутамін під дією іншого ферменту (карбамоїл-фосфат-синтази [КФ: 6.3.5.5 ]) перетворюється на карбамоїлфосфат, який перетворюється на цитрулін (орнітин карбамоїлтрансфераза [КФ: 2.1.3.3 ]), який в свою чергу є попередником амінокислоти аргініну (синтаза оксиду азоту [КФ: 1.14.14.47 ]). Іншою амінокислотою, яка починає свій біосинтез з глутамату є пролін.

Глутамат перетворюється на проміжну сполуку 1-Пролін-5-карбоксилат (1-піролін-5-карбоксилатдегідрогеназа [КФ: 1.2.1.88 ]), яка в свою чергу перетворюється на сам пролін під дією ферменту піролін-5-карбоксилатредуктаза [КФ: 1.5.1.2 ]. 3-фосфогліцерат через 3-фосфилпіруват (фермент D-3- фосфогліцератдегідрогеназа [КФ:

1.1.1.95] ) та фосфосерин перетворюється на серин. Серин за допомогою ферменту гліцин гідроксиметилтрансфераза [КФ: 2.1.2.1 ] перетворюється на гліцин. Також серин через O-ацетил-L-серин (фермент серин O-ацетилтрансфераза [КФ: 2.3.1.30 ]) трансформується у цистеїн (фермент цистеїн-синтаза [КФ: 2.5.1.47 ]). Схема катаболізму у цільовий продукт наведена у Додатку А.

## РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

Біотехнологічне виробництво створює певний технологічний процес, який умовно можна розділити на декілька основних блоків, визначити послідовність їх виконання та виявити існуючі між ними зв'язки. Ця послідовність є основою технологічної схеми виробництва і представляє собою блок-схему.

### 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Щоб спланувати всі допоміжні стадії виробництва необхідно врахувати всі особливості культивування продуцента діючої речовини - ліпази *Rhizopus japonicus* 1403. Зважаючи на те, що оптимальними умовами росту є температура 30°C та нейтральне (6,8-7) значення рН, постійна аерація повітря [7], процес культивування повинен проходити в асептичних умовах, щоб звести до мінімуму ризик контамінації сторонньою мікрофлорою, що може негативно вплинути на подальший біосинтез певної цільової продукції.

Отже, на етап вибору миючих засобів прямий вплив мають всі вище перелічені умови та завжди потрібно враховувати всі особливості культивування, щоб як наслідок не відбулася контамінація.

#### 5.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера

Як було вказано на початку, для культивування біологічного агента *Rhizopus japonicus* 1403 оптимальною температурою є 30°C, а значення рН = 6.8-7.0 . Такі умови є сприятливими для розвитку багатьох мезофільних та нейтрофільних мікроорганізмів. Також, середовище для вирощування є складним (містить кукурудзяний екстракт, соєвий жмих) [7], що так само сприяє контамінації. Ці всі фактори зумовлюють культивування в стерильних умовах. Асептичні умови забезпечуються стерилізацією не тільки поживного середовища, але й обладнання і комунікацій, аераційного повітря, піногасників. Для того, щоб не було сторонньої мікробіоти у ферментері створюється надлишковий тиск.

					НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарук Д.В.			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Сулейко Т.Л.					37	147
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Глибинне культивування мікроорганізмів має ряд очевидних переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити важку непродуктивну ручну працю, покращити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва. Глибинне культивування проводять у вертикальних герметичних ємностях різного розміру, що називаються ферментаторами [51,52]. Продукент є аеробом у зв'язку з цим варто використовувати ферментер, оснащений барботером. Аерація 0.7 л/л·хв забезпечить культуру потрібною кількістю кисню. Для підвищення ефективності розподілу використовують мішалки – одну або кілька. Мішалки розбивають великі бульбашки повітря, розносять їх по всьому реактору і збільшують час перебування в культуральному середовищі.

*Rhizopus japonicus* 1403– це міцеліальний гриб, тому правильність вибору ферментеру відіграє важливу роль, адже пошкодження міцелію призводить до зниження синтезу цільового продукту.

Для перемішування обираємо турбінну мішалку. Потужність, що споживається турбінними мішалками, які працюють в апаратах з відбивними перегородками, при турбулентному режимі перемішування практично не залежить від в'язкості середовища. Тому мішалки цього типу можуть застосовуватися для сумішей, в'язкість яких під час перемішування змінюється. Також в середині ферментера має бути встановлена труба з нержавіючої сталі для подачі в неї гострої пари, для стерилізації поживного середовища [53].

Для забезпечення максимального виходу кінцевої продукції необхідно підібрати режим перемішування таким чином, щоб до клітин мікроорганізму надходили, в необхідній кількості, поживні речовини і кисень при збереженні його високої життєздатності. Особливо гостро дане питання постає при глибинному культивуванні міцеліальних грибів, так як підібрати оптимальний режим для їх культивування дуже складно враховуючи їх морфологічну будову, а саме розгалуженість міцелію. Механічне перемішування, за допомогою турбінних мішалок, і безперервна аерація створюють сприятливі умови для доступу поживних речовин і кисню до всіх клітин міцелію, забезпечуючи однаково сприятливі умови для росту і накопичення продуктів метаболізму. В умовах глибинного

культивування і механічного перемішування міцелій фрагментується на відносно невеликі сегменти, які не втрачають здатність до розмноження і накопичення біомаси [54]. В обраному ферментері повинен бути достатній рівень масообміну, що досягається встановленням мішалки та повітря, яке подається через барботер. Основною перевагою механічного перемішування є те, що можна легко змінювати технологічні умови та ефективно доставляти до зростаючих клітин повітря, що визначає характер розвитку мікроорганізмів і їх біосинтетичну активність. Для подачі гарячої/холодної води ферментер має бути оснащений рубашкою, щоб підтримувати необхідну температуру (29-30 °C) культивування [55].

З усього сказаного вище видно, що при культивуванні міцеліальних грибів важливу роль відіграє інтенсивність механічного перемішування та тип мішалки.

Отже, для культивування найефективнішим являється ферментер з турбінними мішалками, оснащений рубашкою, оскільки в ньому легко можна варіювати режими перемішування та масообміну, забезпечується рівномірний розподіл мікроорганізмів та компонентів поживного середовища. Одним із важливих етапів біосинтезу також є підготовка та стерилізація піногасника. В зв'язку з тим, що виробничий процес проходить за постачання кисню - відбувається піноутворення, тому необхідним є застосування піногасника (механічні: жирові і синтетичні; хімічні) Так як, у даному середовищі є олеїнова кислота, яка має властивості піногасника тому не потрібно додатково вводити його [50,54,56].

### **5.1.2. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря**

Так, як *Rhizopus japonicus* 1403 аероб, для синтезу ліпази необхідно підтримувати оптимальний рівень аерації. Важливим є правильна підготовка аераційного повітря (повинно бути стерильним), яке виступає потенційним джерелом забруднення культуральної рідини і відповідно всього виробничого процесу [51].

Оскільки найбільше мікроорганізмів знаходиться над поверхнею землі, то забір повітря будемо здійснювати на висоті приблизно 20-30 м, де їх кількість є сталою. Повітряний компресор засмоктує всередину навколишнє повітря і стискає його для подальшого використання в робочих процесах [57].

Для очистки повітря, використовують методи фільтрування, а систему підготовки повітря конструюють ступінчастою.

На кожному рівні очищення слід передбачити штуцери з метою відбору проб повітря для визначення концентрації механічних часток до та після фільтрації.

Після забору, повітря потрапляє на фільтр грубої очистки, де досягається ступінь його очищення 80 %. Фільтри грубої очистки призначені для затримки великих механічних частинок розміром більше 5 мкм (пух, листя, волосся, цементний пил і т. ін.). Далі повітря вентилятором подається у теплообмінник, де відбувається його кондиціонування (стабілізуються термодинамічні показники).

Фільтри грубої очистки складаються з каркасу з нержавіючої сталі, в який встановлюється фільтруючий матеріал. Продуктивність по повітрю кожного фільтра не більше 1540 м<sup>3</sup>/год.

Пропонуються використовувати ячеюві фільтри грубої очистки (зі ступенем очистки 80%) такі як, ФЯУ, ФЯП, ФЯР, ФЯВ, які відрізняються лише типом фільтруючого матеріалу [58].

Фільтри для тонкого очищення повітря найбільш часто застосовують в якості другого ступеня очищення (доочищення). Рекомендується використання модульного картриджного фільтра. Це ефективний фільтр, який має компактну конструкцію і ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 2040 м<sup>3</sup>/год. Фільтри легкі в обслуговуванні - необхідно тільки спустошувати пилозбірники; в конструкції використовуються екологічно чисті матеріали.

Для остаточної очистки повітря застосовують фільтр типу "Лаік". Такі фільтри складаються з корпусу і фільтрувального матеріалу, який дає змогу уловлювати частинки розміром 0,04-0,06 мкм. Як фільтрувальний матеріал у ньому використовується ультратонке волокно з перхлоровінілової смоли. Цей матеріал гідрофобний, стійкий до хімічно агресивних середовищ і може експлуатуватися при температурі не вище 60 °С і відносній вологості до 100 %. Ступінь очистки 99,999% [59].

Проаналізувавши вище наведені дані, на першій стадії очистки повітря найдоцільніше для нас буде використовувати фільтри грубої очистки з

ефективністю фільтрації 80%. Обираємо фільтр типу ФЯП. На наступній стадії найкраще буде використати фільтри тонкої очистки картриджного типу з ефективністю 99%. Фільтри типу «Лаік» використовують на фінішних стадіях очистки повітря, тобто безпосередньо перед подачею у ферментаційне обладнання.

**Очищення відпрацьованого повітря.** Відпрацьоване повітря через колектори подається на аналогічні головні фільтри для очищення та знешкодження [50,59].

### **5.1.3. Обґрунтування вибору мийних і дезінфікувальних засобів**

Одним із найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти виробництва є санітарна підготовка виробництва. Її метою є зведення до мінімуму ризику механічних і мікробних забруднень. Коли обираємо дезінфекційний засіб, ми повинні перевірити, чи відповідає він вимогам МОЗ. Деззасоби, які відповідають критеріям, внесені до Державного реєстру дезінфекційних засобів на сайті МОЗ [60].

Якісна мийка дозволяє видалити 99% бактерій і забруднень, а подальша дезінфекція дозволяє довести відсоток чистоти підприємства практично до ідеалу.

**Робоча схема очищення:** видалити залишки бруду, застосувати професійні миючі засоби, нейтралізувати їх водою, продезінфікувати очищену поверхню: дати час для роботи дезінфектанта та змити його.

Стіни підлога, вікна, двері, інвентар, тара, обладнання, комунікації потребують миття та дезінфекції. Використання дуже великої кількості миючого засобу дорівнює більш високі виробничі витрати і можливі проблеми зі зливами, адже хімікати повинні бути грамотно нейтралізовані. В таких випадках використання дозуючих систем є гарним рішенням. Якщо потрібно використовувати пінний розчин, необхідно мати якісний піногенератор, але для обладнання не рекомендується використовувати мильні речовини, оскільки їх важко видалити з поверхні апарата і за рахунок цього збільшується тривалість процесу підготовки обладнання. Деякі миючі засоби можна автоматично дозувати і контролювати їх концентрацію за допомогою обладнання.

Миття обладнання та приміщень проводять розчинами миючих засобів. Застосовують як кислі, так і лужні засоби.

Миючі засоби та їх розчини повинні мати високу миючу здатність, забезпечувати повне змочування поверхні, зм'якшувати жорсткість води та зв'язувати іони кальцію.

Миючі розчини не повинні викликати корозію обладнання. Всі ці властивості мають миючі засоби, які складаються із суміші поверхнево-активних речовин та лужних електролітів. В такому складі поверхнево-активні речовини сприяють змочуванню та видаленню забруднень з їх одночасним емульгуванням та диспергуванням, а лужні електроліти посилюють їх дію та забезпечують пом'якчення води, нейтралізацію кислих забруднень (кальцинована сода), омилення жиру (каустична сода), зниження кородуючої дії миючих засобів (силікати натрію).

Для миття обладнання застосовують синтетичні миючі порошки («РИК», «Вітол», «СМЗ-1м»), рідкі миючі засоби («Промо», «Ексан Про», «Лойран-М», а також миючо-чистячі засоби виробництва концерну «Діверсі Левер» (Угорщина, Чехія, Німеччина, Нідерланди, Швеція, Австрія, Великобританія) Divosept S613, Dilac Z, Divbrau, Divo-109, Divo OP) та миючо-дезинфікуючі засоби («Дезмол», «Хлорантоін»), а також інші миючі та миючо-дезинфікуючі засоби як вітчизняного, так і імпортного виробництва, дозволені МОЗ України.

Найбільшу небезпеку з точки зору накопичення мікрофлори становлять трубопроводи, миття та дезинфекція яких ускладнена. Крім того, в кожному окремому випадку необхідно брати до уваги матеріал, з якого виготовлено обладнання, та процеси, які проводяться в даному апараті. Для миття ферментаційного обладнання від залишків поживного середовища, культуральної рідини та інших речовин використовують каустичну або кальциновану соду [61].

**Каустична сода** (їдкий натрій - NaOH) ефективна для миття жирних поверхнь, для миття білкових залишків, залишків солей чи мікроорганізмів, та продуктів їх життєдіяльності. Недоліком є те, що каустична сода є шкідливою для людини (2 клас небезпеки за ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Тому ми не

рекомендуємо використовувати дану речовину для миття обладнання, щоб уникнути нещасних випадків [62].

**Кальцинована сода** має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Вона є більш безпечною для використання (3 клас небезпеки – помірно небезпечна речовина за ГОСТ 12.1.007). Саме тому, ми її обираємо у якості мийного засобу для ферментаційного обладнання. Також, це є більш економічно вигідний варіант [62].

Під час роботи з дезінфікуючими препаратами необхідно суворо дотримуватися застережних заходів, працювати з засобами в спецодязі та індивідуальних засобах захисту (халат, косинка, гумові рукавиці, окуляри, респіратор). Забороняється зберігати дезінфікуючі речовини разом з легкозаймистими речовинами, прати спецодязь в домашніх умовах. Всі особи, допущені до роботи з дезінфікуючими речовинами, обов'язково проходять інструктаж з техніки безпеки. Приготування робочих розчинів цих речовин треба проводити в спеціально відведених для цього приміщеннях у витяжних шафах [63].

Під час мийки ефективно усуваються забруднення і певна частина шкідливих мікроорганізмів. Подальша дезінфекція дозволяє знищити всі наявні патогенні мікроорганізми, а також знизити число інших мікроорганізмів, щоб вони не впливали на безпеку продуктів харчування.

Якість дезінфекції визначається наступними факторами: якість попередньої очистки; концентрація і тип скупчення мікробів; концентрація дезінфеканта; час контакту поверхні з очищує засобом; фактори (хімічні та фізичні) навколишнього середовища: вміст у воді розчинного магнію або кальцію підвищує жорсткість, а також сприяє нейтралізації кошти. Підвищення температури дозволяє прискорити дію розчину; наявність на оброблюваному об'єкті біоплівки

Рекомендується періодично чергувати препарати, щоб не допустити звикання у мікроорганізмів до певних розчинів. Оптимальний спосіб - чергування препаратів

за результатами мікробіологічного вивчення стійкості шкідливих мікроорганізмів до використовуваних дезінфікуючих засобів.

Слід зазначити, що універсального дезінфікуючого засобу немає.

На *рис. 5. 1* показано спектр дії хімічних дезінфікуючих сполук на різноманітні патогени.

**СПЕКТР ДІЇ ХІМІЧНИХ ДЕЗІНФІКУЮЧИХ СПОЛУК**

Хімічні сполуки	Патоген						
	Грам-бактерії	Грам-бактерії	Гриби	Міко-бактерії	Віруси з оболонкою	Віруси без оболонки	Спори
Глютаровий альдегід	+	+	+	+	+	+	+
Глюксаль	+	+	-	±	±	-	-
Спирти	+	+	+	-	-	-	-
Фенольні деривати	+	+	+	+	+	-	-
Четвертинні амонієві сполуки	+	±	±	-	-	-	-
Гуанідини	+	+	±	-	-	-	-
Тензини	+	±	±	-	-	-	-
Перекисні з'єднання	+	+	+	+	+	+	+
Йод	+	+	+	+	+	-	-
Хлор	+	+	+	+	+	+	+
Алкіламіни	+	+	+	+	+	+	-

**Рис.5.1.** Спектр дії хімічних дезінфікуючих сполук [64].

Рекомендовано використання наступних дезінфікуючих засобів:

- для поверхонь, обладнання – засобі на основі четвертинних амонієвих сполук чи хлорвмісні препарати (наприклад, гіпохлорит натрію, натрій дихлорізоціанурат та інші, бажано - таблетовані форми для забезпечення чіткого дозування, наприклад: Віндез ЧАС-АМ, Бланідас 300, Вінхлор (таблетки), Новохлор-екстра, Соліклор, Санітаб, Бланідас Актив, Секусепт Актив, СаніКлос Актив, Медікарін, Скінман Софт, Інцидін Ликвид, Екодес, Інцидін Про та інші);

- антисептики для обробки шкіри рук - спиртовмісні препарати (діючі речовини - ізопропіловий, етиловий спирт чи їх комбінації в концентрації 60-80% по масі);

- дезінфекційні засоби з миючими та дезодоруючими властивостями, наприклад, Полідез, Валеус Д, Санікон, Дезекон ОМ, Санімакс (засоби «Полідез», "Валеус-Д» забезпечує пролонговану знезаражувальну дію).

Рекомендують дезінфікуючий засіб змінювати кожні 10 – 14 днів або застосовувати декілька типів. При виборі дезінфікуючої речовини необхідно враховувати не тільки її бактерицидні та фунгіцидні властивості і спектр дії, але й можливу токсичність для людини. Миючі і дезінфікуючі засоби необхідно контролювати щодо мікробіологічної чистоти. Їх розчини слід тримати в попередньо очищених контейнерах (тарі) й зберігати лише протягом установлених термінів [65].

Персонал. Порівняємо такі дезінфікуючі засоби для персоналу, як «Пьорхенд Ель 85Ц», «АХД 2000 гель», «Стерізол» з етанолом, «Біолонг», які мають широкий спектр дії та відрізняються діючою речовиною. Запропоновані засоби мають різні активно діючі речовини, що запобігає утворенню стійких штамів (див.табл 5.1.).

Табл. 5.1.

#### Порівняльна таблиця дезінфікуючих засобів для персоналу

Назва (виробник)	Діючі речовини мас.,%:	Кількість робочого розчину на одну особу	Вартість 1 л/кг дезінфікуючого засобу, грн.	Посилання
«Пьорхенд Ель 85Ц» "Еколаб ТзОВ", Україна,	Дидецилдиметиламоній хлорид – 0,9%; Хлоргексидину біглюконат – 0,9%	2-3 мл.	233,5	<a href="https://www.galecotrade.com/product/purehand/">https://www.galecotrade.com/product/purehand/</a>
«АХД 2000 гель» ТОВ «Бланіда», Україна,	75,0 - спирт етиловий	3 мл	231	<a href="https://horeca-service.net/product/ahd-2000-gel/">https://horeca-service.net/product/ahd-2000-gel/</a>
«Біолонг» ТОВ "ВП «БІОЛОНГ», Україна	1,0-1,8% - бензалконію хлориду; 0,1 - 0,4% - ноктодецилдиметил (3-триметоксиселіл)пропіл амонію хлорид; 1,1- 2,0% - ізопропілового спирту)	3 мл	198	<a href="https://zakupka.com/p/1100493082-antiseptik-biolong-dlya-ruk-1-l-14289688/">https://zakupka.com/p/1100493082-antiseptik-biolong-dlya-ruk-1-l-14289688/</a>
«Стерізол"» з етанолом (Sterisol Hand Disinfectant Ethanol) Швеція	спирт етиловий - 70,0; спирт ізопропіловий - 10,0; спирт нбутиловий - 1,0	3 мл	400	<a href="https://dezmedtex.com.ua/p1131302806-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-dlya.html">https://dezmedtex.com.ua/p1131302806-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-dlya.html</a>

Вибір робимо на основі економічної доцільності. Згідно даних (див. табл. 1.1.) найдешевшим асептичним засобом є «Біолонг», на його заміну обираємо «АХД 2000 гель». Різні діючі речовини дадуть можливість уникнути резистентних штамів до них [63].

**Поверхні.** Виробництво ліпази здійснюється упродовж 310 днів. Оптимальна площа виробничого приміщення в якому встановлено ферментер (5 м<sup>3</sup>), три інокулятори (0,63 м<sup>3</sup>; 0,07 м<sup>3</sup>, 0,007 м<sup>3</sup>), автоклав та інше обладнання становить 144 м<sup>2</sup> (12×12 м). Висота стін - 2,5 м. Загальна площа стін становить ((12×2,5)+(12×2,5)×2=120 м<sup>2</sup>). Площа підлоги – 144 м<sup>2</sup>.

Враховуючи, що даний проект передбачає проведення процесів у «чистих» приміщеннях, підтримання чистоти ферментаційного обладнання до ферментації, чистоти процесу ферментації та залучення персоналу, що регулярно проходить мед. огляд, миття з використанням дез.засобів здійснюється за наступним графіком:

- Для обладнання, інвентарю та комунікацій після кожного виробничого циклу (110);
- Для підлоги – раз на тиждень (310/7=44);
- Для стін, дверей та вікон – двічі на місяць (310/15=21).

Визначимо площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезінфікувати (табл. 5.2).

*табл. 5.2.*

**Розрахунок площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єму за весь період виробництва**

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість процесів миття та/або дезінфекцій за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )
Обладнання, інвентар, комунікації	15 м <sup>3</sup>	110	1650 м <sup>3</sup>
Зовнішня поверхня обладнання	27	110	2970
Підлога	144	44	6336
Стіни, двері, вікна	120	21	2520

Щоб обрати миючий та дезінфікуючий засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м<sup>2</sup> затрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дез.засобу.

Підготовка виробничих приміщень включає в себе ряд заходів: вологе прибирання, дезінфекцію і ультрафіолетове опромінення підлоговими та настінними світильниками стін, підлог, стель, поверхні обладнання та комунікацій з метою забезпечення чистоти.

Вартість концентратів мийних та дезінфікувальних засобів та їх витрати при виробництві наведено в табл. 5.3.

Проаналізувавши дані табл. 5.3., робимо висновок:

- для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати мийний засіб Біомой;

- для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей –Тетрамін, Естер Дез.

Прибирання підлоги, зовнішньої поверхні обладнання і трубопроводів виконують використовуючи розчини антисептиків та детергентів. При появі дріжджової інфекції один раз на добу все робоче приміщення обробляють 0,3- % розчином Біомою. Цим же розчином протирають зовні апаратуру і комунікації; змочують килимки при вході у всі приміщення. Окрім боротьби із сторонньою мікрофлорою, в цеху ферментації проводять профілактичні заходи. Періодично, не рідше за один раз в тиждень, підлоги, стіни, а також поверхню апаратів, збірок, трубопроводів миють розчином Тетраміну та Естер Дез.

## Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва ліпази

Назва мийного/дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Вартість 1 л або кг, грн.	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Витрата на 1 м <sup>2</sup> поверхні, л*	Загальна площа миття, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Дезанол оксо <sup>1</sup>	Стіни, підлога, поверхні, обладнання, інвентар, комунікації	170	0,5	0,85	0,2	13476	2290.92
Тетрамін <sup>2</sup>		240	0,1	0,24	0,1		323.43
ЕСТЕР ДЕЗ <sup>3</sup>		150	0,5	0,75	0,1		1010.7
Біомой <sup>4</sup>		65	0,3	0,20	0,3		808.56
Міродез універ <sup>5</sup>		280	0,5	1,4	0,2		3773.28
Мікробак® форте <sup>6</sup>		680	0,25	1,7	0,2		4581.84

\* – Витрати робочих розчинів для дезінфекції наведені згідно з інструкціями до застосування

Примітка: 1- <http://med-birga.com.ua/dlya-poverkhnostej/1302-dezanol-okso-dezinficiruyusshee-sredstvo.html>; 2- <http://www.disinfector.com.ua/>; 3- <https://egh-ingredients.com/news/zasib-dezinfikuyuchiy-ester-de/> 4-<http://www.farmakos.ua/> 5- [http://www.xn--80aaolbmrsqje.com.ua/ua/catalog\\_item?attr\\_id=19305](http://www.xn--80aaolbmrsqje.com.ua/ua/catalog_item?attr_id=19305) 6- <https://rozetka.com.ua/ua/77162250/p77162250/>

**Тетрамін** – засіб призначений для дезінфекції та миття поверхонь в приміщеннях, жорстких меблів, предметів обстановки, поверхонь апаратів, приладів, санітарно-технічного обладнання, білизни, посуду (у тому числі лабораторної), при проведенні поточної, заключної та профілактичної дезінфекції та ін. Засіб має антимікробну активність відносно грамнегативних і грампозитивних (включаючи мікобактерії туберкульозу) мікроорганізмів, вірусів (включаючи аденовіруси, віруси грипу, парагрипу та ін. Збудників гострих респіраторних інфекцій, вірусів, грибів роду *Candida*, цвілевих грибів, збудників внутрішньолікарняних інфекцій, анаеробної інфекції. Засіб має хороші миючі та дезодоруючі властивості, не псує оброблювані об'єкти, не знебарвлює тканини, не фіксує органічні забруднення, не викликає корозії металів. Зберігає свої властивості після замерзання і подальшого відтаювання.

Засіб являє собою прозору рідину від безбарвного до жовтого кольору, допускається наявність незначного осаду, з характерним запахом.

Термін зберігання: 5 років, робочих розчинів - 28 діб за умови їх зберігання в закритих ємностях[66].

**Біомой** – багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом. Дезінфектант застосовують в лікувально-профілактичних, навчально-виховних, ветеринарних установах. На підприємствах усіх видів і форм власності де необхідна дезінфекція згідно санітарно-гігієнічним вимогам, таких як підприємствах громадського харчування, переробних, сільськогосподарських, транспортних, торгових та підприємствах комунально-побутового обслуговування населення.

Препарат являє собою порошок, світлих тонів. Добре розчиняється у воді, робочі розчини Біомою безбарвні, не ушкоджують оброблювані вироби і володіють вираженими емульгуючими і миючими властивостями, легко видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблених поверхнях. Не сумісний з катіонами поверхнево-активних речовин.

Термін зберігання: 1 рік з дати виготовлення[67].

Дезінфікуючий засіб «ЕСТЕР ДЕЗ» (на основі надощтової кіслоти НОК) використовують для проведення низькотемпературної дезінфекції заздалегідь вимитого технологічного устаткування, трубопроводів, установок ультрафільтрації, оборотних полікарбонатних бутлів та поліефірних (ПЕТФ, ПЕН) пляшок, інвентарю, тари методом циркуляції, зрошування, занурення; в закритих автоматизованих системах миття (CIP-миття). «ЕСТЕР ДЕЗ» володіє високою бактерицидною, фунгіцидною, спороцидною дією. Ефективно діє проти мікроорганізмів і вірусів при низьких температурах і нетривалому часі впливу (15-30 хв.). Володіє сильною бактерицидною активністю по відношенню до спороутворюючих бактерій, кишкової палички, дріжджів в 0,015-0,1% концентрації по НОК. Резистентність мікроорганізмів до дезінфікуючого засобу відсутня. Дезінфікуючий засіб «ЕСТЕР ДЕЗ» екологічно безпечний, після застосування розкладається на кисень, воду та оцтову кислоту. Робочі водні розчини засобу прозорі, безбарвні, мають помірний запах оцтової кислоти.

Термін зберігання: 3 роки з дати виготовлення, робочих розчинів - 30 діб за умови їх зберігання в закритих ємностях [68].

Під час вологого прибирання та дезінфекції, а також протягом усього робочого дня повинна працювати припливно-витяжна вентиляція (система кондиціонування) стерильного повітря.

Чистота повітря в приміщеннях повинна відповідати встановленим нормам, отже обираємо періодичність включення стельових бактерицидних ламп - 1 година після кожного генерального прибирання та 0,5 години кожного робочого дня (під час обідньої перерви) [65].

**Орієнтовний розрахунок потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання тощо на період виробництва ліпази 310 днів.**

№	Назва миючого/ дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість процесів миття та/або дезінфекцій за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Витрата на (1 м <sup>3</sup> ) 1 м <sup>2</sup> поверхні, л (мл)	Загальні витрати на миття, (л)
1	Біомой	обладнання, інвентарю, комунікацій, тари	0,3	15 м <sup>3</sup>	110	1650 м <sup>3</sup>	0,3	495
2	Естер Дез	стін, підлоги, вікон та дверей	0,5	264	65	8856	0,1	885.6
3	Тетрамін	стін, підлоги, вікон та дверей	0,1	264	65	8856	0,1	885.6
4	«Біолонг	Шкіра рук персоналу	0,1-0,3	-	*/на одну особу	-	3 мл/на одну особу	* мл/на одну особу
5	"АХД 2000 гель (АНД 2000 gel)"	Шкіра рук персоналу	75	-	*/на одну особу	-	3 мл/на одну особу	* мл/на одну особу

**Примітка:** \* кількість витрачено дез.засобу для персоналу залежить від кількості робітників і змін на підприємстві.

### **5.1.4 Обґрунтування приготування та стерилізація компонентів поживного середовища для культивування**

Для виробничого біосинтезу ліпази використовується середовище із наступним складом (г/л):

- Соева макуха - 17;
- Олеїнова кислота - 3,5;
- Кукурудзяний екстракт - 7;
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  - 4 [7].

Для забезпечення ефективного процесу підготовки поживних середовищ для посівних апаратів об'ємом ,7 л 70 та 630 л та виробничого ферментера 5 м<sup>3</sup> солі стерилізують окремо, також для підтримання рівня рН в межах норми (6.8-7.0) до додається 25% розчин аміачної води та 6% соляної кислоти.

### **5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту**

Ліпаза є екзометаболітом, тобто накопичується в основному позаклітиною, тому для того щоб отримати фермент нам не потрібно додаткових стадій, щоб руйнувати клітину.

При виборі методу виділення та очистки необхідно враховувати наступні фактори:

1. Фізико-хімічні властивості культуральної рідини;
2. Властивості продукту (термолабільність)
3. Вимоги до кінцевої форми продукту (ступінь чистоти).

Принципову схему виділення й очищення ферментів із глибинних і поверхневих культур мікроорганізмів можна представити у вигляді наступної схеми на *рис.5.2*



**Рис.5.2** Схема виділення та очищення ферментних препаратів [69].

Зі схеми можна зробити висновок, що екстракт із поверхневої культури або фільтрат культуральної рідини є вихідним матеріалом для одержання препаратів різного ступеня очищення.

На першому етапі виділення відходом процесу є нерозчинна частина культури - біошрот, що містить нерозчинні включення середовища й біомасу продуцента, який можна використати далі на корм для тварин, адже має безліч корисних сполук. Далі залежно від властивостей виділюваної речовини й супутнього йому баласту схема очищення й одержання препарату може включати різні прийоми й методи, такі, як концентрування, діаліз, осадження органічними розчинниками, солями, гель-фільтрування, афінна хроматографія, іммобілізація, сушіння термолабільних матеріалів і т.д.

У тваринництві основними концентрованими кормами є ячмінь, овес, жито, непродовольча пшениця і продукти їх переробки. Потенціал цих кормів при годівлі тварин із однокамерним шлунком не повною мірою використовується організмом через значний вміст клітковини. Низька перетравність зернових зумовлена тим, що окрім клітковини в них у значних кількостях містяться інші некрохмалисті полісахариди зокрема  $\beta$ -глюкани і пентозани. Проте в тварин, особливо моногастричних, не виробляються власні ферменти, які могли б розщеплювати некрохмалисті полісахариди, через що вони майже не засвоюються організмом, при цьому некрохмалисті полісахариди перешкоджають доступу власних ферментів

організму до інших поживних речовин та знижують їх перетравність. Підвищення перетравності поживних речовин дало б можливість отримати додаткову продукцію за тих самих витрат кормів.

Сухі ферментні препарати, на відміну від рідких концентрованих форм, можна вводити в премікси, білково-вітамінно-мінеральні добавки, а у разі їх термостабільності – в розсипні комбікорми перед гранулювання [70].

В промисловості високий ступінь очищення не завжди потрібен. Очистка повинна бути високою, якщо ферменти використовуються як терапевтичні препарати.

Тому для подальшого виготовлення ми будемо робити ферментні препарати з індексом ГЗх, адже для ферментних препаратів, які будуть застосовуватися в якості кормової добавки не потрібен високий ступінь очищення.

Отримання препаратів ліпаз та їх очищення проводять на основі фільтратів культуральної рідини. Біомаса продуцента і тверда суспензія середовища відокремлюються центрифугуванням, фільтруванням або сепаруванням. Наступний етап — концентрування ферментних розчинів, наприклад ультрафільтрацією або вакуум-випарюванням. Отриманий концентрат може безпосередньо висушуватися для отримання технічних препаратів з індексом ГЗх. Рідкі напівпродукти найчастіше висушують у розпилювальних сушарках. Після сушіння препарат повинен містити не більше 6—8 % вологи, тоді строк його зберігання в герметичній упаковці — до року практично без втрати активності. Висушений препарат стандартизують за активністю і фасують [69].

### **5.2.1 Виділення біомаси від культуральної рідини**

Культуральна рідина після біосинтезу містить, окрім ліпази, біомасу продуцента і продукти його життєдіяльності. Тому першою стадією для виділення цільового продукту є відділення біомаси продуцента.

Оскільки біологічний агент *Rhizopus japonicus* 1403 є міцеліальним грибом, потрібно вибрати один із способів, який буде кращим для міцеліальних грибів. В літературних даних представлено декілька способів відділення: фільтрування, сепарування, центрифугування [71,72]. Потрібно врахувати, що необхідно відділити біомасу саме міцеліальних грибів від культуральної рідини.

Для розділення компонентів культуральної рідини для одержання ферменту можна застосовувати метод осадження. До найважливіших технічних способів осадження належать:

- Відстоювання;
- Осадження під дією центробіжної сили.

Метод відстоювання не практичний, він досить тривалий та малоефективний/не продуктивний. Оптимальним є метод осаджувального центрифугування [73].

### **Осадження під дією центробіжної сили .**

**Центрифугування.** Відділення біомаси на звичайних центрифугах ускладнене, оскільки для перероблення рідин на центрифугах потрібно, щоб концентрація дисперсної фази була не менше ніж 5 % (для центрифуг періодичної дії) або 10 % (для центрифуг безперервної дії), а вміст біомаси в КР не перевищує, як правило, 1...4%. У порівнянні з іншими методами відділення має такі переваги:

- ✓ швидке відокремлення біомаси;
- ✓ здійснюється максимальне відділення культуральної рідини від біомаси та залишків компонентів поживного середовища;
- ✓ висока продуктивність;
- ✓ відносно низька тривалість процесу [73].

Даний метод потребує більш дорогого устаткування, ніж фільтрування.

**Фільтрація.** Метод затримання завислих часток сітчастим або пористим матеріалом. Зазвичай при фільтрації мікроорганізмів використовують фільтри, розмір пор яких більше розміру мікроорганізмів [74].

### **Перевагами методу фільтрації є:**

- ✓ Менші енергозатрати;
- ✓ Простота та зручність методу;
- ✓ Селективність.

Проте наявні такі істотні недоліки, зокрема:

- Відбувається прилипання клітин до фільтра та утворений шар знижує швидкість потоку рідини при процесі фільтрування;

- фільтрація займає велику кількість часу та є енергоємним процесом;
- потрібно регулярно заміна фільтруючих перегородок.

При фільтрації культуральної рідини питомий опір драглистого осаду, що утворюється у процесі є великим. Навіть тонкий шар осаду, що залишається після зрізання ножем, може призвести до різкого зниження швидкості процесу фільтрації [72].

Автоматичні фільтр-преси ФПАКМ цілком відповідають GMP. Робоча поверхня типових фільтр-пресів: 25- 800 м<sup>2</sup>; тобто, вони призначені для високопродуктивних процесів. Фільтр споряджений маслонасосною станцією, пультом керування, водонасосною станцією, насосами для відведення фільтрату та промивної рідини, які на схемах не показано.

Недоліки фільтр-преса в значній мірі усунені в конструкції з горизонтальними камерами типу ФПАКМ (рис. 5.3). Він складається з ряду розташованих одна над іншою горизонтальних фільтрувальних плит, між якими натягнута фільтрувальна тканина. Фільтрувальні плити розміщені між верхньою і нижньою підтримують плитами, а фільтрувальна тканина натягнута на напрямні ролики. Цикл роботи фільтр-преса складається з стиснення плит, фільтрування, промивання і зневоднення осаду, розсовування плит і розвантаження осаду одночасно з переміщенням тканини і її промиванням. Робота фільтр-преса ФПАКМ повністю автоматизована. Ці фільтри мають розвинену систему фільтрів поверхню (на 8 м<sup>2</sup> площі, займаної установкою, доводиться до 25 м<sup>2</sup> поверхні, що фільтрує); осад віджимається під тиском 0,8-1,5 МПа і має вологість не більше 60-70%; порівняно невеликі енерговитрати (0,8-1 кВт-ч на 1 м<sup>2</sup> поверхні, що фільтрує); питома продуктивність його в 6-8 разів вище, ніж у інших фільтр-пресів [втрати активності не перевищують 4-5%]. Установки ФПАКМ випускаються з площею поверхні, що фільтрує від 2,5 до 50 м<sup>2</sup>. Їх застосування для очищення ферментних розчинів дуже перспективно [75].

На рис. 5.3 наведено схему роботи, загальний вигляд цього фільтра, умовне графічне позначення на апаратурній схемі.



**Випарювання** – це процес концентрування рідких розчинів за допомогою часткового видалення розчинника під час кипіння даної рідини.

Випарювання під вакуумом має багато переваг порівняно із випарюванням за атмосферного тиску. При використанні вакуумного способу знижується температура кипіння розчину, що дозволяє ефективно проводити видалення вологи з розчинів термолабільних речовин.

Вакуум-випарювання також застосовується як один з етапів отримання сухих технічних ферментних препаратів. Ферменти дуже чутливі до температури випарювання, тому основною умовою концентрування ферментних розчинів є короткочасне ведення процесу при низьких температурах кипіння, щоб випарюють рідина не нагрівалася вище певної критичної для даного ферменту температури, тобто щоб не спостерігалось інактивації ферменту. Також слід враховувати, що чим чистіше розчин, чим менше він містить супутніх речовин, тим ферменти більш чутливі до впливу високих температур. Сумарні втрати активності при вакуум-випарюванні в значною мірою залежать не тільки від режиму концентрування, а й конструкції апарату [69].

Незважаючи на наявність високопродуктивних вакуум-випарних апаратів повністю усунути недоліки методу вакуум-випарювання НЕ вдається (втрати активності, випадання опадів і т. д.), і тому цей метод все більше замінюється методом ультрафільтрації [69].

**Ультрафільтрація** досить широко застосовується для концентрування цільових препаратів [77].

Ультрафільтрація за допомогою спеціальних синтетичних напівпроникних мембран, що мають пори відомого розміру, є одним з методів, найбільш сприятливих по відношенню до виділених ферментів. Крім того, вона відрізняється швидкістю і ефективністю. При ультрафільтрації молекули меншого, ніж діаметр пор "продавлюються" через мембрану під дією різниці гідростатичних тисків. Різниця тисків по обидві сторони мембрани створюється або шляхом підвищення тиску з боку фільтрувального розчину, або зниженням тиску в ультрафільтраті [78].

**Переваги** даного методу є те що, проводиться в "м'яких" умовах, що забезпечують менший відсоток зниження активності ферменту (на відміну від вакуум-упарювання, де необхідне нагрівання розчину). Крім того, здійснюється очищення від баластних низькомолекулярних домішок і збільшення активності ферменту в 100–150 разів.

**Недоліком** методу ультрафільтрації слід вважати забивання пор мембрани осадами або адсорбованими молекулами, що призводить до зниження продуктивності мембранного апарату в часі. Останнє вимагає періодичного проведення промивки матеріалу мембрани. Для запобігання забивання пор мембрани осадами передбачено використовувати циркуляційний насос, що забезпечує лінійну швидкість потоку рідини через мембрану близько 2–5 м/с. При таких швидкостях спостерігається значний гідравлічний опір. Для його зниження на практиці застосовують дві конструкції мембранних апаратів: трубчасті мембранні апарати і проточні з плоскими мембранними елементами, що встановлюються паралельно основному потоку [69, 78]. При ультрафільтрації фільтрат розділяється на високомолекулярний і низькомолекулярний (пермеатр) розчин. Етапом ультрафільтрації є фільтрація на фільтрах із діаметром пор 32 кДа, оскільки встановлено згідно даної літератури [69,79], що молекулярна маса ліпази, синтезованого грибом становить 32 кДа. Даний процес забезпечить одержання концентрату ліпази та додаткового очищення від домішок.

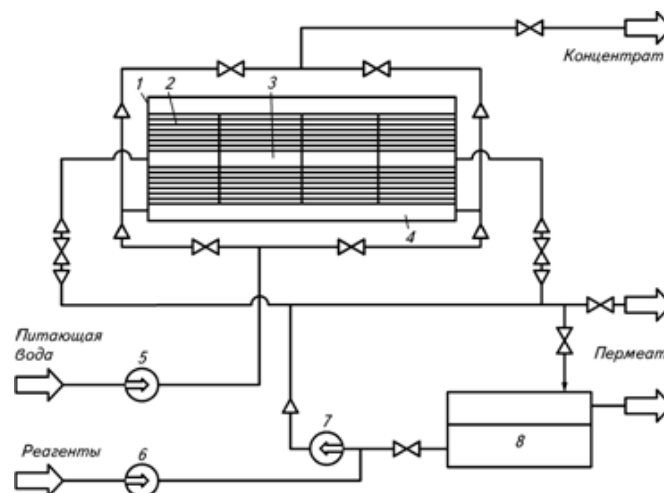
**Підбір мембрани:** Підбір мембрани у роботі [79] було проведено за такими специфічними ознаками, як проникність і селективність, що характеризує швидкість процесу і ступінь затримування концентрованих речовин. У проведених дослідженнях Янишевої Н.В. [79] було визначено, що для ультрафільтрації фільтрату культуральної рідини може бути використана ацетатцелюлозна мембрана УАМ-30. Так як в основному фермент утримувався мембраною, але незначна активність була виявлена і в фільтраті - втрати її склали 1,3%

Отже, на даному етапі ми будемо проводити концентрування за допомогою ультрафільтрації з типом мембрани УАМ-30 ( ультрафільтраційна ацетатцелюлозна

мембрана). Далі наведено принцип роботи даної установки, її зовнішній вигляд і позначення на апаратурній схемі (рис. 5.4 - 1.6).

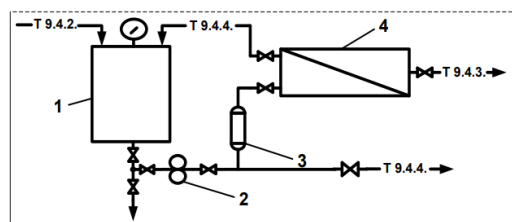


**Рис 5.4.** Промислова ультрафільтраційна установка ECOSOFT UF-30



**Рис.5.5.** Схема фільтраційної установки

1 - напірний корпус; 2 - мембранний елемент; 3 - центральна труба - канал пермеату; 4 - канал вихідної суспензії і відведення концентрату під час зворотнього промивання; 5-7 - насоси; 8 - бак зворотнього промивання.



Умовне позначення	Графічне	Найменування середовища в трубопроводі
Літерне		
T 9.4.2.	→ T 9.4.2. →	Нативний розчин
T 9.4.3.	→ T 9.4.3. →	Пермеат
T 9.4.4.	→ T 9.4.4. →	Концентрат

Поз. УФ 25

**Рис. 5.6** Умовне позначення на апаратурній схемі ультрафільтраційної установки  
УФ 25:

1 – збірник нативного розчину; 2 – насос; 3 – попередній фільтр; 4 –  
ультрафільтраційний модуль.

### 5.2.3 Обґрунтування способу сушіння

Наступним етапом є те що, з отриманого концентрату може безпосередньо висушуватися для отримання технічних препаратів з індексом ГЗх. Після процесу концентрування, ліпазі потрібно надати товарну форму, адже продукт повинен бути сухим. Сушіння ферментних препаратів має на меті отримання стабільний при зберіганні ферментний препарат із концентрата. При висушуванні ферментних препаратів є багато труднощів пов'язаних з термолабільністю ферментів.

Сушіння ферментів може здійснюватися у розпилюючих, сублімаційних сушарках та у вакуумних сушарках [69].

**Сублімаційне сушіння** - це перехід твердої речовини за допомогою нагріванні у газоподібний стан, оминаючи стадію рідини. Проведення сублімаційного сушіння під вакуумом дає змогу знизити температуру процесу.

Сублімаційне висушування відбувається в субліматорі у три фази: самозаморожування, сублімація і видалення залишкової вологи випарюванням. Висушений осад розтирається в порошок у кульових млинах, молоткових дробарках або дисмембраторах

Переваги цього типу сушіння:

- ✓ волога видаляється поступово при низьких температурах, що майже повністю виключає термоіннактивацію продукту;
- ✓ зберігається стабільна структура матеріалу.

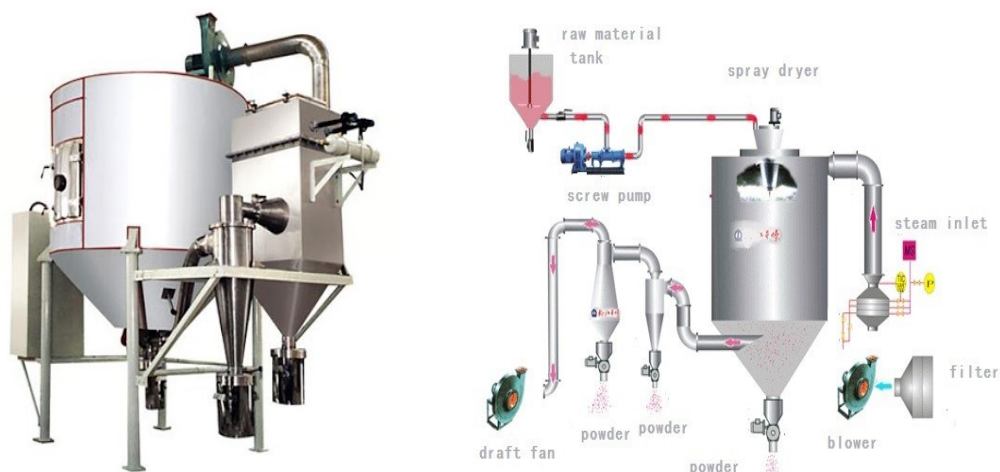
Проте даний тип досить тривалий в часі та потребує високих енергозатрат, а також є достатньо високовартісним та після сушіння необхідне подрібнення висушеного продукту, що також є не рентабельно [81].

Але два попередні методи більш доцільно використовувати коли у нас цільовий продукт знаходиться в осаді. У даному випадку, так як продукт знаходиться в концентраті найдоцільніше використовувати розпилювальну сушарку.

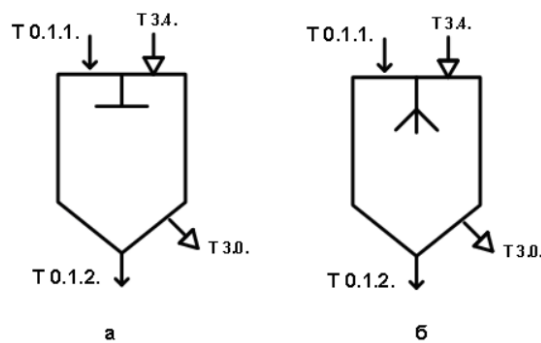
При висушуванні методом розпилення на сушку можна направляти безпосередньо культуральну рідину, екстракт з поверхневою культурою або їх концентрати. Майже повністю зберігається активність препарату при висушуванні концентратів культуральної рідини [69].

**Розпилювальна сушарка** є більш ефективною та легкою в обслуговуванні, вона використовується для сушіння розчинів. У даній сушарці розчин висушуваного матеріалу безперервно подається зверху на відцентровий механізм та поступово розпилюється на частинки розміром 60—70 мкм. Теплоносій поступає знизу через направляючу насадку конічної форми із тангенціальними щілинами, та забезпечує високу швидкість руху теплоносія. Завдяки високим швидкостям руху частинок суспензії, великій поверхні контакту та сушильного агента процес висушування продукту відбувається швидко.

Тривалість процесу розпилювальної сушки дуже мала, перебування препарату у сушарці обмежується лише 20-30 с. При взаємодії маси із теплоносієм волога майже миттєво випаровується, частинки охолоджуються та тому, незважаючи на досить високі температури теплоносія на виході та вході, препарат не нагрівається більше температури 35-45 °С. У розпилювальній сушарці ферментний осад висушують за температури теплоносія на вході в сушарку 130-135 °С і на виході 60—75 °С. Режими сушіння забезпечують досягнення 8-12 % вологості матеріалу. На цій стадії втрати матеріалу становлять 5—10 %. Нижче наведено принцип роботи, апаратурна схема і зовнішній вигляд даної установки (рис 5.7 та рис 5.8).



**Рис. 5.7.** Конструктивна схема та зовнішній вигляд розпилювальної сушарки



Умовне позначення		Найменування середовища в трубопроводі
Літерне	Графічне	
T 3.0.		Повітря відпрацьоване
T 3.4.		Повітря гаряче
T 0.1.1.		Вологий продукт
T 0.1.2.		Сухий продукт

**Рис. 5.8.** Умовне позначення на апаратурній схемі розпилювальної сушарки:

а – з відцентровим розпилюванням; б – з форсунковим розпилюванням

Розпилювальна сушильна установка складається з фільтра для очищення повітря, що поступає від механічних забруднень, відцентрового вентилятора середнього тиску, парових калориферів, сушильної камери, розпилювального пристрою, скребоків механізму, транспортера (або шнека) для видалення сухого продукту, циклону, відцентрового вентилятора для видалення відпрацьованого повітря [82].

**Підготовка повітря:** Повітря перед надходженням у всмоктувальний отвір відцентрового вентилятора проходить через масляні фільтри. Вони складаються з окремих висунутих секцій, що включають лабіринтоподібних металеві пластини. Повітря, проходячи через ці канали, неодноразово змінює швидкість і напрямок, і частинки пилу, стикаючись з покритими стінками та осідають на них.

Очищене повітря подається вентилятором в підігрівач, а звідти в сушильну камеру. Як підігрівачів повітря застосовують парові(водяні) калорифери різної конструкції: пластинчасті ребристі із сталевих труб з привареними прямокутними пластинами, шайбовая з привареними до труб шайбами або з навитої на трубах металевую стрічкою. У калорифери пар подають під тиском 0,8-1,6 МПа [82].

**Принцип роботи:** Очищене і нагріте повітря надходить в пристрій подачі, розташоване у верхній частині апарату, звідти подається в камеру, формуючи в ній обертальний повітряний потік.

Сировина надходить в камеру за допомогою механічних форсунок, в які продукт підводиться під сильним тиском, або за допомогою відцентрових дисків і пневматичних форсунок, в яких розпилення здійснюється за рахунок струменя повітря. Так як речовина спочатку займає велику площу, процес зневоднення проходить дуже швидко (кілька секунд). Під дією сили тяжіння частина вже сухого продукту опускається на дно камери і виводиться з її нижньої частини. Інша частина зневодненого речовини потоком повітря транспортується в циклонний роздільник, звідки здійснюється його вивантаження. Вихідні гази після видалення найдрібніших частинок виводяться з установки [82].

Тому, проаналізувавши вище наведений матеріал можна зробити висновок на рахунок вибору способу сушіння. Концентрат даного ферменту, доцільно сушити за допомогою розпилюючої сушарки, що дозволить більш швидко здійснити процес без додаткових стадій подрібнення препарату.

#### **5.2.4. СТАНДАРТИЗАЦІЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ**

Стандартизація і стабілізація ферментних препаратів мають велике значення в процесах їхнього виробництва, зберігання і використання. Активність у готовому сухому препараті ліпази повинна становити 10 000 од/г [83].

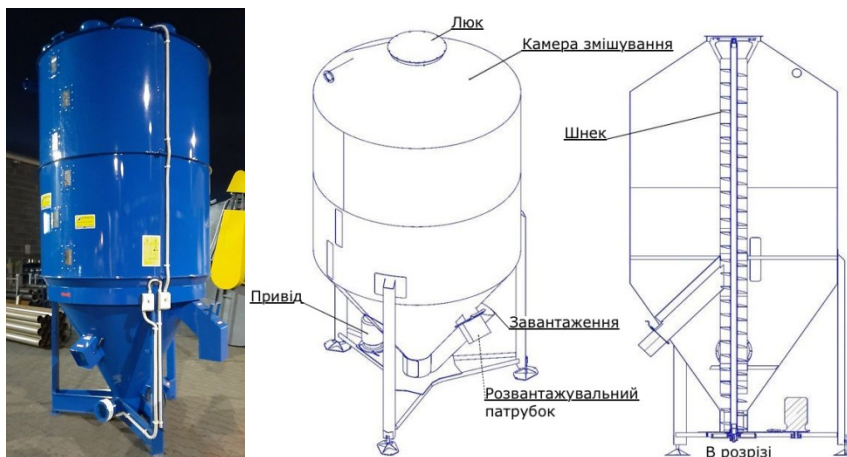
Стандартизація ферментного препарату – доведення активності ферменту до стандартів, відповідно вимогам ДСТУ, ТУ. Для цього використовують різні нейтральні наповнювачі – крохмаль, лактоза, хлористий натрій, крохмаль, бентонітом кальцію. Важливо, щоб наповнювач був стосовно ферменту стабілізатором, а не просто інертною речовиною. Необхідно також враховувати здатність наповнювача до сорбції водних парів. При змішуванні готового сухого препарату з наповнювачем необхідно, щоб вони мали однаковий ступінь подрібнення і вологість не більше 10 – 12% [84].

**Крохмаль та лактоза** запобігають зволоженню ферментного препарату, а **хлориди калію і натрію** сприяють зволоженню, тому у разі їх використання необхідна герметична упаковка ферментного препарату [69].

**Бентоніт кальцію** є універсальним засобом для нормалізації кальцієвого обміну у сільськогосподарських тварин і птиці всіх виді та застосування бентоніту допомагало покращити несучість яєць для курей. дозволяє зберігати його без втрат активності до двох років. [85].

Так, як даний препарат іде для покращення корму для курей потрібно вибрати наповнювач, який буде додатково покращувати властивість кормів, тому вибираємо бентоніт кальцію.

Для стандартизації потрібен бункер для змішування сухого ферментного препарату та наповнювача. Нижче наведено схема і зовнішній вигляд бункера-змішувача (рис. 5.9).



**Рис.5. 9.** Зовнішній вигляд та схема бункера-змішувача.

### **5.2.5. ПАКУВАННЯ ТА МАРКУВАННЯ**

Останнім етапом виробництва є пакування та маркування вже готового препарату. Даний препарат іде на використання для сільськогосподарських потреб. А саме, як добавка для підвищення засвоєння кормів. Так як відомо, що на 1 т корму потрібно 150-200 грам стандартизованого ферментного препарату. Можна фасувати препарат по 5 чи на 10 кг, так як ми будемо даний продукт збувати для підприємства з великою кількістю поголів'я птиці та використовує досить велику кількість корму [84].

Так, як готовий препарат є ферментним і нам важливо зберегти його активність протягом певного часу зберігання без втрат і запобігти утворенню додаткової вологи і різких змін температури, що будуть негативно впливати на препарат. Потрібно вибирати пакувальну тару звертаючи на такі нюанси: вплив зовнішнього середовища, зручність транспортування і зберігання.

Правильне пакування товару багато в чому визначає його збереження і цілісність при зберіганні і транспортуванні, а також зручність використання кінцевим споживачем. Перед пакуванням товару в картонну тару використовують мішок вкладиш поліетиленовий. Поліетиленовий мішок вкладиш служить первинною пакувальною тарою для різних товарів і захищає вміст від впливу зовнішнього середовища. Це обумовлено тим, що крафт-папір має хороші теплоізоляційні властивості, а поліетиленовий вкладиш забезпечує герметичність і вологонепроникність для продукції. Тип поліетиленового вкладиша і крафт-паперу, а також, кількість шарів паперу вибираються виходячи з властивостей продукції, що буде упакуватися [87].

### **Характеристики та переваги паперових мішків з поліетиленовим вкладишем.**

Паперові мішки є міцною, надійною, зручною упаковкою з необмеженими можливостями. При виготовленні паперових мішків використовується крафт-папір високої якості. Існують двох, трьох, чотирьохшарові паперові мішки є достатньо міцні і мають низьку ціну. Для додаткової ізоляції продукту мішки містять поліетиленовий вкладиш або міжшаровий поліетилен. Зовнішній вигляд мішків з вкладишем наведено нижче на *рис.5.10*.

Поліетиленові вкладиші в картонні коробки відрізняються такими експлуатаційними перевагами:

- ✓ висока стійкість до механічних впливів за рахунок міцності і високої пружності поліетилену;
- ✓ гігієнічна безпека;
- ✓ надійний захист продукту від впливу негативних факторів зовнішнього середовища;

- ✓ можливість виготовлення пакетів-вкладишів будь-якої форми і розмірів [88].



**Рис 5.10.** Паперові мішки з поліетиленовим вкладишем [87].

При маркуванні на етикетці пакету вказують:

- ✓ найменування підприємства-виробника та його товарний знак;
- ✓ найменування препарату;
- ✓ дату виготовлення;
- ✓ ферментативну активність;
- ✓ термін зберігання.

Фасування порошку здійснюється за допомогою спеціальних фасувальних апаратів. Приклад фасувального автомату на *рис. 5.11*.

Даний автомат розфасує та упакує продукти у ваговому діапазоні від 10 до 200 кг. Оператор може задавати необхідні параметри дозування. Довжина пакетів регулюється.

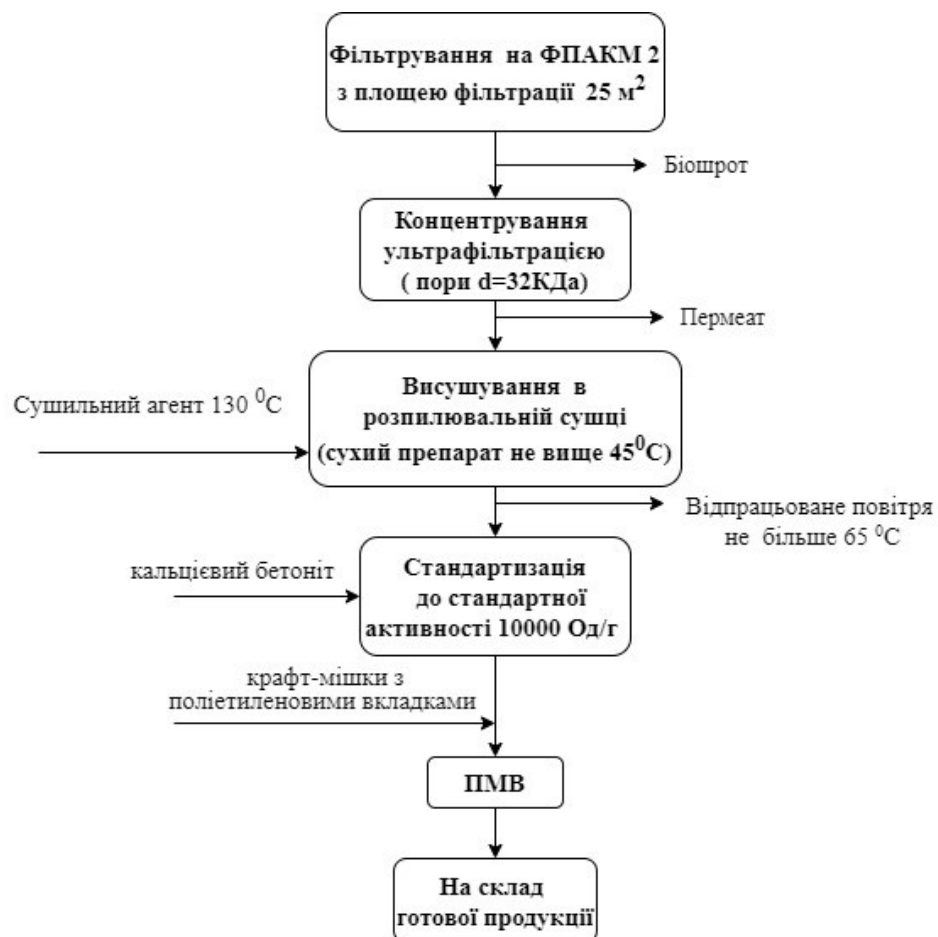
До складу машини входять:

- ✓ касета для запасу порожніх мішків;
- ✓ пристрій подачі мішка;
- ✓ дозатор продукції;
- ✓ досипання продукту;
- ✓ пристрій запаювання поздовжнього і поперечних швів упаковки;
- ✓ електронний блок управління зі світловою індикацією і відстеженням аварійних ситуацій;
- ✓ похибка в залежності від ваги дози, але не більше 0,5%
- ✓ вузол постановки дати на шві упаковки (день, місяць, рік "XX XX XX") [87].



**Рис.5.11.** Фасувально-пакувальний автомат сипучих в готові мішки [88].

Отже, проаналізувавши всі дані які були наведені вище, можна, зробити висновок що процес виділення та очистки ферментного препарату зі ступенем очистки ГЗх буде складатися із етапів, що представлені нижче на *рис.5.12*.



**Рис 5.12.** Схема виділення та очищення ферментного препарату.

## 5.3 Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 1 Зберігання культуральної рідини</b>						
1	ТП 1.1 Зберігання культуральної рідини	КР	2,7 м <sup>3</sup> (2700 л)	-	2,7 м <sup>3</sup> (2700 л)	Збірник КР 3 м <sup>3</sup>
<b>ТП 2. Відділення біомаси від культуральної рідини</b>						
2	ТП 2.1 фільтрування культуральної рідини	Культуральна рідина	2,7 м <sup>3</sup> (Біомаса з вологістю 75% 115.7 кг)	162 л(6%)	-	Фільтр-прес ФПАКМ 22 - 45 з площею фільтрації 22 м <sup>2</sup> (розрахунок на 1.8 год. роботи)
		Фільтрат	-	-	2415.6 л	Збірник фільтрату об'ємом 3 м <sup>3</sup>
<b>ТП 3. Концентрування і очищення екстракту</b>						
3	ТП 3.1 Ультрафільтрація екстракту (приймаємо ступінь концентрування $K_{уф} = 2$ ).	Фільтрат	2415.6	-	-	
		Концентрат	-	48.3 л (2%)	1183.6 л	Збірник 1500 л.
		Пермеат	-	-	1183.7 л	Пермеат на утилізацію.
<b>ТП 4. Сушіння цільового продукту</b>						
4	ТП 4.1. Сушіння у розпилювальній сушарці	Концентрат	1183.6 л			Розпилювальна сушарка
		Сухий препарат	-	1065.3 кг	.	Пересувна ємність об'ємом

		з вологістю 12%		(10%)	4.2 кг	7 л
<b>ТП 5. Стандартизація готового продукту</b>						
5	ТП 5.1 Змішування в бункері	Сухий препарат ферменту з вологістю 12%	4.2 кг	-	-	В бункер-змішувач 0.4м <sup>3</sup>
		Наповнювач кальцієвого бетону	260 кг	-	-	В бункер-змішувач 0.4м <sup>3</sup>
		Готовий препарат з стандартною активністю 10 000 од/г	-	(2.6) 1%	261.6	В бункер-змішувач 0.4м <sup>3</sup>
<b>ПМВ 6. Пакування, маркування, відвантаження</b>						
6	ПМВ 6.1. Фасування, пакування, маркування цільового продукту	Готовий препарат з стандартною активністю 10 000 од/г	261.6 кг	-	-	Фасувально-пакувальна лінія
		Упакований (по 10 кг) цільовий продукт	-	(2.6) 1%	259 ( 26 крафт/пакетів)	

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Відомості та специфікація обладнання, що зображене на апаратурній схемі, наведені в *табл. 6.1*.

*Табл. 6.1*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1 ПЗ-8	Повітрозбірник	2	Повітрозбірник АІИ 017.000-01. Фірма: «ВекторКондвент». Обладнаний металевією сіткою, що слугує для видалення механічних забруднень. Робочий тиск: до 0,6 МПа (6 кг*с/см <sup>2</sup> ) та до 1,2 МПа (12 кг*с/см <sup>2</sup> ). Габаритні розміри (мм): висота 219, ширина 602, довжина 398 <sup>[1]</sup> .
Ф-2 Ф-9	Фільтр грубої очистки повітря	2	Чарунковий фільтр типу ФЯП, пропускна здатність –1540 м3/год. Ефективність очистки – 80 %, наповнювач – пінополіуретан с витравленими порами. Виробник: компанія «Укрвент», (Україна) Габаритні розміри (мм): висота 32, ширина 514, довжина 514. Маса (кг) не більше 2,8 <sup>[2]</sup> .
К-3	Компресор	1	Компресор Albert E65-R з прямим приводом. Продуктивність: 1000 л/хв. Потужність: 7,5 кВт. Виробник «АТМОS» Габаритні розміри: 1558x646x1300 (Росія) <sup>[3]</sup>

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ</b>					
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 6.Специфікація обладнання</b>					
Розроб.	Бондарук Д.В							Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник	Сулейко Т.Л.								71	1401
Консультант								<b>Кафедра БТМ</b>		
Н.Контр.										
Затверд.	Пирог Т.П.									

Продовження табл. 6.1

Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря VENTS ОКВ 500х250-3. Максимальний робочий тиск 0,15 Мпа (15 бар). Виробник: «Vents» (Україна) <sup>[4]</sup> .
Р-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний РВ 500.15.00. Об'єм до 500 л, максимальний робочий тиск 15 бар. Матеріал корпусу – вуглецева та нержавіюча сталь. Габаритні розміри(мм): висота 1800, ширина 700, довжина 650. Виробник: «BARRENS» (Німеччина) <sup>[5]</sup> .
Т 6 Т-10	Теплообмінник-нагрівач	2	Паровий калорифер (нагрівач). Матеріал труб: нержавіюча сталь. Теплоносій: водяна пара Макс. робоча температура: 400°С. Тиск робочого середовища: 10, 16, 25 бар. Виробник: ОПЕКС <sup>[6]</sup> .
Ф-7	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Фільтр тонкої очистки повітря. Клас очистки: F8. Фільтруючий матеріал: мікростекловолокно. Продуктивність 2480 м3/год. Габаритні розміри(мм) : 592х490х292. Виробник: компанія «Технофільтр» (Україна) <sup>[7]</sup> .
З-11	Збірник	1	Збірник об'ємом 7 л, оснащений мішалкою Швидкість перемішування 50 — 1000 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь 316 L. Габаритні розміри (мм):635х660х978. <sup>[8]</sup> .
Р-12 Р-52	Реактор-змішувач	1	Об'єм 70 л, оснащений сорочкою, барботером та мішалкою 180 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь 316L. Габаритні розміри: розмір баку: 957х655мм, висота 2100 мм. Виробник: Україна <sup>[9]</sup> .
Д-13 Д-16 Д-30 Д-41 Д-44	Об'ємний дозатор	5	Об'ємно-ваговий дозатор АД-200 БЖ, об'єм дозування від 60 л до 200 л. Виробник «УЗВ»(Україна) <sup>[10]</sup>
З-14	Збірник	1	Збірник змішувач об'ємом 630 л. Реактор оснащений перемішуючим пристроєм. Габаритні розміри: висота 1300, ширина 900 мм. Вага 1062 кг. <sup>[11]</sup> .
Н-15 Н-40 Н-43 Н-58	Насос відцентровий	8	Насос відцентровий МВ 80. Продуктивність: від 1 до 6 м <sup>3</sup> /год. Матеріал: горизонтальний насос з корпусом з поліпропілену РР або фторопласта PVDF. Виробник: Debem (Італія) <sup>[12]</sup>

Продовження табл. 6.1

Н-64 Н-66 Н-73			
Р-17 Р-20	Реактор-змішувач для стерилізації	2	Реактор - змішувач об'ємом 15 л. Реактор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Габаритні розміри: 482.6x482.6x1606.55. <sup>[13]</sup> .
Н-18 Н-21 Н-23 Н-32 Н-35 Н-37 Н-46 Н-49 Н-52 Н-55 Н-62	Насос перистильчастий	11	Насос перистильчастий серії TF-RM. Продуктивність: 2780 л /год. Максимальна в'язкість: 150000. Температура до 100 С. Тиск: до 2 бар. Матеріал: алюмінієві сплави. <sup>[14]</sup>
Д-19 Д-24 Д-33 Д-38 Д-47 Д-50 Д-56 Д-79	Ваговий дозатор	8	Ваговий дозатор. Продуктивність — 5, 10, 15, 25, 50, 80, 100, 200 т/год. Виробник «Техноваги». <sup>[15]</sup> .
Р-22	Реактор-змішувач для стерилізації	1	Реактор 30 літрів нержавіюча сталь 12x18n10t. Реактор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм, торцеве ущільнення, електропривод. Робочий тиск 0,6 Мпа. Робоча температура від мінус 25 градусів до 250 градусів <sup>[16]</sup> .
Р-25	Реактор-змішувач для стерилізації	1	Пілотний металевий реактор з робочим об'ємом 5 л. Матеріал: нерж.сталь (316L). Розміри: 450 x 250 x 1430 мм Електроживлення: 380В / 50 Гц <sup>[17]</sup> .
ІФ-26 ІФ-28 ІФ-53 ІФ-59	Індивідуальний фільтр очистки повітря	4	Фільтр повітряний сепараторний типу «Лаік» Д 3/26 . Пропускна здатність – 2800 м3/год. Площа фільтра – 26 м2. Фільтруючий матеріал - ультратонкі перхлорвінілові волокна зі стійким статичним зарядом, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9 % . Габаритні розміри(мм): висота 636, ширина 590, довжина 485. Виробник: «Техно Град» (Україна) <sup>[18]</sup> .
ІН-27	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 7 л, оснащений сорочкою, барботером та турбінною мішалкою Швидкість перемішування 50 — 1000 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь 316 L. Габаритні розміри (мм): 635x660x978. Виробник «Eppendorf»

Продовження табл. 6.1

			( США) <sup>[8]</sup> .
ІН-29	Інокулятор	1	Інокулятор Bio Clave 70L. Об'єм 70 л, оснащений сорочкою, барботером та мішалкою 180 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь 316L. Габаритні розміри: розмір баку: 957х655мм, висота 2100 мм. Виробник «Abacus Analytical Systems GmbH» (Німечина) <sup>[19]</sup> .
Р-31 Р-34	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації	2	Робочий об'єм 0,15 м <sup>3</sup> . Реактор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Матеріал: внутрішній бак нержавіюча сталь SUS304 або SUS316L; сорочка нержавіюча сталь Q235-B або SUS304. Габаритні розміри: 800×800×1800 мм. Виробник: Китай <sup>[20]</sup> .
Р-36	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації	1	Робочий об'єм 0,3 м <sup>3</sup> . Реактор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Матеріал: внутрішній бак нержавіюча сталь SUS304 або SUS316L; сорочка нержавіюча сталь Q235-B або SUS304. Габаритні розміри: 900×900×2000 мм. Виробник: Китай <sup>[20]</sup> .
Р-39 Р-42	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації	2	Робочий об'єм 40 л. Реактор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Матеріал корпусу: емальована вуглецева сталь. Робочий тиск в апараті: 6кгс / см <sup>2</sup> . Робоча температура в реакторі: від -20 до +200 Мішалка якірного типу, привід мішалки на 60 оборотів в хвилину. <sup>[21]</sup> .
Р-45 Р-48	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації	2	Реактор-змішувач об'ємом 1500 л, оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм (150об/хв). Матеріал: нержавіюча сталь SUS304 або SUS316L. Габаритні розміри: 1200×1200×2550мм. Виробник: Китай <sup>[20]</sup> .
Р-54	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації	1	Реактор-змішувач об'ємом 3000 л, оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм (150об/хв). Матеріал: внутрішній бак нержавіюча сталь SUS304 або SUS316L; сорочка нержавіюча сталь Q235-B або SUS304 Габаритні розміри: 1700×1700×3600 мм. Виробник: Китай <sup>[20]</sup> .
Р-57	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації	1	Реактор-змішувач об'ємом 400 л, Марка: АИМ 80 В4-У2. оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм Матеріал: внутрішній бак нержавіюча сталь SUS304 або SUS316L; сорочка нержавіюча сталь Q235-B або SUS304 Габаритні розміри: висота 2535 ширина 1210 мм. Виробник: «Красный Октябрь» <sup>[22]</sup> .
ІН-60	Інокулятор	1	Інокулятор робочий об'єм 630 оснащений

Продовження табл. 6.1

			сорочкою, барботером, турбінною мішалкою. Швидкість перемішування 10 — 750 об/хв. Матеріал: AISI 316L для деталей, що контактують. AISI 304L для деталей, що не контактують. Габаритні розміри: Внутрішній діаметр 630 мм, зовнішній діаметр 770 мм; тіло посудини 700 мм, загальна висота з мішалкою та ніжками близько 2400 мм. Виробник: «SYSBIOTECH GmbH» (Німеччина) <sup>[23]</sup> .
Фр-61	Ферментер	1	Ферментер для виробничого біосинтезу об'ємом 5000 л оснащений сорочкою, барботером та турбінною мішалкою. Швидкість перемішування 0 — 280 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь SUS304 або 316L. Габаритні розміри(мм) :1600×2200×4000. Виробник: «Manufacturer/Factory & Trading» (Китай) <sup>[24]</sup> .
З-63	Збірник культуральної рідини	1	Збірник об'ємом 3000 л. Швидкість перемішування 0 — 280 об/хв. Матеріал: нержавіюча сталь SUS304 або 316L. Габаритні розміри (мм): 1400×2000×3600. Виробник: «Manufacturer/Factory & Trading» (Китай) <sup>[20]</sup> .
ФП-65	Фільтр-прес	1	МБ3-22 з площею фільтрації 22 м <sup>2</sup> (габарити 3976x2895x4635мм). Потужність не більше 28,5 кВт. Робоча температура +5-90 °С Україна <sup>[25]</sup> .
УФ-67	Фільтраційна установка	1	Фільтраційна установка фірми «Ecosoft MO-24» з горизонтальними фільтрувальними елементами, складається зі збірника (З-68) об'ємом 3 м <sup>3</sup> , насос (Н-69), змінного попереднього фільтра (Ф-70) та фільтраційного модуля (УМ-71), продуктивність установки - від 4 до 350 л/год. Ширина: 0,6 м. Висота: 1,5 м Довжина: 1,5 м. Вага: не більше 300 кг. Діаметр пор 32 кДа <sup>[26]</sup> .
З-72	Збірник	1	Ємність для об'ємом 1500 л. Матеріал: нержавіюча сталь SUS304 або SUS316L. Діаметр 670 мм. Вага 400кг. Виробник: Китай <sup>[27]</sup> .
С-74	Розпилювальна сушарка	1	Розпилювальна сушарка. Продуктивність випарювання вологи 400 кг/год. Довжина установки: 13,5 м. Ширина: 12 м. Складається з циклону (Ц-75) і вентилятора (В-76) <sup>[28]</sup> .

Продовження табл. 6.1

ТТ-77	Транспортна тара	1	Пересувний бункер для порошкоподібних, сипучих продуктів на 6-10 кг. Матріал нержавіюча сталь. Габаритні розміри на замовлення. Виробник Україна. [29]
БЗ-78	Бункер-змішувач	1	Зварну сталеву конструкцію з високоякісних матеріалів. Рухома частина встановлена на шарикопідшипниках. Вся конструкція захищена від корозії шаром фарби. До змішувача входить вага під змішувач: (три датчики + пульт – з пам'яттю на 10 рецептів по 6 компонентів). З нержавіючої сталі. Польща [30].
Ш-80	Шнековий транспортер	1	Шнековий транспортер призначений для подачі сипучих продуктів. Продуктивність, л / год 6000. Висота підйому продукту, мм (не більше) 3000. Ємність приймального бункера, л 275. Електроживлення 380, 5Гц. Встановлена потужність, кВт 2,2. Кут нахилу шнека 60 °. Маса, кг не більше 250. Компанія «Технолог» Україна. [31].
ФМ-81	Фасувальна машина	1	Фасувальна машина виробництва НВП «Техноаги» використовується для фасування борошна, комбікорму, крохмалю та аналогічних продуктів у відкриті мішки до 10 кг. Характеристика: Маса дози — від 1 до 10 кг. Точність дозування — 0,5-2%. Дозування — вагове. Продуктивність — до 4-6 уп./хв. (Україна) [32].

Примітка: 1 <http://condvent.ru/vozduhosborniki.html> ; 2. <https://ukrvent.com/fyap-html/> ; 3 <https://top-compressor.ru/catalog/vintovye-compressory/kompressor-vintovoy-atmos-albert-e65-r/#tab1> ; 4 <https://vent-market.com.ua/shop/product/vents-okv-500h250-3> 5-<https://fiac-ua.com/product/resiver-vozdushnyi-rv-500-15-36/> 6 <https://opeks.energy/parovye-kalorifery-nagrevateli/> 7 <https://tehnofilter.ub.ua/ru/goods/view/6364272/delivery/filtr-tonkoy-ochistki-vozdruha-ftov-k-hepa-hepa/> 8 [https://www.google.com/search?safe=active&sxsrf=ALeKk031qWn0B2bi6ucaYFGjXL2qRqjJxA%3A1603902865088&ei=kZ2ZX4blBM6IrwSeurroCA&q=7.0L+-+19.5L+BIOFLO%C2%AE415&aq=7.0L+-+19.5L+BIOFLO%C2%AE415&gs\\_lcp=CgZwc3ktYWlQA1C8Cli8CmDkCmgAcAB4AIABA1gBAJIBA1gBAKABAaoBB2d3cy13aXrAAQE&sclient=psy](https://www.google.com/search?safe=active&sxsrf=ALeKk031qWn0B2bi6ucaYFGjXL2qRqjJxA%3A1603902865088&ei=kZ2ZX4blBM6IrwSeurroCA&q=7.0L+-+19.5L+BIOFLO%C2%AE415&aq=7.0L+-+19.5L+BIOFLO%C2%AE415&gs_lcp=CgZwc3ktYWlQA1C8Cli8CmDkCmgAcAB4AIABA1gBAJIBA1gBAKABAaoBB2d3cy13aXrAAQE&sclient=psy) 9 <http://www.kft2.com.ua/reaktor70.html> 10 <https://vesmaster.com.ua/images/dozators/doz5.html> <https://tdredoctober.com/catalog/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy-v063-m3.html> 12 [https://www.debem.com.ua/nasos/centrobezhnye\\_nasosy/mb\\_80/](https://www.debem.com.ua/nasos/centrobezhnye_nasosy/mb_80/) 16 <http://hydrotrend.ru/filter-press/tower-filter-press-fpakm/> 13 <http://www.tonitech.co.th/wp-content/uploads/2013/01/Spec-10L-reactor.pdf> 14 [https://ascopumps.com.ua/pumps/peristalticheskie/serii\\_tf-rm.html](https://ascopumps.com.ua/pumps/peristalticheskie/serii_tf-rm.html) 15 <https://www.avtoves.ua/ukr/catalog/vesoizmeritelnyye-sistemy/dozirovaniye/product.html?id=4117> 16 <http://hydrotrend.ru/filter-press/tower-filter-press-fpakm/> 17 [https://tirit.org/reactor\\_him/lab\\_steel\\_gomo.php](https://tirit.org/reactor_him/lab_steel_gomo.php) 18 [http://tehnograd.kiev.ua/ru/filtri\\_dlja\\_sistem\\_ventiljacii/aerosol/aerozolnye-filtry-serii-layk.html](http://tehnograd.kiev.ua/ru/filtri_dlja_sistem_ventiljacii/aerosol/aerozolnye-filtry-serii-layk.html) 19 <http://www.abacus-lab.net/biotechnology-and-bioscience/bioreactors-and-fermenters/sterilised-bioreactors/pilot/sst-20-590-l/> 20 <https://a6libaba.en.made-in-china.com/product/YZNOIRIAOJV/China-Stainless-Steel-Industrial-Mixing-Tank.html>

21	<a href="http://fryazino.pro/product/himicheskiy-reaktor-vern-004-40-litrov/">http://fryazino.pro/product/himicheskiy-reaktor-vern-004-40-litrov/</a>	22
	<a href="https://tdredoctober.com/catalog/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy-v04-m3.htm">https://tdredoctober.com/catalog/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy-v04-m3.htm</a>	23
	<a href="https://en.sysbiotech.at/stationary-reactor-with-cip-and-sip-630-l/16">https://en.sysbiotech.at/stationary-reactor-with-cip-and-sip-630-l/16</a>	24
	<a href="https://a6libaba.en.made-in-china.com/product/XwGmlQbVgUcD/China-Industrial-Bio-Fermentor-Fermenter-Industrial-Stainless-Steel-Fermentation-Tank-5000L.html">https://a6libaba.en.made-in-china.com/product/XwGmlQbVgUcD/China-Industrial-Bio-Fermentor-Fermenter-Industrial-Stainless-Steel-Fermentation-Tank-5000L.html</a>	25
	<a href="http://hydrotrend.ru/filter-press/tower-filter-press-fpakm/">http://hydrotrend.ru/filter-press/tower-filter-press-fpakm/</a>	26
	<a href="https://biotechno.ru/catalog/karta/pilotnaya-ustanovka-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-401-402/">https://biotechno.ru/catalog/karta/pilotnaya-ustanovka-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-401-402/</a>	27
	<a href="https://forstecmachinery.en.made-in-china.com/product/EOBtaJRCYQkd/China-1500L-Stainless-Steel-Storage-Tank-for-Milk-Water-Beverage-Juice-Dairy-Yoghurt-Food-Storage.html">https://forstecmachinery.en.made-in-china.com/product/EOBtaJRCYQkd/China-1500L-Stainless-Steel-Storage-Tank-for-Milk-Water-Beverage-Juice-Dairy-Yoghurt-Food-Storage.html</a>	28
	<a href="https://tdredoctober.com/catalog/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy-v063-m3.html">https://tdredoctober.com/catalog/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy/reaktor-nerzhaveyushchiy-s-meshalkoy-v063-m3.html</a>	29
	<a href="https://ua.all.biz/uk/bunker-dozator-shnekovyj-nakopychuvalnyj-dlya-g2874142">https://ua.all.biz/uk/bunker-dozator-shnekovyj-nakopychuvalnyj-dlya-g2874142</a>	30
	<a href="https://torg.zone/zmishuvach-shnekovyj-bunker-dla-zmishuvanna-zmishuvach-kormiv-polske-virobnictvo-m-rol-27350.htm">https://torg.zone/zmishuvach-shnekovyj-bunker-dla-zmishuvanna-zmishuvach-kormiv-polske-virobnictvo-m-rol-27350.htm</a>	31
	<a href="https://tehnolog.com.ua/catalog/pharma/screw-conveyor/">https://tehnolog.com.ua/catalog/pharma/screw-conveyor/</a>	32
	<a href="https://technowagy.com.ua/products/fasovochnaya-mashina-dlya-muki-i-analogichnyh-produktov-v-otkrytye-meshki-do-10-kg/">https://technowagy.com.ua/products/fasovochnaya-mashina-dlya-muki-i-analogichnyh-produktov-v-otkrytye-meshki-do-10-kg/</a>	

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСУ БІОСИНТЕЗУ ФЕРМЕНТУ ЛПАЗИ

Технологічна схема біосинтезу ліпази включає допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування розчинів титрувальних агентів, підготовка аераційного повітря та сушильного агента ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез ферменту ліпази на основі продуцента *Rhizopus japonicus* 1403 , також етапи виділення ферментного препарату)

Технологічну та апаратну схему біосинтезу ферменту наведено у графічній частині проекту.

### ДР 1. Підготовка аераційного повітря

#### ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через забірну шахту на висоті 30 м. Повітрозабірник (ПЗ – 1) представляє собою металеву трубу діаметром 100-150 мм. При визначенні місця забору зовнішнього повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела аерозольних і газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди, квітучі рослини тощо).

#### ДР 1.2. Очищення на фільтрі грубої очистки

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі типу ФЯП (Ф – 2) зі ступенем очистки  $E = 80\%$ . При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил та механічні частки з повітря осідають, а очищене повітря надходить у компресор.

#### ДР 1.3. Стиснення повітря

При стисканні повітря у компресорі (К – 3) - його температура підвищується до 200-250 °С.

Після компресора повітря має наступні характеристики:  $P = 0,35-0,5$  МПа,  $W = 60\%$ . Оборотна вода з цієї стадії направляється в збірник промивних вод.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ</b>			
<b>Зн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<b>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>	<b>Літ.</b>	<b>Арк.</b>	<b>Акрушів</b>
Розроб.		Бондарук Д.В.						
Керівник		Сулейко Т.Л.					78	140
Консультант								78
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				<b>Кафедра БТМ</b>		

#### **ДР 1.4. Охолодження повітря у теплообміннику**

Перед подачею в головний фільтр повітря охолоджують до температури 15-25°C в теплообміннику (Т – 4), подачею холодної води.

#### **ДР 1.5. Видалення вологи**

Охоложене повітря надходить у ресивер (Ре – 5), в якому видаляється надмірна волога та стабілізується потік повітря. Вологість на виході з ресивера становить  $W=40\%$ .

#### **ДР 1.6. Нагрівання повітря**

Після ресивера повітря подається на теплообмінник (Т - 6), в якому нагрівається до температури 30°C електрокалорифером для досягнення необхідної температури для культивування. Потім стабілізоване повітря надходить на головний фільтр.

#### **ДР 1.7. Очищення повітря в головному фільтрі**

Подальше очищення повітря від механічних забруднень проходить у головному фільтрі (Ф – 7) карманного типу. Всередині фільтру знаходяться декілька шарів ультратонкого поліпропіленового волокна, що очищають повітря від пилу і мікроорганізмів. Ступінь очищення становить  $E = 99\%$ , при використанні фільтру марки FMW.

#### **ДР 1.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі**

Заключна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальному фільтрі (ІФ-26 , ІФ-28, ІФ-53, ІФ -59 ), які встановлюють перед інокуляторами (ІН-27,ІН-29,ІН-60), безпосередньо перед виробничим ферментером (Фр-61). Як фільтруючий матеріал використовують ультратонке волокно з перхлоровінілової смоли. Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном. Ступінь очищення становить  $E = 99,999\%$ .

### ***ДР 2. Підготовка сушильного агента сушарки***

#### ***ДР 2.1 Забір атмосферного повітря***

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 20 м за допомогою пристрою для забору повітря (ПЗ-8).

#### ***ДР 2.2 Очистка від грубих домішок***

Очистку повітря здійснюють у фільтрі грубої очистки (Ф-9). При проходженні повітря через фільтр грубого очищення затримується пил та механічні частки, а очищене повітря надходить у теплообмінник-нагрівач (Т-10). Ступінь очищення  $E = 90 \%$ .

### ***ДР 2.3 Нагрівання повітря***

Нагрівання повітря відбувається у теплообміннику-нагрівачі до 130-135 °С. (Т-10). Нагріте повітря іде на наступну стадію сушіння (ТП 9.1).

### ***ДР 3. Приготування титрувального агенту***

#### ***ДР 3.1. Приготування 6 % розчину HCl для підкислення поживного середовища об'ємом 3 л***

Відомо, що на кожну 1 л поживного середовища в середньому витрачається 200 мл титрувального агента. Отже для 3 л поживного середовища потрібно 600 мл 6 % розчин соляної кислоти.

6 % розчин соляної кислоти готується розведенням з більш концентрованою 37 % розчину до встановлення необхідної концентрації за формулою (7.1):

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1}, \quad (7.1)$$

де  $V_1$  – об'єм концентрованої соляної кислоти  $V_2$  – об'єм соляної кислоти необхідної концентрації, л;  $C_1$  та  $C_2$  – відповідно концентрації концентрованої (37%) і необхідна концентрація кислоти, %.

Згідно формули (7.1), визначаємо кількість концентрованої соляної кислоти для поживного середовища об'ємом 3 л.

$$V_1 = \frac{0.6 \times 6}{37} = 0.097 \text{ л.}$$

Тому для приготування 0.6 л 6 % соляної кислоти необхідно під витяжною шафою у колбу об'ємом 1 л наливають 0.5 л дистильованої води. Потім за допомогою мірного циліндра при постійному перемішуванні додають 100 мл 37 % розчину HCl. Обов'язково рідини змішують в такому порядку, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Колбу закривають скляною пробкою. Готовий розчин не потребує стерилізації.

***ДР 3.2. Приготування 6 % розчину HCl для підкислення поживного середовища об'ємом 30,3 л***

Відомо, що на кожну 1 л поживного середовища в середньому витрачається 200 мл титрувального агента. Отже для 30,3 л поживного середовища потрібно 6,06 л 6 % розчин соляної кислоти.

Згідно формули (7.1), визначаємо кількість концентрованої соляної кислоти для поживного середовища об'ємом 30,3 л.

$$V_1 = \frac{6.06 \times 6}{37} = 0.97 \text{ л.}$$

Тому для приготування 6.06 л 6 % соляної кислоти необхідно у збірник (З-11) об'ємом 7 л наливають 5,1 л питної води. Потім за допомогою мірного циліндра при постійному перемішуванні додають 970 мл 37 % розчину HCl. Обов'язково рідини змішують в такому порядку, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Готовий розчин не потребує стерилізації.

***ДР 3.3. Приготування 6 % розчину HCl для підкислення поживного середовища об'ємом 300 л***

Відомо, що на кожну 1 л поживного середовища в середньому витрачається 200 мл титрувального агента. Отже для 300 л поживного середовища потрібно 60 л 6 % розчин соляної кислоти.

Згідно формули (7.1), визначаємо кількість концентрованої соляної кислоти для поживного середовища об'ємом 60 л.

$$V_1 = \frac{60 \times 6}{37} = 9.7 \text{ л.}$$

Тому для приготування 60 л 6 % соляної кислоти необхідно у збірник (З-12) об'ємом 70 л наливають 50,3 л питної води. Потім при постійному перемішуванні додають 9.7 л 37 % розчину HCl. Обов'язково рідини змішують в такому порядку, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Готовий розчин не потребує стерилізації.

***ДР 3.4 Приготування 6 % розчину HCl для підкислення поживного середовища об'ємом 300 л***

Відомо, що на кожну 1 л поживного середовища в середньому витрачається 200 мл титрувального агента. Отже для 3000 л поживного середовища потрібно 600 л 6 % розчин соляної кислоти.

Згідно формули (7.1), визначаємо кількість концентрованої соляної кислоти для поживного середовища об'ємом 60 л.

$$V_1 = \frac{600 \times 6}{37} = 97 \text{ л.}$$

Тому для приготування 600 л 6 % соляної кислоти необхідно у збірник (З-14) об'ємом 630 л наливають 503 л питної води. Потім при постійному перемішуванні за допомогою дозатора (Д-13) додають 97 л 37 % розчину HCl. Обов'язково рідини змішують в такому порядку, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Готовий розчин не потребує стерилізації. Перекачують за допомогою насоса (Н-15).

#### ***ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ***

##### ***ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках***

Для вирощування інокуляту необхідно 0,3 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 0,3 л середовища наведено в табл. 7.1

*Таблиця 7.1*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,3 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація г/л	Вміст компонента у 300 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Кукурудзяний екстракт	5	1.5	А	208.1
Соева макуха	17	5.1		
Вода		201,5		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	1.2	Б	91.2
Вода		90		
Олеїнова кислота	3.5	1	В	1

#### ***ДР 4.1.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту***

На технічних вагах зважують 1.5 г кукурудзяного екстракту і поміщають в колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води і поміщають у термостат на 24 год. при температурі 37 °С.

#### ***ДР 4.1.2. Підготовка розчину соєвої макухи***

На технічних вагах зважують 5.1 г соєвої макухи і поміщають в колбу об'ємом 250 мл, додають 101.5 мл дистильованої води та заварюють при температурі 75-80 °С та інтенсивно перемішують з дилля запобіганню утворення грудочок на 20-30 хв.

#### ***ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції А***

Наважки (від ДР 4.1.1) та (від ДР 4.1.2) поміщають у колбу об'ємом 500 мл та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв. Стерилізація відбувається подачею пари в апарат. Надлишковий тиск в апараті 0,05 МПа.

#### ***ДР 4.1.4. Приготування і стерилізація композиції Б***

На технічних вагах зважують 1.2 г  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 125 мл, додають 90 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Стерилізація відбувається подачею пари в апарат. Надлишковий тиск в апараті 0,15 МПа

#### ***ДР 4.1.5. Приготування і стерилізація композиції В***

На технічних вагах зважують 1 г олеїнової кислоти. Наважку переносять у мірний стакан.

#### ***ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 7 л***

Для вирощування інокуляту необхідно 3 л поживного середовища. Для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого 300 мл. Вміст компонентів для приготування 3 л середовища наведено в табл. 7.2.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація г/л	Вміст компонента у 3 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Кукурудзяний екстракт	5	15	А	2066
Соєва макуха	17	51		
Вода		2000		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	12	Б	913.5
Вода		901.5		
Олеїнова кислота	3.5	10.5	В	20.5
Вода		10		

**ДР 4.2.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту**

На технічних вагах зважують 15 г кукурудзяного екстракту і поміщають в колбу об'ємом 2 л, додають 1 л дистильованої води і поміщають у термостат на 24 год. при температурі 37 °С.

**ДР 4.2.2. Підготовка розчину соєвої макухи**

На технічних вагах зважують 51 г соєвої макухи і поміщають в колбу об'ємом 2 л, додають 1 л дистильованої води та заварюють при температурі 75-80 °С та інтенсивно перемішують з для запобіганню утворення грудочок на 20-30 хв.

**ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції А**

Наважки (від ДР 4.2.1) та (від ДР 4.2.2) поміщають у колбу об'ємом 2.5 л та перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв. Стерилізація відбувається подачею пари в апарат. Надлишковий тиск в апараті 0,05 МПа. Далі самопливом перекачують в стерильних умовах в інокулятор (ІН-27).

**ДР 4.2.4. Приготування і стерилізація композиції Б**

На технічних вагах зважують 12 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Наважку поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 901.5 мл дистильованої води і перемішують. Закривають

колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв. Стерилізація відбувається подачею пари в апарат. Надлишковий тиск в апараті 0,15 Мпа. Далі самопливом перекачують в стерильних умовах в інокулятор (ІН-27).

**ДР 4.2.5. Приготування і стерилізація композиції В**

На технічних вагах зважують 10.5 г олеїнової кислоти. води. Наважку переносять у мірний стакан. Додають 10 мл. Стерилізація проводиться в автоклаві парою при температурі 120-126°С і надлишковому тиску 0,1-0,14 МПа протягом 1 години. Далі перекачують в стерильних умовах в інокулятор (ІН-27).

**ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 70 л**

Для вирощування інокуляту необхідно 30.3 л поживного середовища. З урахуванням рідкого посівного матеріалу, об'єм якого 3 л та конденсату (1.2 л), що утворюється в процесі стерилізації. Вміст компонентів для приготування 30.3 л поживного середовища наведено в *табл. 7.3*

*Таблиця 7.3*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 30.3 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 30.3 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний екстракт	5	151.5	А	25.7
Соева макуха	17	515.1		
Вода		23		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	121.2	Б	5.7
Вода		4.4		
Конденсат		1.2		
Олеїнова кислота	3.5	106	В	2.1
Вода		2		

#### ***ДР 4.3.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту***

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-16) зважують 151.5 г кукурудзяного екстракту і поміщають у реактор-змішувач (Р-17) об'єм якого 15 л. Додають 10.5 л водопровідної води. Для розчинення у рубашку подають пару, для досягнення температури розчину 37°C і витримують 24 години. Далі за допомогою насоса (Н-18) перекачують у реактор-змішувач (Р-22)

#### ***ДР 4.3.2. Підготовка розчину соєвої макухи***

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-19) 515.1 г соєвої макухи та поміщають у реактор-змішувач (Р-20) об'єм якого 15 л додають 12.5 л дистильованої води та заварюють при температурі 75-80 °С та інтенсивно перемішують з кількістю обертів 50-100 об/хв з для запобіганню утворення грудочок на 20-30 хв. Далі за допомогою насоса (Н-21) перекачують у реактор-змішувач (Р-22)

#### ***ДР 4.3.3. Приготування та стерилізація композиції А***

Підготовлені розчини (від ДР 4.3.1) та (від ДР 4.3.2) за допомогою (Н-18) та (Н-21) переносять у реактор-змішувач (Р-22) об'єм якого 30 л та перемішують. Стерилізація відбувається подачею пари в апарат. Для стерилізації в середовище подають гостру пару. Температура стерилізації – 112 °С (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв. Далі за допомогою насоса (Н-23) перекачують у інокулятор (ІН-29).

#### ***ДР 4.3.4. Приготування і стерилізація композиції Б***

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-24) зважують 120 г  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . та поміщають у реактор-змішувач (Р-25) об'єм якого 5 л додають 4.4 л. Для кращого розчинення солей в сорочку подається глуха пара (до досягнення температури розчину 40 °С) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 50-100 об/хв. Далі самопливом перекачують у інокулятор (ІН-29), для безпосередньої стерилізації. Стерилізація проводиться в інокулятор (ІН-29) подачею гострої пари в середовище. Температура стерилізації 40 хв, 131 °С, 0,15 МПа.

#### ***ДР 4.3.5. Приготування і стерилізація композиції В***

Беремо стакан об'ємом 150 мл встановлюємо на технічні ваги, відтаровуємо та зважуємо 120 г олеїнової кислоти. Поміщають у колбу об'ємом 2.5 л та

перемішують у 2 л дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Стерилізація проводиться в автоклаві паром при температурі 120-126°C і надлишковому тиску 0,1-0,14 МПа протягом 1 години Далі самопливом перекачують в стерильних умовах в інокулятор (ІН-29).

**ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури у ферментері об'ємом 630 л**

Для вирощування інокуляту необхідно 300 л поживного середовища. З урахуванням рідкого посівного матеріалу, об'єм якого 30 л, та конденсату, що утворюється в процесі стерилізації. Вміст компонентів для приготування 300 л середовища наведено в *табл. 7.4*.

*Таблиця 7.4*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 300 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 300 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний екстракт	5	1,5	А	226.6
Соева макуха	17	5,1		
Вода		220		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	1,2	Б	43.2
Вода		32		
Конденсат		10		
Олеїнова кислота	3.5	1,5	В	31,5
Вода		30		

**ДР 4.4.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту**

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-30) зважують 1.5 кг кукурудзяного екстракту і поміщають у реактор-змішувач (Р-31) об'єм якого 150 л. Додають 105 л питної води. Для розчинення у рубашку подають пару, для досягнення температури

розчину 37°C і витримують 24 години. Далі за допомогою насосу (Н-32) перекачують у реактор-змішувач (Р-36)

#### ***ДР 4.4.2. Підготовка розчину соєвої макухи***

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-33) 5.1 кг соєвої макухи та поміщають у реактор-змішувач (Р-34) об'єм якого 150 л додають 115 л питної води та заварюють при температурі 75-80 °С та інтенсивно перемішують з кількістю обертів 50-100 об/хв з для запобігання утворення грудочок на 20-30 хв. Далі за допомогою насосу (Н-35) перекачують у реактор-змішувач (Р-36)

#### ***ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції А***

Підготовлені розчини (від ДР 4.4.1) та (від ДР 4.4.2) за допомогою насосів (Н-32) та (Н-35) переносять у реактор-змішувач (Р-36) об'єм якого 300 л та перемішують. Стерилізація відбувається подачею пари в апарат. Для стерилізації в середовище подають гостру пару. Температура стерилізації – 112 °С (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв. Далі насосом (Н-37) перекачують у інокулятор (ІН-60).

#### ***ДР 4.4.4. Приготування і стерилізація композиції Б***

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-38) зважують 1.2 кг  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . та поміщають у реактор-змішувач (Р-39) об'єм якого 40 л додають 32 л питної води. Для кращого розчинення солі в сорочку подається глуха пара (до досягнення температури розчину 40 °С) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 50-100 об/хв Далі насосом (Н-40) перекачують у інокулятор (ІН-56), для подальшої стерилізації. Стерилізація проводиться подачею гострої пари в середовище. Температура стерилізації 40 хв, 131 °С, 0,15 МПа.

#### ***ДР 4.4.5. Приготування і стерилізація композиції В***

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-41) зважують 1.5 кг олеїнової кислоти поміщають у реактор-змішувач (Р-42) об'єм якого 40 л додають 30 л питної води Стерилізація проводиться глухою парою через сорочку при температурі 120-126°C і надлишковому тиску 0,1-0,14 МПа протягом 1 годин. Далі насосом (Н-43) перекачують у інокулятор (ІН-60).

***ДР 4.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup>***

Для вирощування інокуляту необхідно 3000 л поживного середовища.

Вміст компонентів для приготування 3000 л середовища наведено в табл. 7.5.

Таблиця 7.5

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3000 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 300 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Кукурудзяний екстракт	5	15	А	2506
Соева макуха	17	51		
Вода		2440		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	12	Б	432
Вода		320		
Конденсат		10		
Олеїнова кислота	3.5	15	В	75
Вода		60		

**ДР 4.5.1. Підготовка розчину кукурудзяного екстракту**

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-44) зважують 15 кг кукурудзяного екстракту і поміщають у реактор-змішувач (Р-45) об'єм якого 1500 л. Додають 1250 л питної води. Для розчинення у рубашку подають пару, для досягнення температури розчину 37°C і витримують 24 години. Далі за допомогою насоса (Н-46) перекачують у реактор-змішувач (Р-54)

**ДР 4.5.2. Підготовка розчину соєвої макухи**

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-47) 51 кг соєвої макухи та поміщають у реактор-змішувач (Р-48) об'єм якого 1500 л додають 1250 л питної води та заварюють при температурі 75-80 °С та інтенсивно перемішують з кількістю обертів 50-100 об/хв з для запобіганню утворення грудочок на 20-30 хв. Далі за допомогою насоса (Н-49) перекачують у реактор-змішувач (Р-54).

**ДР 4.5.3. Приготування та стерилізація композиції А**

Підготовлені розчини (від ДР 4.5.1) та (від ДР 4.5.2) за допомогою насосів (Н-46) та (Н-49) переносять у реактор-змішувач (Р-54) об'єм якого 3000 л та перемішують. Стерилізація відбувається подачею пари в апарат. Для стерилізації в середовище подають гостру пару. Температура стерилізації – 112 °С (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв. Далі насосом (Н-55) перекачують у ферментер (Фр-61).

#### **ДР 4.5.4. Приготування і стерилізація композиції Б**

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-56) зважують 12 кг  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  та поміщають у реактор-змішувач (Р-57) об'єм якого 400 л додають 320 л. Для кращого розчинення солі в сорочку подається глуха пара (до досягнення температури розчину 40 °С) та встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 50-100 об/хв. Далі насосом (Н-58) перекачують у ферментер (Фр-61), де відбувається стерилізація. Стерилізація проводиться в ферментері (Фр-61) подачею гострої пари в середовище. Температура стерилізації 131 °С 40 хв, , 0,15 МПа.

#### **ДР 4.5.5. Приготування композиції В**

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-50) зважують 15 кг олеїнової кислоти та поміщають у реактор-змішувач (Р-51) об'єм якого 70 л додають 60 л питної води. Стерилізація проводиться глухою парою через сорочку при температурі 120-126°С і надлишковому тиску 0,1-0,14 МПа протягом 1 годин. Далі насосом (Н-52) перекачують в ферментер (Фр-61).

### **ТП 5. Підготовка посівного матеріалу**

#### **ТП 5.1. Підтримання колекційної культури**

Культуру мікроорганізму *Rhizopus japonicus* 1403. зберігають у пробірках на %, t 4-6 °С. Пересівання на свіжі середовища - один раз в три місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах. На наступний етап до ( ТП 5.2)

#### **ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах**

Розмноження штаму проводиться на агаризованому суслі з вмістом сухих речовин 4% протягом 3-4 діб при температурі  $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ .

#### **ТП 5.3. Вирощування культури в колбах на качалках**

Для вирощування рідкого посівного матеріалу об'ємом 300 мл у колбу 750 мл вносимо 208,1 мл із розчину композиції А (від ДР 4.1.3) в асептичних умовах, вносять розчину 91,2 мл композиції Б (від ДР 4.1.4), 1 мл розчину композиції В (від ДР 4.1.5) Перемішують і розливають по 150 мл у 2 стерильних колби об'ємом 750 мл.

У флаконі з робочою культурою *Rhizopus japonicus* 1403 вирощену на середовищі на агаризованому суслі з вмістом сухих речовин 4%, заливають 10 см<sup>3</sup> стерильної води, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію спор і переносять у колбу Ерленмейера ємністю 750 см<sup>3</sup> вносять по 150 см<sup>3</sup> живильного середовища, яку інокують водно-споровою суспензією в кількості 1% до обсягу середовища. Культивування продуцента проводять при швидкості 1,7-1,8 с<sup>-1</sup> (тобто при аерації), Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки. Вирощують у колбах на качалці (220 об/хв) упродовж 60 год. За допомогою посівної колби переносять до ТП 5.4

Періодично (кожні 4-6 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення активності ліпази.

#### **ТП 5.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 7 л**

Для вирощування інокуляту у попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 7 л в асептичних умовах вносять 2076 мл розчину композиції А (від ДР 4.2.3), 913,6 мл розчину композиції Б (від ДР 4.2.4), 10,4 мл розчину композиції В (від ДР 4.2.5). Як, що значення рН не у межах оптимальних для розвитку продуцента в поживне середовище додають кислоту (від ДР 3.1) або луг (аміачна вода зі складу) залежно від того як рН є на даному етапі (Здійснення контролю значення рН проводиться за допомогою рН-метра і та посівний матеріал (через засівну колбу від ТП 5.3). Температура культивування 30 °С, рН 6.8-7.0 швидкість перемішування становить 150-300 об/хв, витрати повітря 1 л/л·хв. Тривалість культивування становить 60 год.

Періодично (кожні 4-6 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення активності ліпази.

### ***ТП 5.5. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 70 л***

Попередньо простерилізований посівний апарат містить 5,7 л простерилізованого розчину солі композиції Б (від ДР 4.3.4). Після охолодження середовища в асептичних умовах в посівний апарат подають 25,7 л розчину композиції А (від ДР 4.3.3). та 0,1 л розчину композиції В (від ДР 4.3.5) Як, що значення рН не у межах оптимальних для розвитку продуцента в поживне середовище додають кислоту (від ДР 3.2) або луг( аміачна вода зі складу) залежно від того яке рН. (Здійснення контролю значення рН проводиться за допомогою рН-метра Після цього в інокулятор (ІН-29) передають посівний матеріалі посівний матеріал (через трубу перетискування від ТП 5.4). Температура культивування 28-30 °С, рН 6.8-7.0 швидкість перемішування становить 60-200 об/хв, витрати повітря 1 л/л·хв. Тривалість культивування становить 60 годин.

Періодично (кожні 4 - 6 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення активності ліпази.

### ***ТП 5.6. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 630 л***

Попередньо простерилізований посівний апарат містить 43,2 л простерилізованого розчину солей композиції Б (від ДР 4.4.4.). Після охолодження середовища в асептичних умовах в посівний апарат подають 256,6 л розчину композиції А (від ДР 4.4.3 Після цього в посівний апарат подають 1,5 л розчину композиції В (від ДР 4.4.5). (Здійснення контролю значення рН проводиться за допомогою рН-метра). Як, що значення рН не у межах оптимальних для розвитку продуцента в поживне середовище додають кислоту (від ДР 3.3) або луг( аміачна вода зі складу) залежно від того як рН є на даному етапі. Після цього в інокулятор (ІН-60) передають посівний матеріал (через трубу перетискування від ТП 4.5).

Температура культивування 29-30 °С, рН 6.8-7.0, швидкість перемішування становить 60-200 об/хв, витрати повітря 1 л/л·хв. Тривалість культивування становить 60 годин.

Періодично (кожні 4-6 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення активності ліпази.

## ***ТП. 6. Виробничий біосинтез***

Ферментер (Фр-61) вже містить 432 л простерилізованого розчину солей композиції Б (від ДР 3.5.4). Після охолодження середовища в асептичних умовах в апарат вносять 2566 л розчину композиції А (від ДР 3.5.3). Потім в ферментер подають 15 л композиції В (від ДР 3.5.5) і посівний матеріал (через трубу перетискування від ТП 5.6). Для культивування культури рН поживного середовища має бути 6.8,-7.0. (Здійснення контролю значення рН проводиться за допомогою рН-метра). кислоти (від ДР 3.4) або луг( аміачна вода зі складу) Температура культивування 29-30 °С. швидкість перемішування становить 60-200 об/хв, витрати повітря 1 л/л · хв.

Тривалість культивування становить 60годин.

Періодично (кожні 6 - 8 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю. Також визначають показник синтезу: активність ферменту ліпази.

Після закінчення ферментації відбирають пробу для визначення активність ліпази - близько 1350 од/см<sup>3</sup>. Відпрацьоване повітря йде на знешкодження відходів. Культуральна рідина за допомогою перестильчастого насосу (Н-62) переносять у збірник культуральної рідини (З-63)

### **ТП 7 Відділення біомаси**

#### **ТП 7.1. Фільтрування**

Культуральна рідина об'єм 2.7 м<sup>3</sup> зі збірника об'ємом 3.5 м<sup>3</sup> (З-63) насосом (Н-64) подається у автоматичний фільтр-прес (Ц-65), де здійснюється фільтрування, тривалість становить 1.8 год. Фільтрат об'ємом 2415.6 л, що утворився після закінчення процесу, за допомогою відцентрового насоса (Н-66) подається у збірник об'ємом 2.5 м<sup>3</sup> (З-68) для подальшого процесу в ультрафільтраційній установці (УФ-67).

Вивантаження біомаси здійснюється автоматично та іде на стадію на знешкодження відходів (ЗВ 12.2).

### **ТП 8. Концентрування розчину**

#### **ТП 8.1. Ультрафільтрація розчину**

Фільтрат об'ємом 2415.6 л зі збірника (З-67) за допомогою насоса (Н-69) через фільтр попередньої очистки (Ф-70) подається на фільтраційний модуль (ФМ-71) де протягом 45 хв при температурі 15-20 °С здійснюється фільтрація на мембранах з діаметром пор 32кДа. Концентрат подається 1183.6 л за допомогою насосу (Н-69) переходить у збірник концентрату об'ємом 1.5 м<sup>3</sup> (З-72) для подальшої технологічної стадії. Пермеат відводиться по центральній трубі і передається на знешкодження відходів (ЗВ-12.2).

### ***ТП 9. Сушіння***

#### ***ТП 9.1. Сушіння ліпази***

Зі збірника (З-72) за допомогою відцентрованого насосу (Н-73) концентрат 1183.6 л подається на розпилюючий пристрій розпилювальної сушарки (С-74). Частота обертання 11000 об/хв. Через повітрерозподілюючу голівку надходить гаряче повітря (від ДР 2.3). Сушіння здійснюють при вході гарячого повітря (від ДР 2.3) 130 °С протягом 6 годин до вологості 12%. Температура на виході відпрацьованого повітря має становити 65°С. Температура сухого препарату не більше ніж 45°С.

Гаряче повітря у верхній частині башти біля розпилюючого пристрою зустрічається з розпиленою рідиною, де відбувається швидке випарювання вологи. Сухий порошок падає в нижню частину сушильної вежі і надходить у транспортну тару (ТТ-77). По трубі повітря, що відпрацьовало, разом із частинками порошку надходить у циклон (Ц-75) і вентилятором (В-76) викидається в атмосферу. Порошок із циклона (Ц-75) падає в нижню частину та надходить у бункер.

Після процесу сушіння фермент ліпаза має вигляд порошку, тому немає необхідності подрібнювати та просіювати ліпазу. Порошок масою 4,2 кг подається на подальший етап за допомогою транспортної тари (ТТ-77) на 7 л.

### ***ТП 10. Стандартизація препарату***

#### ***ТП 10.1. Стандартизація препарату***

У бункер-змішувачі (БЗ-78) в ручну завантажуються порошок ферменту ліпази масою 4,2 кг з (ТТ-77) та наповнювач кальцієвого бентоніту 260 кг через ваговий

дозатор (Д-79). Вся суміш переміщується протягом 1 години і за допомогою шнекового транспортера (ШТ-80) подається на (ФМ-81)

### ***ПМВ 11. Фасування та пакування ліпази***

#### *ПМВ 11.1. Фасування стандартизованого препарату ліпази*

Фасування порошку здійснюють на фасувальному автоматі (ФМ-81) у паперові мішки з поліетиленовим вкладишем по 10 кг.

Стандартизований препарат (від ТП 10.1) за допомогою шнекового транспортера (ШТ-80) подається у накопичувальний бункер вагового фасувального автомату, та фасується по 10 кг у паперові мішки з поліетиленовим вкладишем, які формуються на пристрої для формування 3-х шовної упаковки, далі пакети запаюються за допомогою вузла запаювання поздовжнього і поперечних швів упаковки та маркуються.

#### *ПМВ 11.2. Пакування*

Пакування мішків ферментного препарату (від ПМВ 11.1) здійснюється вручну та відвантажуються на склад.

### ***ЗВ 12. Знешкодження відходів.***

#### *ЗВ 12.1 Знешкодження твердих відходів*

Перетворення біомаси у вторинний енергоносій відбувається за допомогою мікроорганізмів. Аеробне перетворення біомаси (компостування) відбувається на повітрі, тепло, яке звільняється при цьому, можна використовувати в теплових насосах або як низькотемпературне тепло. «Біошрот», може бути використаний для годування сільськогосподарських тварин.

#### *ЗВ 12.2 Знешкодження рідких відходів.*

Схема очищення стічних вод включає наступні етапи:

- 1) Механічне очищення. Здійснюється відстоюванням або фільтрацією.
- 2) Біологічне очищення – за допомогою біофільтрів.
- 3) Дезінфекція стічних вод – відбувається остаточне знезараження стоків.

#### *ЗВ 12.3 Знешкодження газоподібних відходів*

Знешкодження відпрацьованого повітря від етапів біосинтезу та сушіння.

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Контроль технологічного процесу ведеться відповідно до вимог GMP. У процесі виробництва контролюють відповідність сировини, допоміжних матеріалів, контролюють санітарний стан цехів та робочих місць, виконання регламентованих технологічних операцій і виконання технологічних режимів роботи. На підставі аналізу критичних точок виробництва складають карту постадійного контролю. До переліку контрольних точок входять лише ті, які, безумовно, потрібні для забезпечення коректного ходу технологічного процесу і випуску якісної продукції, що відповідає вимогам. Нижче наведену карту постадійного контролю до ферментаційних процесів (табл.8.1.)

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ			
Розроб.		Бодарук Д.В..			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Сулейко Т.Л.					96	140
Консультант						<b>Кафедра БТМ 96</b>		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

## Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
<b>ДР 1 ПІДГОТОВКА АЕРАЦІЙНОГО ПОВІТРЯ</b>				
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Висота повітрязабірної труби			H=30 м
Кт 1.2, , Очищення на фільтрі грубої очистки	Ступінь чистоти повітря на виході з фільтра	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря в фільтрі грубого очищення	E = 80% δ = 50 мкм тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснення повітря, температура, тиск, вологість	Манометр Термометр технічний	Під час компресування повітря	P=0,35-0,5 МПа t=200-250 °C W = 60%
Кт 1.4 Охолодження повітря у теплообміннику	Температура	Термометр технічний	Під час проведення процесу	t = 18-20°C
Кт 1.5 Видалення вологи	Волога	Вологомір	Під час проведення процесу	W = 40%
Кт 1.6 Нагрівання повітря	Температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t =40-50 °C, W = 40%

Кт 1.7 Очищення на головному фільтрі	Чистота повітря	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	E = 99 % δ = 1 мкм тиск згідно паспорту
Кт 1.8 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Стерильність повітря	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	E = 99,999% δ = 0,12 мкм
<b>ДР 2 ПІДГОТОВКА СУШИЛЬНОГО АГЕНТА ДЛЯ РОЗПИЛЮВАЛЬНОЇ СУШАРКИ</b>				
Кт 2.1 Забір атмосферного повітря	Висота повітрозабірної труби			H=30 м
Кт 2.2, Очищення на фільтрі грубої очистки	Ступінь чистоти повітря на виході з фільтра	Перевірка ступеня очищення	Під час очистки повітря в фільтрі грубого очищення	E = 80% δ = 50 мкм тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Нагрівання повітря	Температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 140-150 °С,
<b>ДР 3. ПІДГОТОВКА ТИТРУВАЛЬНИХ АГЕНТІВ</b>				
<b>ДР 3.1 ПРИГОТУВАННЯ 6%-ГО РОЗЧИНУ СОЛЯНОЇ КИСЛОТИ</b>				
Кх 3.1.1 Приготування розчину соляної кислоти для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 7 л	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
Кх 3.1.2 Приготування розчину соляної кислоти для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 70 л	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%

Кх 3.1.3 Приготування розчину соляної кислоти для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 630 л	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
Кх 3.1.4 Приготування розчину соляної кислоти для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 5000 л	Концентрація розчину HCl	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C = 6%
<b>ДР 4 Приготування та стерилізація поживних середовищ</b>				
Кт, Км 4.1.1;4.2.1; 4.3.1; 4.4.1; 4.5.1 Підготовка розчину кукурудзяного екстракту	Кукурудзяний екстракт Температура та час Підготовки	Термометр технічний, годинник, технічні ваги, мірний циліндр,	Температура Час	t = 37°C τ = 24 год
Кт, Км 4.1.2;4.2.2; 4.3.2; 4.4.2; 4.5.2 Підготовка розчину соєвого жмиху	Соєвий жми Температура та час підготовки	Термометр технічний, ваги, мірний циліндр,	Температура Час	t = 80-90°C τ = 34-40 хв
Кт, Км 4.1.3;4.2.3; 4.3.3; 4.4.3; 4.5.3 Приготування та стерилізація композиції А	Розчин композиції А, Температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр технічний, манометр технічний, годинник, технічні ваги, мірний циліндр, мікробіологічний контроль	Температура під час стерилізації Мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112°C τ = 1 год p= 0,5 МПа відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.4;4.2.4; 4.3.4; 4.4.4; 4.5.4 Приготування та стерилізація композиції Б	Розчин композиції Б Температура, тиск, час стерилізації, стерильність	Термометр технічний, манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура під час стерилізації Мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 130°C τ = 1 год p= 1,5 МПа відсутність мікробіоти
Кт 4.1.5;	Розчин композиції В	Термометр технічний,	Температура під час	t = 120-126°C

4.2.5;4.3.5;4.4.5;4.5.5 Приготування та стерилізація композиції В	Температура, тиск, час стерилізації ,стерильність	манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	стерилізації Мікробіологічний контроль після стерилізації	$\tau = 1$ год $p = 0.1-0.14$ МПа відсутність мікробіоти
<b>ТП 5 Підготовка посівного матеріалу</b>				
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури	Мікробіологічна чистота культури	мікробіологічний контроль Термометр технічний,	В процесі зберігання колекційної культури	$t = 4^{\circ}\text{C}$ $\tau = 1-4$ місяці відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури	Посівний матеріал, температура та час культивування. Мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник мікробіологічний контроль	В процесі отримання робочої культури	$t = 30^{\circ}\text{C}$ $\tau = 24$ год відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах	Посівний матеріал, температура та час культивування. Мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник мікробіологічний контроль	В процесі отримання вирощування культури	$t = 30^{\circ}\text{C}$ $\tau = 24$ год відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота	Годинник, термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертів контролюються перед культивуванням. Мікробіологічний контроль в кінці процесу вирощування	$t = 30^{\circ}\text{C}$ $\tau = 24$ год $\omega = 250$ об/хв відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Кх, Км 5.5 Вирощування ПМ в інокуляторі 7 л</p>	<p>Посівний матеріал, рН, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культуро-морфологічна відповідність організмів,</p>	<p>Датчик рН, датчик рО<sub>2</sub>, годинник, термометр, технічний, тахометр, витратомір, манометр,</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в інокуляторі</p>	<p>рН=6 t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 250 об/хв, 0,7 л*л/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Кх, Км 5.6 Вирощування 3 ПМ в інокуляторі 70 л</p>	<p>Посівний матеріал, рН, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культуро-морфологічна відповідність організмів,</p>	<p>Датчик рН, датчик рО<sub>2</sub>, годинник, термометр, технічний, тахометр, витратомір, манометр,</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в інокуляторі</p>	<p>рН=6 t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 250 об/хв, 0,7 л*л/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Кх, Км 5.7 Вирощування ПМ в інокуляторі 630 л</p>	<p>Посівний матеріал, рН, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культуро-морфологічна відповідність організмів,</p>	<p>Датчик рН, датчик рО<sub>2</sub>, годинник, термометр, технічний, тахометр, витратомір, манометр,</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в інокуляторі</p>	<p>рН=6 t = 30 °С, τ = 24 год, ω = 250 об/хв, 0,7 л*л/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<b>ТП 6. Виробничий біосинтез</b>				
<p>Кт, Кх, Км 6.1 Виробничий біосинтез у ферментрі 5 м<sup>3</sup></p>	<p>Посівний матеріал, рН, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культуриморфологічна відповідність організмів, <b>Культуральна рідина</b> Концентрація цільового продукту</p>	<p>Датчик рН, датчик рО<sub>2</sub>, годинник, термометр, технічний, тахометр, витратомір, манометр,</p>	<p>рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі, Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування Концентрацію цільового продукту вимірюють кожні 8-10 год</p>	<p>рН=6.8-7.0 t = 30 °С, τ = 60 год, ω = 250 об/хв, 0,7 л*л/хв, Відсутність сторонньої мікробіоти 1350 Од/мл</p>

## 8.2. МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ

Упродовж культивування періодично (кожних 6-8 години) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

**Першим етапом є мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища.**

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем: СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій.

**Стерилізація чашок Петрі.** Перед стерилізацією лабораторний посуд миють і сушать. Чашки Петрі стерилізують сухим жаром при температурі 180 °С і 160 °С відповідно 1 годину і 150 хвилин загорнутими в папір по 1-10 штук.

**Підготовка чашок Петрі.** У попередньо простерилізовані в сухожаровій шафі чашки Петрі розливають по 20-30 мл розплавленого на киплячій водяній бані поживного середовища. Чашки залишають на рівній поверхні для рівномірного застигання агару і витримують протягом 2-3 діб при температурі 30 °С кришками донизу.

Посів здійснюють шляхом відбору стерильною піпеткою 0,1 мл з об'єма проби простерилізованого поживного середовища і нанесення її на поверхню відповідного поживного середовища. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у термостат для інкубації [40].

На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту будь-яких мікроорганізмів, що буде свідчити про те що поживне середовище є повністю стерильне і може використовуватися для процесу біосинтезу ферменту.

**Другим етапом мікробіологічного контролю є перевірка культуральної рідини на чистоту (у пробах повинні бути тільки колонії біологічного агента – *Rhizopus japonicus* 1403).**

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопіюванням. Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) - для виявлення дріжджів і грибів.

Після інкубації посівів на середовищах МПА не повинно бути виявлено ріст мікроорганізмів, а на середовищі ГКА – не повинно бути виявлено ріст сторонньої мікрофлори. Мікробіологічний контроль здійснюють кожні 6-8 годин [41].

Пробу культуральної рідини відбирають в строго асептичних умовах. Для відбору проб на ферментері встановлено спеціальні пробовідбірники. Для того, щоб при відборі проб до апарату не потрапляла стороння мікрофлора з оточуючого середовища, пробовідбірники оснащені спеціальною арматурою. Перевіряють проби у центральній заводській лабораторії [40].

Для перевірки застосовують «Чашечний метод». Цей метод знайшов широке застосування для встановлення кількості мікроорганізмів у натуральних та синтетичних субстратах. Вважають, що кожна жива клітина при посіві на щільне поживне середовище утворює колонію.

При перевірці чистоти маточної культури та культуральної рідини під час основної ферментації, у пробах повинні виявлятися лише колонії біологічного агента – *R.japonicus* 1403, в іншому випадку продукція вважається бракованою.

Для того, щоб отримати окремі колонії, проби матеріалу, що досліджується, попередньо десятикратно розводять за методом Коха. З цією метою стерильну воду або ж фізіологічний розчин (0,5 %-ий розчин хлориду натрію) розливають по 5 мл у стерильні сухі пробірки. 1 мл вихідної проби асептично вносять у першу пробірку, закривають ватною пробкою, добре перемішують і отримують 1 розведення – 1:10 [40].

Отриману у першому розведенні суспензію за допомогою стерильної піпетки добре перемішують, затыгуючи до піпетки і видувають з неї суспензію декілька разів. Потім цією ж піпеткою беруть 1 мл розведення і переносять до другої пробірки з 9 мл води – 2 розведення – 1:10<sup>2</sup>. Беруть нову піпетку і так само готують

З розведення –  $1:10^3$ , проводять розведення до  $1:10^8$ . Два останні розведення висівають на чашки Петрі із СА, при чому кожне розведення висівають на 3 різні чашки. Посів роблять мікробіологічною петлею над полум'ям пальника. Петлею відбирають розведення, відкривають чашку Петрі над вогнем з одного боку і зигзагом (штрихом) проводять петлею по поверхні середовища. Чашку закривають і ставлять до термостату при  $37^\circ\text{C}$  [40]. Також роблять відповідно посіви на середовище що містить агар з 0,5 % глюкозою та густого середовища «Сабуро». Відношення посівної дози до обсягу живильного середовища має становити 1:10 або 1:20.

Посівний матеріал розподіляють по всій поверхні поживного середовища на чашках Петрі.

Культуральні ознаки *Rhizopus japonicus*. На поверхні щільних поживних середовищ утворює колонії. Колонії швидко ростуть і покривають поверхню агару щільним бавовняним наростом, який спочатку білий стає сірим або жовтувато-коричневим зі спороношенням [89].



**Рис 8.1.** Колонія *Rhizopus* на картопляному декстрозному агарі,  $25^\circ\text{C}$ , 4 дні [90].

Для мікроскопіювання використовують препарати «роздавлена крапля».

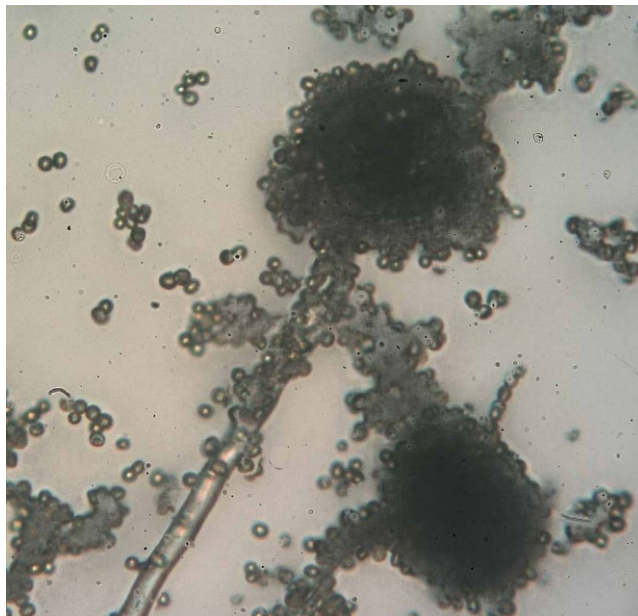
Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою.

Для приготування препарату на чисте знежирене скло в асептичних умовах для запобігання контамінації з допомогою стерильної петлі нанести невелику краплю культуральної рідини та розподілити по склу ( діаметр мазка має бути 1 см). Висушують при кімнатній температурі, поки вся волога не випарується. І проводять мікроскопіювання в об'єктиві 40x та також з імерсійною системою для цього на сухий препарат за допомогою скляної палички потрібно нанести 1-2 краплі імерсійного масла. Після всієї роботи потрібно за допомогою вати та етилового спирту протерти залишки масла з імерсійного об'єктива мікроскопа .

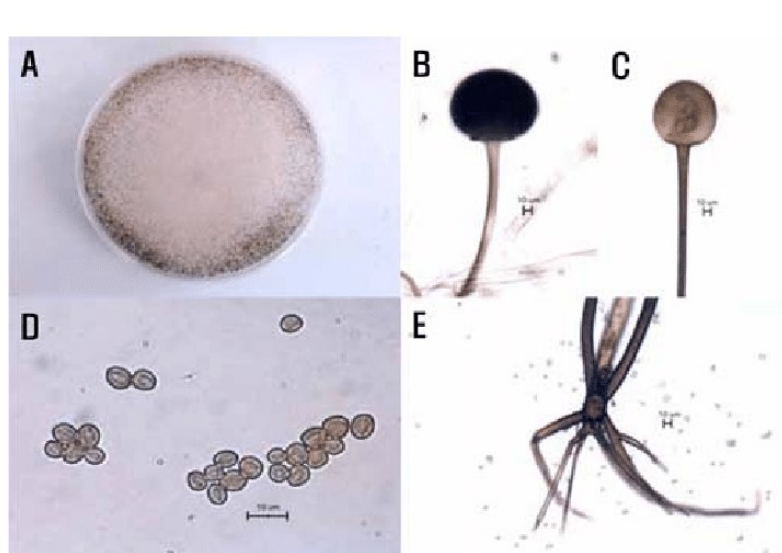
За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти ми побачимо клітини *Rhizopus japonicus*.

### **Морфологія клітини.**

На синтетичному агаризованому середовищі Чапека з пептоном росте добре. На 1 добу колонії без кольору, волокнистий міцелій. На 2-3 добу утворюються спори. На середовищі з кукурудзяним екстрактом утворює повітряний міцелій [91].

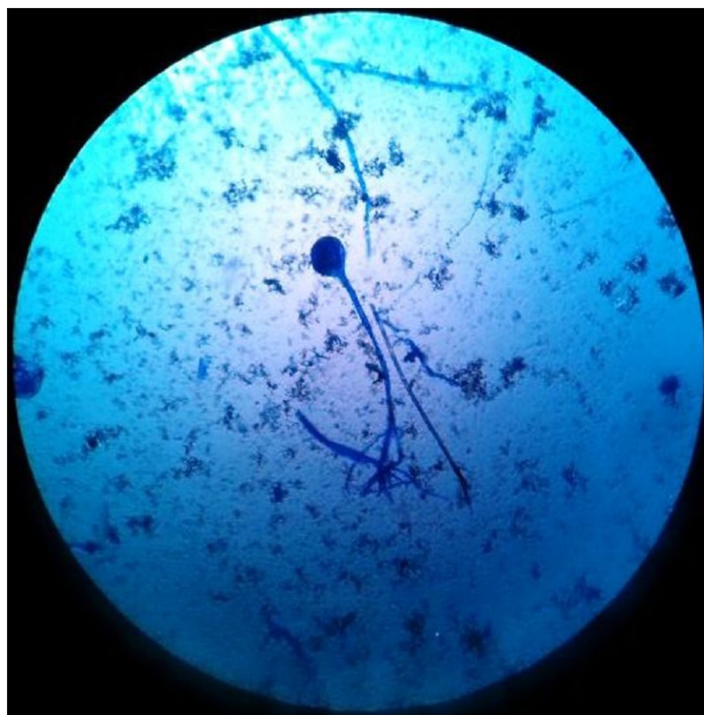


**Рис.8.2.** *Rhizopus* – збільшення 400x [92].



**Рис.8.3.** Морфологічна характеристика *Rhizopus oryzae*, виділеного з *Rubus crataegifolius*.

(А) Колонія на КПК через 7 днів після інкубації, (В) Спорангій та спорангієнофор, (С) Колумелла, (D) Спорангіоспори, (Е) Ризоїди. [93].



**Рис 8.4** Мікроскопія, що показує нерозгалужену спорангіоспору з ризоїдами *Rhizopus* [94].

### 8.3. ПОКАЗНИКИ РОСТУ І СИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

#### Підготовка проби

Під час процесу та по закінченню ферментації відбирають пробу, далі розчин відфільтровують, для відділення біомаси. Отриманий фільтрат (супернатант) одержують після центрифугування використовують у дослідженні.

#### 8.3.1. КОНЦЕНТРАЦІЯ БІОМАСИ

Концентрацію біомаси визначаємо за оптичною густиною клітинної суспензії із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком. Культуральна рідина розводиться дистильованою водою у співвідношенні 1:9. Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина (при 540 нм), отримані дані перераховують за калібрувальним графіком.

Визначення біомаси складається із трьох послідовних операцій:

1. Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення,
2. Відокремлення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини,
3. Визначення їх маси.

Біомасу зазвичай виражають у грамах або міліграмах на літр культуральної рідини.

1. Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення. Із цією метою фільтри, попередньо покладені у відкриту чашку Петрі, або центрифужні пробірки розміщують у сушильну шафу й висушують протягом 1-2 год. при температурі 80-85°C й 90-100°C відповідно. Потім чашку Петрі з фільтрами або центрифужні пробірки виймають із сушильної шафи й переносять в ексікатор з безводним хлористим кальцієм ( $\text{CaCl}_2$ ) або концентрованою сірчаною кислотою. Ексікатор ставлять біля аналітичних вагів, на яких буде проводитися зважування. Через годину фільтри (центрифужні пробірки) зважують із точністю до 0,0001 г. Висушування й зважування повторюють, дотримуючи зазначеної послідовності операцій, доки маса не досягне постійного значення, тобто коливання в її значеннях не перевищать  $\pm 0,0001$  г.

2. Відокремлення мікроорганізмів фільтруванням. Міцелій актиноміцетів і грибів відокремлюють фільтруванням. Паперовий фільтр розміщують у скляну лійку й фільтрують через нього точно виміряний обсяг культури, від 5 до 10 мл. Осад на

фільтри багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою. Щоб прискорити фільтрування, колбу підключають до водострумного насосу. Осад кілька разів промивають підкисленою дистильованою водою.

3.Визначення біомаси. Режим висушування й зважування той же, що використовується й при визначенні маси пробірок або фільтрів. Сушу біомасу визначають за формулою: (8.1).

$$M = \frac{(A-B)1000}{V}, \quad (8.1).$$

де М - суша біомаса в г/л;

А - маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом у г;

В - маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду в г;

V - обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) у мл.

Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища й ретельністю зважування [95].

### 8.3.2. Концентрація цільового продукту

#### Визначення активності ліпази за модифікованим методом Ота-Ямада.

Метод заснований на визначенні шляхом титрування лугом жирних кислот, що утворилися під дією ліпази при використанні в якості субстрату оливкового масла.

Для проведення цього аналізу необхідні такі реактиви: розчин оливкової олії (субстрат); 2% -й розчин полівінілового спирту; 1 н розчин соляної кислоти; 0,05 н розчин лугу, фосфатно-цитратний буфер з рН 7,0; 1% -й розчин фенолфталеїну; 90% -й розчин спирту; 1% -й розчин ферменту.

**Прилади й обладнання:** бюретка для титрування, термостат, мішалка, ступка фарфорова, конічні колби з притертою пробками на 100 мл, піпетки, пробірки.

**Приготування субстрату.** 100 см<sup>3</sup> оливкового масла змішують 150 см<sup>3</sup> 2% -го розчину полівінілового спирту в емульсатор. Отриману емульсію витримують на льоду протягом 60 хв. Якщо розшаровування НЕ спостерігається, субстрат придатний до використання.

**Приготування розчину полівінілового спирту.** 20 г спирту поміщають в мірну колбу на 1 дм<sup>3</sup> і додають 800 см<sup>3</sup> дистильованої води. Суспензію витримують протягом 30 хв при кімнатній температурі, потім додають 0,5 см<sup>3</sup> 1 н розчину соляної кислоти і безперервно перемішують при температурі 80-90 ° С протягом 1 ч. Потім розчин охолоджують, доводять до рН 7,0 розчином лугу, обсяг доводять до 1 дм<sup>3</sup> дистильованої водою і отриманий розчин фільтрують

**Проведення досліду:** 5 см<sup>3</sup> емульсії - субстрату і 4 см<sup>3</sup> буфера з рН 7,0 поміщають в колбу на 100 см<sup>3</sup>, яку закривають пробкою. Суміш витримують на водяній бані при температурі 37 ° С протягом 10 хв. Потім до суміші додають 1 см<sup>3</sup> розчину ферменту і добре перемішують. Отриману суміш витримують при температурі 37 ° С протягом 60 хв, після чого негайно додають 30 см<sup>3</sup> етанолу для припинення реакції. Розчин титрують 0,05 н розчином лугу в присутності 1% -го розчину фенолфталеїну до появи забарвлення. Контрольну пробу готують наступним чином. До суміші субстрату і буфера з рН 7,0, витриманої при температурі 37 ° С додають 30 см<sup>3</sup> етанолу, потім 1 см<sup>3</sup> ферментного розчину і суміш негайно титрують. Різниця між результатами титрування контрольної і дослідної проб відповідає кількості 0,05 н розчину лугу, яке пішло на нейтралізацію жирних кислот під дією ферменту.

Ліпазну активність ферменту ЛА (в од/г) визначають за формулою (8.2).

$$ЛА = \frac{A \cdot T \cdot 50}{V} \quad (8.2),$$

де ЛА - ліпазная активність ферменту, од / г;

А - різниця між результатами титрування дослідної та контрольної проб, см<sup>3</sup>;

Т - титр лугу, г / мл (0,001996 г / мл);

В - концентрація зразка ферментного розчину, г / см<sup>3</sup> .

50 - коефіцієнт перерахунку в мкмоль жирних кислот [96,97].

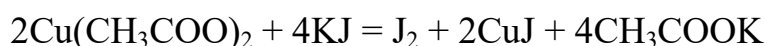
### **8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту**

**Джерело азоту:** кукурудзяний екстракт, соєва макуха.

**Концентрація амінного азоту.** Ще одним джерелом азоту в середовищі для культивування *R.japonicus* 1403 є кукурудзяний екстракт, який містить 1-3% амінного азоту. Його вміст визначають методом К'ельдаля.

В основі методу К'ельдаля лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  у боратному буферному розчині. При цьому утворюються добре розчинні мідні з'єднання синього кольору. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді.

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



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



Хід визначення. В мірну колбу місткістю 50 мл піпеткою вносять 5 см супернатанту (отримують центрифугування протягом 20 хв. при 8000 об/хв), додають 3-4 краплини індикатору тімолфталеїну і по краплях розчин гідроксиду натрію концентрацією до появи блідо-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 мл суспензії ортофосфатуміді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують. Фільтрат повинен бути прозорим. 10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, додають 0,5 мл 80%-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього

забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію. 1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту [98].

Вміст амінного азоту в соєвій макухі визначали методом формольного титрування [99].

**Визначення амінного азоту формольним титруванням (алкаліметрія за методом Серенсена).**

Метод засновано на блокуванні формальдегідом при рН 7,0 вільних аміногруп і титруванні лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично

**Обладнання та реактиви:** мірний стакан 50 мл; піпетки на 2мл; автоматичні потенціометричні титратори; очищена вода , розчин NaOH 0,1М або HCl 0,1М, нейтральний формалін.

**Техніка визначення:** В стакан об'ємом 50 мл наливають 2 мл дослідного розчину поживного середовища і доводять об'єм водою очищеною до 20 мл. Коригують рН потенціометрично до значення 7,0 за допомогою розчину NaOH 0,1М або HCl 0,1М. До нейтрального розчину додають 2,0 мл нейтрального формаліну (рН доводять до 7,0 10 %-им розчином NaOH), перемішують і титрують потенціометрично до рН 9,1 за допомогою розчину NaOH 0,1М. Вміст амінного азоту у зразку (в мг %) визначають за формулою (8.3):

$$X = V \cdot K \cdot 1.4 \cdot 100 / 2 \text{ де,} \quad (8.3)$$

V – кількість розчину NaOH 0,1М в мл, що пішла на титрування проби;

K – поправка до титру розчину NaOH 0,1М, що використовувався;

1.4 – кількість амінного азоту в мг, еквівалентна 1 мл розчину NaOH 0,1М;

2 – об'єм зразка, мл [99].

**Джерело вуглецю:** олеїнова кислота.

Для визначення жирних кислот виконували газохроматографічне дослідження за методом Й.Ф.Рівіса і співавторів.

Аналіз жирокислотного складу ліпофільної фракції здійснювали методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот на газовому хроматографі

«Селміхром-1» з полум'яно-іонізаційним детектором. Колонка газохроматографічна, стальна, завдовжки 2,5 м із внутрішнім діаметром 4 мм, наповнена нерухою фазою –інертном, обробленим 10% діетиленглікольсукцинатом (DEGS).

На хроматографі встановлено такі параметри роботи:

- температура термостату колонок – 180 °С;
- температура випарника – 230 °С;
- температура детектора – 220 °С;
- швидкість потоку газу-носія (азот) – 30 см<sup>3</sup>/хв;
- об'єм проби – 2 мм<sup>3</sup> розчину у гексані.

Для визначення вмісту кислоти аліквоту супернатанта 0,2 мл екстрагували двома обсягами гексана. Ідентифікацію ефірів жирних кислот проводили за часом утримування піків у порівнянні зі стандартною сумішшю. Розрахунок складу метилових ефірів проводили методом внутрішньої нормалізації за загальноприйнятою методикою.

В якості стандартів використовували стандарти насичених і ненасичених метилових ефірів жирних кислот фірми «Sigma». Метилові ефіри жирних кислот одержували за модифікованою методикою Пейскера, яка забезпечує повне метилування жирних кислот. Для метилування використовували суміш хлороформу з метанолом і сірчаною кислотою у співвідношенні 100:100:1. Межа виявлення жирних кислот – 0,01%[100].

## 8.4 ПОКАЗНИКИ ЯКОСТІ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ

### 8.4.1 Визначення активності стандартизованого ферментного препарату

**Принцип методу.** Проводять визначення кількості жирних кислот, що утворюються при дії ліпази на жир. Утворені кислоти титрують гідроксидом натрію і розраховують активність ліпази.

**Необхідні реактиви:** ацетатний буферний розчин, рН 4,7; 0,2 М боратний буферний розчин, рН 8,5; 0,1 н гідроксид натрію; соняшникова олія; етиловий спирт, ефір, 1% -й розчин тимолфталейну в спирті.

**Підготовка рослинного масла:** 300 г соняшникової олії збовтують в ділильної воронці з 2%-м розчином луку, дають відстоятися і зливають лужний розчин. Масло промивають у воронці кілька разів водою до негативної реакції з фенолфталеїном. Потім промивають масло відстоюють і сушать, пропускаючи через колонку з хлористим кальцієм.

**Прилади й принадлежності:** бюретка для титрування, термостат, мішалка, ступка фарфорова, конічні колби з притертою пробками на 100 мл, піпетки, пробірки.

**Хід роботи:** 2 г ферментного препарату змішують в двох ступках з 1 мл чистого соняшникової олії в кожній ступці. Для визначення активності кислих ліпаз в ступку доливають 5 мл ацетатного буфера рН 4,7, а для активності лужних - 5 мл боратного буфера рН 8,5 і деякий час розтирають вміст ступок. Розтертий препарат переносять в конічні колби з пробками, залишки зі ступки змивають в колбу 5 мл води, додають по 5 крапель толуолу, закривають пробками і ретельно перемішують в мішалці. Колби ставлять в термостат при 30 °С на 20-24 год. У якості контрольних проб беруть такі ж два навішування і обробляють їх так само, як і попередні, але перед тим, як ставити в термостат, колби кип'ятять 5-10 хв для інактивації ферменту

Після інкубації в термостаті в усі колби додають по 50 мл етанольно-ефірну суміш (4: 1) і збовтують. Після відстоювання титрують 0,1 н спиртовим розчином NaOH, додавши кілька крапель тимолфталеїну.

Активність кислих і лужних ліпаз виражають в мл 0,1 н NaOH, що пішли на нейтралізацію жирних кислот, що утворилися в результаті дії ліпаз, по формулі (8.4).

$$X = \frac{a \times T - b \times T}{c}, \quad (8.4)$$

де X - активність ліпази;

a - кількість 0,1 н NaOH, який пішов на титрування дослідної проби, мл;

b - кількість 0,1 н NaOH, який пішов на титрування контрольної проби, мл;

T - поправка до титру 0,1 н NaOH;

с - маса ферментного препарату, г [101]. Активність готового препарату має бути 10 000 од/г [102].

#### 8.4.2. ВИЗНАЧЕННЯ ВОЛОГОСТІ

Вологість сухого ферментного препарату повинна становити 10-12%.

Визначення вологості після сушіння проводять за допомогою аналізатора вологості RADWAG MA 50.R (рис. 8.5).



Рис. 8.5. Аналізатор вологості RADWAG MA 50.R

Аналізатор вологості - професійний прилад для контролю вмісту вологості в зразку із удосконаленою технологією висушування зразка.

Даний аналізатор слід віднести до непрямого вимірювання вмісту вологості.

**Принцип визначення вологості продукту:** зразок продукту поміщають до сушильної камери та проводять визначення різниці маси зразка до і після його висушування. Висушування відбувається до тих пір поки даний зразок не буде мати вагу, що не змінюється при подальшому нагріванні. Аналізатор вологості забезпечений системою калібрування маси тари, який дозволяє отримати результат вимірювання із високою точністю. Максимальна маса аналізованої речовини становить 200 грам. Мінімальна маса аналізованої речовини становить 50 грам.

Діапазон вимірювання вмісту вологості становить від 0...100%. Відносна точність вимірювання вмісту вологості приблизно 0,01%. Час необхідний для проведення експрес-аналізу вмісту вологості від 1...60 с [103].

## РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

### ОПИС АПАРАТУРНО-ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

Після концентрування культуральної рідини методом ультрафільтрації, концентрат передається в збірник 1 для проведення подальшої обробки за допомогою насоса 2 подається в сушильний апарат 3.

За допомогою розпилювальної сушки можна досить швидко висушувати розчини і отримувати подрібнений сухий продукт.

Тривалість розпилювальної сушки невелика, перебування продукту в сушарці становить не тривалий період 5-8 с., незважаючи на досить високі температури теплоносія на вході і виході, препарат не нагрівається більше 35-40 °С. Переваги даної сушарки:

- висушений продукт може бути упакований відразу після сушіння без необхідності подрібнення та просіювання;
- покращена чистота одержуваного продукту;

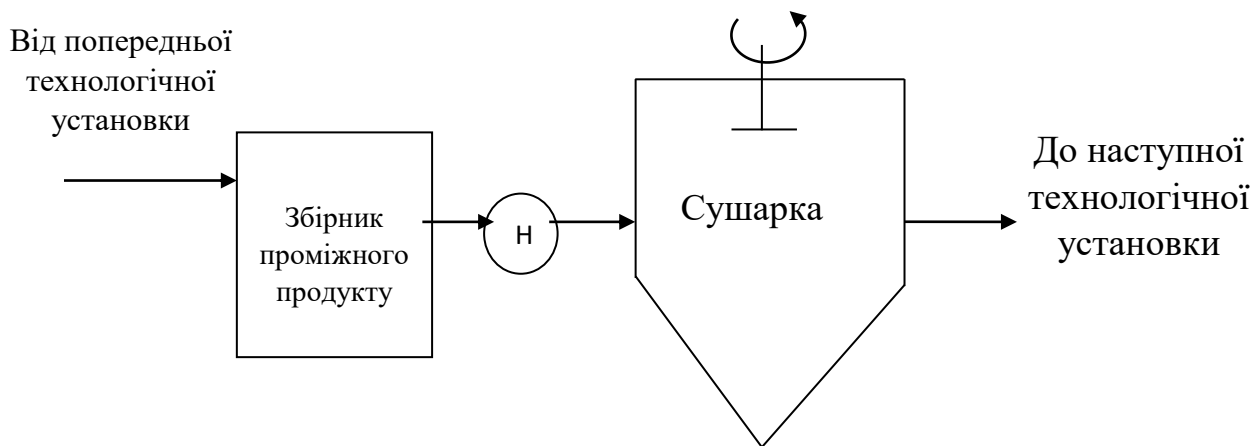
#### ***Принцип роботи розпилювальної сушарки:***

Вологий продукт за допомогою насоса подається до диска для розпилення, який обертається з частотою 10 000 об/хв, і під впливом відцентрової сили виходить на великій швидкості за межі диска, розпорошуючись у сушильній камері. Гаряче повітря, яким здійснюється сушка, надходить через кільцевої отвір в камеру над обертовим диском і за рахунок наявних там спеціальних напрямних переміщається в сушильній камері по спіралі.

Для управління процесом сушіння і реєстрації робочих параметрів установка оснащується контрольно-вимірювальними приладами і засобами автоматики.

Вимірювальні прилади сучасної розпилювальної сушарки, повинні контролювати всі істотні параметри процесу, включаючи температуру сушильного повітря на вході в основну камеру і в апарати, а також температуру повітря в камері.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ</b>					
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва</b>					
Розроб.	Бондарук Д.В.							Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Сулейко Т.Л.							116	140	116
Консультант	Клименко							<b>Кафедра БТМ</b>		
Н.Контр.										
Затверд.	Пирог Т.П.									



*Рис. 9.2. Машинно-апаратурна схема процесу сушіння*

Отже, автоматизація розпилювальної сушарки повинна забезпечувати:

1. Контроль за рівнем рідини у збірнику з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня.
2. Управління насосом перекачки рідини («включено», «відключено») із збірника у сушарку.
3. Контроль температури повітря на вході в сушильну камеру.
4. Контроль і регулювання температури в сушильній камері.
5. Контроль і управління частотою обертання розпилюючого пристрою.

*Таблиця 9.1*

### ЗАВДАННЯ НА РОЗРОБКУ СХЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

№	Машина, апарат	Параметр	Значення параметру, допустимі відхилення	Система автоматизації		
				Вид СА	Характер контролю, регулювання, управління	Засоби управління та контролю
1	Збірник проміжного продукту	Рівень проміжного продукту	85%±3%	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
2	Насос подачі до розпилювальної сушарки	Стан насосу подачі: з збірника в сушарку	Ввімкнено/ Вимкнено	Управління	Ручне/дистанційне	Пуск/зупинка з АРМ оператора

3	Розпилювальна сушарка	Температура повітря на вході в камеру	$130 \pm 2^{\circ}\text{C}$	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
4		Температура в камері	$80 \pm 2^{\circ}\text{C}$	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Дія на подачу теплоносія у апарат
5		Частота обертання розпилюючого пристрою	10 000 об/хв.	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Управління	Пуск/стоп, зміна частоти	Частотний перетворювач

### ОПИС ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ СХЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

Так у відповідності з завданням, сформованим у таблиці 9.1 опишемо схему автоматизації.

Для комутації силових мереж обмоток електродвигунів насосів та розпилювального ротора в технологічній схемі сушіння ферменту ліпази використовують магнітні пускачі, що забезпечують кожухом і вмонтовують на стіні або стійці біля заданого апарату. До пускача підводиться трьохфазна мережа змінної напруги 380 В, частотою 50 Гц.

У **першому контурі** автоматичного контролю, в збірнику для проміжного продукту необхідно контролювати рівень даного продукту, яка має становити  $85\% \pm 3\%$ . Концентрат, який поступає в апараті контролюється рівень суміші датчиком рівня LE 1а. Принцип дії датчика рівня полягає в тому, що при русі суміші знизу догори при досягненні датчика він автоматично замикається та посилає сигнал на контролер.

У **другому контурі** автоматичного контролю, насос, необхідно контролювати ввімкнення та вимкнення апарату. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Для управління передбачається зміна за допомогою кнопки Пуск/Стоп.

Схемою передбачено:

-управління з АРМа оператора включенням - відключенням насосів.

-ручне управління з щита перетворювачів включенням - відключенням насосів;

-аварійне відключення насосів кнопкою, розташованою «по місцю» біля насоса.

Для забезпечення безаварійної роботи насосів необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» з щита управління SB2, та безпосередньо біля насосів («по місцю») SB1. Для вибору місця з якого саме буде здійснюватись управління використовується тумблер SA1 (перемикач). Подача напруги на двигуни насосів здійснюється за допомогою магнітних пускачів KM1. Лінія зв'язку позначена цифрою 2.

У **третьому контурі** автоматичного контролю, в розпилювальній сушарці необхідно контролювати температуру повітря на вході у сушильну камеру, яка має регламентоване значення  $130 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Спостереження за зміною температури передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Температура вимірюється датчиком термопари (2а). Сигнал від датчика подається на контролер.

У **четвертому контурі** автоматичного контролю і управління, в розпилювальній сушарці необхідно контролювати і регулювати температуру в камері, яка має регламентоване значення  $80 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Спостереження за зміною температури передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок подачі гарячого повітря у сушильну камеру.

Температура вимірюється датчиком термоперетворювачем опору (3а). Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від температури здійснюється управління подачею повітря регулюючим органом - пневматичним регулюючим клапаном (3в), що приводиться в дію за допомогою перетворювача електропневматичного (3б). Лінії зв'язку позначені цифрами 4,5.

У п'ятому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати частоту обертання розпилюючого пристрою, яка має регламентоване значення 10000 об/хв.

Спостереження за зміною частоти обертання передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Для управління частотою обертання ротора передбачається її зміна за допомогою частотного перетворювача (4а). Для забезпечення безаварійної роботи необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» а безпосередньо біля насосів («по місцю») SB3.

Таблиця 9.2

### СПЕЦИФІКАЦІЯ НА ПРИЛАДИ ТА ЗАСОБИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

№	№ позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
1	2	3	4	5
1	1а	Ємнісний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000мм, максимальна допустима температура +1250С, максимальний допустимий тиск 10бар, під'єднання G5/4, аналоговий вхід, точність 2мм	NMC	Kobold.
1	2а	Цифровий термометр з термопарою К-типу і датчиком температури повітря, клас точності – 1%, діапазон вимірювань: -50...750 °С . аналоговий вхід	HYELEC MS6501	<a href="#">Hyelec</a> (Китай)
2	3а	Датчик температури - термоперетворювач опору, вихідний сигнал 4...20 мА, клас точності – 0,25%, діапазон вимірювань: -50...200 °С . Матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, аналоговий вхід	50M	«ТЕРА» (Україна)
3	3б	Перетворювач електропневматичний, вхідний сигнал 4...20 мА, вихідний сигнал 20–100 кПа, номінальний тиск 140 кПа. Клас точності – 1% . аналоговий вихід	ЭП-132 4	<a href="#">ЧП "КОМП"</a> (Україна)
4	3в	Клапан регулюючий пневматичний, управляючий сигнал 20-100 кПа, допустима максимальна температура 550 °С .	GV2	Doruk Endustri (Туреччина)
5	4а	Частотний перетворювач, потужність – 1,5 кВт, вихідна напруга - 220В . аналоговий вихід	VFD015M21 А.	Delta (Тайвань)

6	KM1	Магнітний пускач, робочий струм 400А, потужність двигуна 200кВт, управляючий сигнал 220В	3RT1075- 6AP36	SIEMENS
7	SA1	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний- ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210- 2DA11	SIEMENS
8	SB1 – SB3 ,	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato

Примітка\* датчики <https://prom.ua/>

## РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

### 10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

- 1. Санітарна підготовка виробництва.** Даний етап включає щоденне і генеральне прибирання приміщення із застосуванням миючих засобів «Естер дез» і «Тетрамін». Після обробки відпрацьований мийний розчин надходить до каналізації. Миття резервуарів обладнання здійснюють автоматично з допомогою СІР-мийки із застосуванням засобу «Біомой». *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії рідких відходів.*
- 2. Санітарна підготовка працівників.** Даний етап включає щоденне застосування деззасобів «Біолонг» та «АХД 2000 гель», для обробки рук персоналу. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії твердих відходів(упаковки від даних засобів) та рідких відходів( залишки деззасобів).*
- 3. Підготовка аераційного повітря .** На даному етапі у фільтрі грубого очищення затримується пил та механічні частки . *Передбачаємо, що даний етап є місцем невеликих об'ємів емісії твердих відходів.*
- 4. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу.** На даному етапі можливість виявлення невідповідності сировини заявленим нормам. *Даний етап є місцем емісії твердих відходів(накувальний матеріал від сировини для приготування поживного середовища)*
- 5. Підготовка посівного матеріалу.** Етап передбачає отримання посівного матеріалу в інокуляторах, відходи від посівного матеріалу не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів. Продуцент ліпази належить до облигатних аеробів, під час культивування необхідно забезпечити достатній рівень аерації 0,7 л\*л/хв. поживного середовища. Відповідно, у процесі культивування виникає великий об'єм відпрацьованого повітря. Оскільки

					НУХТ БТЕК 04.02.31 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарук Д.В.			РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Сулейко Т.Л.					122	140
Консультант						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

продуцент належить до грибів, відпрацьоване повітря на виході з інокулятора буде містити аерозоль зі спорами. *Даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*

6. **Виробничий біосинтез.** Даний етап передбачає отримання культуральної рідини, у якій накопичується цільовий продукт – фермент ліпаза. Оскільки культуральна рідина далі надходить до збірника для виділення цільового продукту, рідкі відходи на даному етапі не враховуємо. *Даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів(відпрацьоване повітря)*
7. **Фільтрування.** На даному етапі культуральна рідина фільтрується для наступної стадії. Супернатант, що утворився після закінчення процесу подається у збірник для подальшого процесу очищення . Вивантаження біомаси здійснюється автоматично шнеком. *Даний етап є місцем емісії великих об'ємів твердих відходів (біомаса).*
8. **Ультрафільтрація.** Розчин фільтрують на ультрафільтрувальних мембранах. Промивання мембран здійснюють водою. Утворений концентрат – іде на наступну стадію сушіння. *Даний етап буде місцем емісії рідких відходів(пермеат)*
9. **Сушіння ферментного препарату.** Даний етап передбачає виділення залишкової вологи із ліпази здійснюють у розпилювальній сушарці. Після процесу сушіння має вигляд порошку, тому немає необхідності подрібнювати та просіювати. Сушіння проводять до отримання вмісту сухих речовин у готовому продукті – не менше 93%. Процес супроводжується виділенням газу-носія– відпрацьованого повітря, який містить аерозоль механічних часток від сухого препарату. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії газоповітряних відходів( відпрацьоване повітря)*
- 10.**Стандартизація.** На даному технологічному етапі здійснюється стандартизація сухого порошку ліпази з наповнювачем до певного значення активності. *Даний етап є місцем емісії твердих відходів(пакувальний матеріал від наповнювача).*
- 11.**ПМВ.** На даному технологічному етапі здійснюється пакування готового

препарату. *Даний етап є місцем емісії твердих відходів( залишки та брак пакувального матеріалу)*

## **10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва**

Екологічна спрямованість біотехнологій є насамперед, у вирішенні проблем довкілля, які виникають як негативний наслідок діяльності людини. При цьому враховується особливість і мінливість навколишнього середовища.

Повинно бути розроблено спеціальне інженерне-технічне забезпечення біотехнологічних виробництв і можливість утилізації відходів.

Відходи біотехнологічних виробництв, як правило, розкладаються в природних умовах під дією різних факторів (біологічних - мінералізація за участю мікроорганізмів, хімічних - окислювання, фізико-хімічних завдяки комплексному впливу, наприклад, променистої енергії й хімічних речовин).

### **10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів**

Рідкі відходи піддають мікробіологічному обробленню (анаеробному або аеробному). Стічні води підприємств нерівноцінні, одні з них можна назвати умовно чистими, оскільки вони майже не відрізняються від споживаної у виробництві природної води (конденсату, вода з теплообмінників). Інші є забрудненими неорганічними та органічними домішками, що потрапляють: 1) від сировини; 2) від устаткування (миття технологічної апаратури). Чисті води можуть бути використані повторно у технологічних процесах, або спрямовані в чисті водойми; забруднені води звільняють від механічних домішок, а потім спрямовують на знешкодження.

Усі рідинні стоки виробництва можуть бути поділені на потоки основного й допоміжного виробництва. До стічних вод основного виробництва належить передусім відпрацьована культуральна рідина, що утворюється при відокремленні біомаси від рідкої фази, яка становить 80 % від загального обсягу стоків виробництва. До цієї групи належать також потоки зрошувальної води системи газоочищення, промивні води, вода від промивання устаткування, вода з охолоджувальних систем. Стоки допоміжного виробництва після очищення можуть використовуватися для підживлення оборотних охолоджувальних систем водопостачання у виробництві, а також для компенсації втрат води при

випаровуванні та краплинному винесенні на градирнях. Підвищення ефективності очищення рідинних потоків біотехнологічних виробництв пов'язане з удосконаленням основного технологічного процесу. Одним із таких підходів є повторне використання відпрацьованої культуральної рідини на стадії культивування, що призводить до зниження загальної витрати водоспоживання у виробництві, сировини (елементів мінерального живлення) і потоку, що надходить на стадію біологічного очищення. Однак обсяг культуральної рідини, що повертається, обмежений – не більше ніж 70 % – унаслідок накопичення в середовищі культивування продуктів метаболізму [104].

Схема біологічного очищення стічних вод:

- розчинені органічні речовини видаляють за допомогою активного мулу в аеротенках або при аеробній обробці, на біологічних краплинних фільтрах;
- нітрати знешкоджують за допомогою мікробів-денітрифікаторів (*Pseudomonas spp.*, *Vac. licheniformis*, *Paracoccusdenitrificans*, *Thiobacillusdenitrificans*);
- тверді (щільні) опади, що утворилися, концентрують, збезводнюють (фільтруванням, центрифугуванням, відстоєм на піщаному шарі), а потім спалюють, або використовують як добриво [104].

Постійне погіршення хімічного складу стоків і водночас закономірне підвищення вимог до якості очищеної води диктує необхідність створення нових методів біологічної обробки води. Усе це дає змогу створити і реалізувати на практиці новітні біотехнології очищення промислових і побутових стічних вод, а також зливових і природних вод у біоконвеєрі (рис. 10.1)

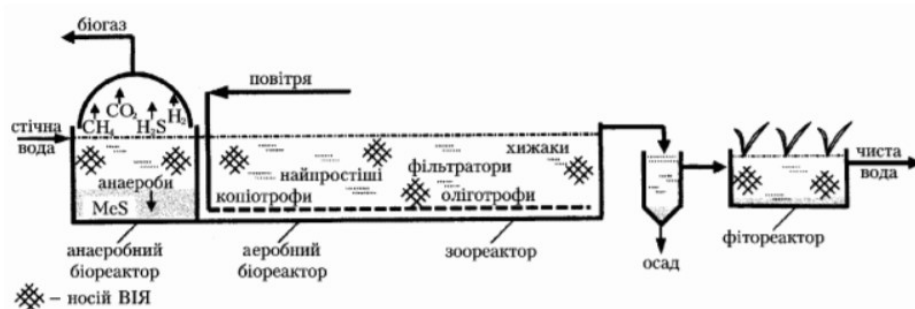


Рис 10.1 Біоконвеєр

Технологічна суть біоконвеєра полягає в тому, що на шляху води, яку потрібно очистити, розміщені гідробіонти — анаеробні бактерії, аеробні мікроорганізми (копіотрофи, оліготрофи, найпростіші), фільтратори, хижакі. Перебуваючи на своїх «робочих місцях», вони «виїдають» з води розчинені у ній органічні сполуки і біомасу організмів. У результаті маємо чисту воду і в сотні разів меншу надлишкову біомасу, утилізація якої, в традиційному біологічному процесі очищення води становить дуже важку для розв'язання проблему. Особливо цінно, що у біоконвеєрі, на відміну від біологічного очищення води зі зворотним активним мулом, немає насилля над гідробіонтами: кожен гідробіонт у запропонованій системі біологічного очищення води вільний у своєму виборі місця проживання. Це дуже важливо, оскільки тільки вільний організм працює з максимальною продуктивністю. Біоконвеєр не має головних недоліків традиційного біологічного очищення води.

По-перше, тут можна очищати будь-які води, що містять розчинені органічні сполуки, навіть гранично токсичні, канцерогенні чи мутагенні, за будь-яких їх концентрацій.

По-друге, біоконвеєр дає змогу доводити якість очищеної води до будь-якого заданого ступеня чистоти.

По-третє, він знімає проблему надлишкової біомаси, бо вона споживається і мінералізується у трофічному ланцюгу. Досить мати в очисній споруді трофічний ланцюг у 2–3 ланки, щоб зменшити кількість надлишкової біомаси у 100–1000 разів! Для цього під час біологічного очищення води потрібно використовувати не тільки прокаріотів, як це переважно відбувається при застосуванні активного мулу, а й весь арсенал евкаріотів — фільтраторів і хижаків різних трофічних рівнів.

Біоконвеєр, як і всі інші відомі та широко застосовувані біотехнології охорони довкілля, — економічно вигідна і екологічно раціональна технологія [105].

### **10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів**

Частково відходи вивозяться на замські полігони, призначені для їх захоронення, частково потрапляють у місця неорганізованого зберігання (близько 10%), а ще близько 6% просто осідає на території міста і промислових підприємств.

Для утилізації тари від миючих засобів і компонентів поживного середовища їх попередньо сортують і відправляють до пунктів прийому вторсировини.

Окрім біомаси може містити сліди ферменту та залишки органічних кислот, які при надходженні у навколишнє середовище, зокрема ґрунт не шкодять для навколишнього середовища. Їх достатньо знищити нагріванням із подальшим вивезенням на ферми, де її можна додавати до кормів худобі, вносити в ґрунт як органічне добриво; передавати на загальноміські очисні споруди, а також на метанове бродіння

У тверді відходи можуть вносити інокулянт із суміші угруповань різних видів мікроорганізмів деструкторів полютантів різної природи, а також вносять баластний матеріал типу торфу. Це дозволяє перетворити відходи на добриво [106].

### **10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів**

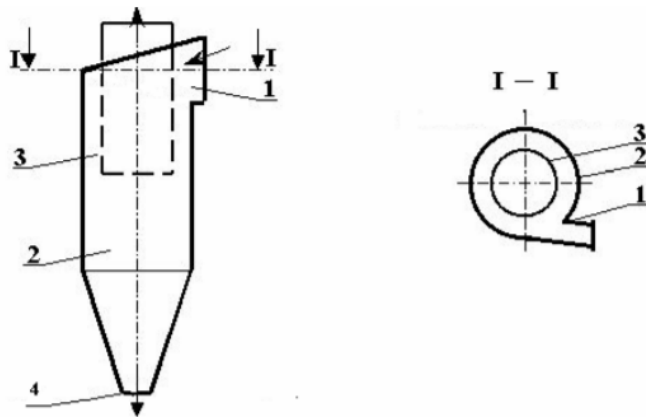
Атмосферне повітря може забруднюватись твердими, рідкими та газоподібними домішками, які складаються з стабільних атомів або радіоактивних ізотопів. Очищення атмосферного повітря здійснюється за допомогою використання сучасних повітряних фільтрів.

У розпилювальних сушарках впарена рідина (або стічні води високої мінералізації) надходить зверху сушильної камери через форсунку і зверху також паралельним потоком подають нагріте повітря або димові гази. Відпрацьований сушильний агент після очищення від пилу в циклонах викидається в атмосферу [107].

Повітря, яке було використане в сушарці в подальшому мусить пройти процес очищення перед викидом в атмосферу. Після сушарки , воно поступає до очищувального циклону . Там повітря очищується від твердих частинок готового продукту, який після відокремлення надходить у розвантажувальний циклон, саме повітря за допомогою вентилятора надходить у скрубєр . В скрубєрі відбувається вологе очищення, і після проходження фільтра , повітря випускається в атмосферу.

Найширше в практиці використовується група апаратів типу «циклон» (рис. 10.2.), в яких під дією відцентрової сили тверді включення переміщуються до стінок «циклону», а потім осаджуються. Представлений на рис. 10.2 відцентровий

пиловловлювач працює наступним чином: через вхідну трубу 1 забруднене повітря по дотичній потрапляє у циліндричний корпус 2, де починає обертатись навколо вихідної труби 3. Видалення пилу з аерозольного потоку проходить під дією відцентрової сили, яка виникає при обертово–поступальному русі газового потоку, а також сил гравітації та інерції пилових частинок, які рухаються в аерозольному потоці.



*Рис. 10.2* – Схема циклону:

Ефект сил інерції досягається при повороті рухомого газового потоку у вихідну трубу; при цьому тверді частинки намагаються зберегти першочерговий напрям руху й осаджуються в нижній частині циклону 4. Очищене повітря виходить з апарату через вихідну трубу 3.

Перевагами фільтрів таких конструкцій є простота в експлуатації, здатність працювати у широкому колі температур, ступінь очищення повітря, менші габаритні розміри [106].

**Очищення відпрацьованого повітря.** Система очищення повітря, що відходить, впроваджена у виробництво порівняно недавно. У цей час доведено, що з ферментаторів разом з повітрям, в атмосферу викидається до  $10^{10}$  -  $10^{11}$  клітин мікроорганізмів і спор в  $1 \text{ м}^3$ , що неприпустимо з погляду охорони навколишнього середовища. Засміченість повітря при поверхневому способі культивування, особливо на стадії споруутворення, ще більше. Очищення повітря, що відходить, ускладнюється тим, що він має дуже високу відносну вологість (до 25 г води на  $1 \text{ м}^3$ ), і звичайні фільтри тонкого очищення швидко виходять із ладу.

Експериментально доведено, що якщо з повітря, що відходить, конденсувати воду, то разом з нею віддаляється 99 % мікроорганізмів. Для очищення вихідного повітря можна використовувати волого- і термостійкі фільтри. Доцільно використовувати для очищення повітря, що відходить, парні фільтри, із яких один регенерується, другий працює, а в цілому система працює безупинно [104].

При очищенні відпрацьованого повітря, що має високу вологість, добре зарекомендували себе металокерамічні фільтри, які застосовуються у вигляді парного автоматизованого комплексу: один фільтр робочий, інший - регенерується продуванням парою. Перемикання фільтрів здійснюється в автоматичному режимі при збільшенні гідравлічного опору фільтра до певної величини. Кожен ферментатор обладнується автономною системою очищення відпрацьованого повітря, що виключає передачу інфекції з комунікацій з одного ферментатора в інший.

#### **10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів**

Україна, як сучасна країна повинна мати пріоритетні заходи, щодо боротьби з проблемами поводження та утилізації відходів промисловості. Тому вирішення проблем поводження з відходами на державному рівні має здійснюватись, насамперед шляхом ефективного законодавчого регулювання.

Під час проектування виробництв питання щодо техніки безпеки, промислової санітарії та охорони довкілля приділяється велика увага. На підприємствах надійним способом забезпечення біобезпеки є додержання асептики. У даному випадку підприємство повинно здійснювати умовно-асептичні процеси, адже продуцент є умовно-патогенним та продукція яка використовується, іде на кормові цілі тваринництва. Для зменшення впливу відходів на навколишнє середовище необхідно вдосконалювати законодавчу базу, оновлювати обладнання підприємств, розробляти нові схеми утилізації відходів, вдосконалення відчуття сумління громадян нашої держави. Для зменшення рідких відходів дез.засобів потрібно використовувати СІР-мийки, які дають змогу багаторазового використання миючих засобів

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гамаюрова В. С., Зиновьева М. Е., Вестник Казанского технологического университета, 2012, том 15, с. 106.
2. Изменение активности липазы из поджелудочной железы свиней и липазы из бактерии *Pseudomonas fluorescens* в комплексе с полиэлектролитами [Электронный ресурс]. Режим доступа [https://static.freereferats.ru/\\_avtoreferats/01002744107.pdf](https://static.freereferats.ru/_avtoreferats/01002744107.pdf)
3. Гаскарова Е.Ф. Разработка технологии дрожжевой липазы для применения в пищевой промышленности : дис. .кандидата тех.наук.- Москва, 2015. - 215 с.
4. Юзбашева Е. Ю. Разработка эффективных систем экспонирования белков на поверхности клеточной стенки дрожжей *Yarrowia lipolytica* для создания продуцента клеточно-связанной липазы: дис. кандидат биологических наук.- Москва 2011. -211 с
5. Спеціальні екзогенні ферменти покращують перетравлюваність кормів для птиці. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://agrotimes.ua/tvarinnitstvo/speczialni-ekzogenni-fermenty-pokrashhuyut-peretravlyuvanist-kormiv-dlya-ptyczi/>
6. Экзогенная липаза — «КДН Липаза TS» от международной биотехнологической корпорации VLAND BIOTECH INC. [Электронный ресурс]. Режим доступа <https://www.agroinvestor.ru/business-pages/30343-ekzogennaya-lipaza-kdn-lipaza-ts/>
7. Шеламова С.А., Жеребцов Н.А., Щеголев В.В. Оптимизация условий биосинтеза липаз.// Ферментная и спиртовая промышленность. - №4. - С.26-28. [Электронный ресурс]. Режим доступа <https://patents.google.com/patent/RU2233325C1/ru>
8. Шеламова С.А. Научно-практические аспекты технологии модификации растительных масел для жировых продуктов с функциональными свойствами: Автореф. дис. ... докт. техн. наук. — Москва , 2012. — 50 с.

- 9 Биосинтез липазы культурой *Candida paralipolytica* 739  
полиэлектролитами [Электронный ресурс]. Режим доступа  
<https://www.dissercat.com/content/biosintez-lipazy-kulturoi-candida-paralipolytica-739>
- 10 H. Dietmar Beer; John E.G. McCarthy; Uwe T. Bornscheuer; Rolf D. Schmid; Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* -1998. - N 1399. - p 173-180, [10.1016/s0167-4781\(98\)00104-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(98)00104-3).
- 11 U Derewenda; L Swenson; Y Wei; R Green; P M Kobos; R Joerger; M J Haas; Z S Derewenda; Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar* // *Journal of Lipid Research* -1994.- N 35.- p524-534. [10.2210/pdb1tic/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1tic/pdb).
- 12 Mitsutaka Kohno; Wataru Kugimiya; Yukio Hashimoto; Yuhei Morita. Purification, Characterization, and Crystallization of Two Types of Lipase from *Rhizopus niveus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1994**, 58, 1007-1012
- 13 Липаза Мегалипаза ТС (Megalipase TS) [Электронный ресурс]. Режим доступа [10.1271/bbb.58.1007](https://doi.org/10.1271/bbb.58.1007) [https://agrovektor.ru/physical\\_product/568089-lipaza-megalipaza-ts-megalipase-ts.html](https://agrovektor.ru/physical_product/568089-lipaza-megalipaza-ts-megalipase-ts.html)
- 14 Ліпаза: характеристики, будова, типи, функції [Електронний ресурс]. Режим доступу <https://uk.warbletoncouncil.org/lipasa-7334>
- 15 Липолитические ферменты [Электронный ресурс]. Режим доступа [http://chemanalytica.com/book/novyuy\\_spravochnik\\_khimika\\_i\\_tekhnologa/06\\_syre\\_i\\_produkty\\_promyshlennosti\\_organicheskikh\\_i\\_neorganicheskikh\\_veshchestv\\_chast\\_I/5430](http://chemanalytica.com/book/novyuy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_chast_I/5430)
- 16 Батрак В.С. Застосування ліпази у харчовій промисловості // Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського, 19 квітня 2019) - С.15
- 17 Липаза [Электронный ресурс]. Режим доступу: <https://www.gastroscan.ru/handbook/120/509>

18 *Бердиев Н.Ш.* Биодизель – альтернативный источник энергии // Химия и биология : электрон. научн. журн. – 2019.- № 6.- С.60 [Электронный ресурс]. Режим доступа <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/7327>

19 *Маслова Н.Ф., Крамаренко Е.А.* Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств» Эффективность применения и актуальность создания новых ферментных препаратов на основе микробиологических субстанций для нормализации пищеварения // Фармаком. [Электронный ресурс]. Режим доступа [http://sphu.org/wp-content/uploads/2017/08/Farmacom\\_4\\_2008.pdf](http://sphu.org/wp-content/uploads/2017/08/Farmacom_4_2008.pdf)

20 Ферментная терапия сыворотками PBSENUM. [Электронный ресурс]. Режим доступа [https://www.krasivo.biz/articles\\_930.htm](https://www.krasivo.biz/articles_930.htm)

21 Топ 4 биоактивных ферментов в эстетической медицине. [Электронный ресурс]. Режим доступа <https://pbserum.com.ua/ferments/top-4-bioaktivnykh-fyermiyentov/>

22 *Skliar, V., Krusir, G., Zakharchuk, V., Kovalenko, I.* Investigation of the fat fraction enzymatic hydrolysis of the waste from production of hydrogenated fat by the lipase *Rhizopus japonicas* // Food science and technology. – 2019. – 13, N 1. - P. 27-33

23 *Демченко Ю.А.*, Липаза: свойства, источники, способы получения, применение // Наука: комплексные проблемы: научно-информационный журнал НИИ комплексных проблем АГУ: сетевое электронное научное издание. - 2018. -12, № 2. С. 15. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.nigniikp.adygnet.ru/index.php/vypuski-2018/vypusk-2-12-dekabr/45-stati-k-vypusku-2-12-dekabr-2018/133-lipaza-svoystva-istochniki-sposoby-polucheniya-primeneniye>

24 *Аверьянова В.А.* Эволюция моющих средств: стремление к устойчивому идеалу // «Сырье и Упаковка». – 2014. - № 02. [Электронный ресурс]. Режим доступа <https://cosmetic-industry.com/evolyuciya-moyushhix-sredstv-stremlenie-k-ustojchivomu-idealuu.html>

25. Патент №2451075 РФ : Рекомбинантный штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* — продуцент липазы: / Т.В. Выборная, Т.В. Юзбашев, Т.И. Соболевская и др.— Оpubл. 20.05.2012

26. Патент №2500812 РФ. Рекомбинантный штамм бактерий *Bacillus Licheniformis* – продуцент термостабильной липазы / Синеокий С.П., Борщевская Л.Н., та інш. Оpub. 10.12.2013, Бюл. № 34

27. Патент РФ №2475532 РФ. Штамм дрожжей *Candida Parapsilosis* - продуцент липазы / Иванова Л.А., Гаскарова Е.Ф. Оpub. 20.02.2016 Бюл. № 5

28. Патент РФ №2475532 РФ. Штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* – продуцент клеточно-связанной липазы / Юзбашева Е. Ю., Юзбашев Т.В., Гордеева Т. Л., та інш. Оpub.: 20.02.2013 Бюл. № 5

29. *Rhizopus* [Электронный ресурс]. Режим доступу <https://www.britannica.com/science/Rhizopus>

30. Гриби та псування їжі (2-е видання). Публікації Aspen. 1999 рік. ISBN 978-0834213067.

31. Штамм гриба *Rhizopus Cohnii* Berl Em De Toni - продуцент липазы с каталазной активностью [Электронный ресурс]. Режим доступу <https://iprop-ua.com/inv/pdf/t2b08oit-pub-description.pdf>

32. Штамм микроскопического гриба [Электронный ресурс]. Режим доступу <https://patenton.ru/patent/SU1112060A1>

33. Andrii P. Gryganskyi, Soo Chan Lee, Anastasia P. Litvintseva, Matthew E. Smith. Function, and Phylogeny of the Mating Locus in the *Rhizopus oryzae* Complex, Published: December 9, 2010 [Электронный ресурс]. Режим доступу <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0015273>

34. *Rhizopus oryzae* (BCRC 33888), 13. ризоїд і спорангіофор, Bar = 55 мкм; 14. спорангій, Bar = 50 мкм; 15. спорангіоспори, Bar = 20 мкм. [Электронный ресурс]. Режим доступу [https://www.researchgate.net/figure/15-Rhizopus-oryzae-BCRC-33888-13-rhizoid-and-sporangiophore-Bar-55-mm-14\\_fig4\\_260351276](https://www.researchgate.net/figure/15-Rhizopus-oryzae-BCRC-33888-13-rhizoid-and-sporangiophore-Bar-55-mm-14_fig4_260351276)

35. *Rhizopus Oryzae* (чистий штам, вирощений на рису від Angel Brand Jiuqu) [Электронный ресурс]. Режим доступу

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/df/Rhizopus\\_Oryzae.jpg/1280px-Rhizopus\\_Oryzae.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/df/Rhizopus_Oryzae.jpg/1280px-Rhizopus_Oryzae.jpg)

36 [Електронний ресурс]. Режим доступу

[https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm\\_keyword?AN=Rhizopus&BN=japonicus&CN=&DN=](https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_keyword?AN=Rhizopus&BN=japonicus&CN=&DN=)

37 *Rhizopus javanicus* Y.Takeda, 1935 [Електронний ресурс]. Режим доступу

<https://www.gbif.org/uk/species/100539681/verbatim>

38 Все о ферментах. [Електронний ресурс]. Режим доступу

<https://premiksz.info/articles/vse-o-fermentakh/>

39 Янышева Н.В. Выделение, иммобилизация и практическое использование липолитического комплекса *Rhizopus oryzae* 1403: Дис. ... канд. хим. наук. — Москва, 2005. — 203 с.

40 А.В. Борисенко, М.М. Антонюк, В.Л. Айзенберг та ін. Селекція продуцентів позаклітинної ліпази для використання в біотехнології // Наукові праці НУХТ. — 2010. — № 33. — С. 35—37.

41 Обзор рынка: кормовые ферменты [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.agritimes.ru/articles/1604/obzor-rynka-kormovye-fermenty/>

42 Импорт кормовых ферментов в 2018 году [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.tsenovik.ru/bizness/articles/mkorm/import-kormovykh-fermentov-v-2018-godu/>

43 Птахівництво — ефективна сфера агробізнесу. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://agro-business.com.ua/agro/ekonomichnyi-hektar/item/7898-ptakhivnytstvo-efektyvna-sfera-ahrobiznesu.html>

44 Чисельність поголів'я сільськогосподарської птиці. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

[http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat\\_u/2019/zb/05/zb\\_tu2018.pdf4](http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2019/zb/05/zb_tu2018.pdf4)

45 Дехтяренко Н. В. Виробництво ферментних препаратів в Україні // Наукові вісті Національного технічного університету України "Київський політехнічний інститут". - 2013. - № 3. - С. 48-58. - [Електронний ресурс]. Режим доступу [http://nbuv.gov.ua/UJRN/NVKPI\\_2013\\_3\\_10](http://nbuv.gov.ua/UJRN/NVKPI_2013_3_10).

46 *Некрасов П.О., Плахотна Ю.М., Некрасов О.П.* Дослідження ефективності ферментів щодо гідролітичного розщеплення жирів // Вісник нац. техн. ун-ту ХПІ. —2011. — № 31. — С. 3—10.

47 Экзогенная липаза снижает стоимость корма. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.agroinvestor.ru/business-pages/29897-ekzogennaya-lipaza-snizhaet-stoimost-korma/>

48 Окислення жирних кислот з непарним числом вуглецевих атомів [Електронний ресурс]. Режим доступу <http://soundlike.ru/ukraine/articles.php?id=368>

49 Glycolysis / Gluconeogenesis [Електронний ресурс]. Режим доступу [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?gse00010](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?gse00010)

50 Citrate cycle (TCA cycle) [Електронний ресурс]. Режим доступу [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?gse00020](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?gse00020)

51 *Пирог Т.П.* Загальна мікробіологія: Підручник –2-е вид., доп і перероб. – Київ: НУХТ, 2010. – с. 632

52 *Пирог Т.П., Ігнатова О.А.* Загальна біотехнологія: – Київ :НУХТ, 2009. – с. 336.

53 *Зав'ялов В.Л., Зоткіна Л.В., Немирович П.М., Бодров В.С., Запорожець Ю.В., Попова Н.В., Мисюра Т.Г.* Процеси і апарати біотехнологічних виробництв: Метод. рекомендації до вивчення дисципліни, виконання курсових і контрольних робіт для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. /– Київ: НУХТ, 2012. – с. 98

54 *Мотроненко В.В.* Аналіз впливу перемішування на культивування міцеліальних грибів.- КПІ, м. Київ 2015.

55 *Малежик І.* Процеси та апарати харчових виробництв. - Київ: НУХТ, 2003. - с. 400

56 *Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Бородай В.В., Коломісць Ю.В.* Загальна (промислова) біотехнологія: навч.посіб. Київ, 2014. 179 с.

57 *Герасименко В.Г., Цвіліховський М.І., Захаренко М.О.* Біотехнологія. – Київ: ІНК ОС, 2006. – 647 с.

- 58 ФЯП – воздушный фильтр грубой очистки [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.ukrvent.com/fyay.html>.
- 59 Обладнання для промисловості [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.molmash.ru/page/page39.html>
- 60 Леонов Ю.. Як правильно обрати засіб для дезінфекції.// Довідник головної медсестри.- березень 2020 р. № 3 [Электронный ресурс]. Режим доступа <https://emedsestra.m CFR.ua/799730>
- 61 Державні санітарні правила для підприємств [Электронный ресурс]. Режим доступа [http://search.ligazakon.ua/1\\_doc2.nsf/link1/ST001880.html](http://search.ligazakon.ua/1_doc2.nsf/link1/ST001880.html)
- 62 Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001. – № 502.
- 63 Вимоги до дез.засобів [Электронный ресурс]. Режим доступа <https://fs01.vseosvita.ua/0100b1ik-ddba.pdf>
- 64 Успішна дезінфекція — надійна біобезпека [Электронный ресурс]. Режим доступа <http://pigua.info/uk/post/uspisna-dezinfekcia-nadijna-biobezpeka-uk>
- 65 *І.В.Лич.* Промислова технологія лікарських засобів: Конспект лекцій (І частина) для студ.напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден.та заоч.форми навч. – Київ: НУХТ, 2011. – 146 с.
- 66 Інструкція до засобу «Тетрамін» [Электронный ресурс]. Режим доступа <http://www.disinfector.com.ua/>
- 67 Інструкція до засобу «Біомой» [Электронный ресурс]. Режим доступа <http://www.farmakos.ua/>
- 68 Інструкція до засобу «Естер Дез» [Электронный ресурс]. Режим доступа <https://egh-ingredients.com/news/zasib-dezinfikuyuchiy-ester-de/>
- 69 *Грачева, И. М.* Технология ферментных препаратов. – Москва: Элевар, 2000. – 512 с
- 70 Импорт кормовых ферментов в 2018 году [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.tsenovik.ru/business/articles/mkorm/import-kormovykhfermentov-v-2018-godu/>

71 *Javad B., Zohreh S.* Optimization of production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen // *Biotech. And Applied Bioch.* – 2003. – Vol.38. - № 5. – P. 267-269.

72 *Naussens .M, Cerdobble A.* *Leuconostoc* dextransucrose and dextran: production, properties and application // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* – 2005. – Vol.4. - № 6. – P. 845-860.

73 *Карлаш Ю.В.* Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання – Київ: НУХТ, 2013. – 143 с.

74 Фильтрация [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://medic.studio/biotehnologii/filtratsiya-70591.html>

75 Выделение и очистка продуктов биотехнологии. [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://pandia.ru/text/80/184/2935-8.php>

76 Способы получения ферментов. [Електроний ресурс]. Режим доступу: <http://reshebniki-online.com/node/192646>

77 *Комиссаров А.В., Алешина Ю.А., Громова О.В., Никифоров А.К., Еремин С.А., Волох О.А., Лобовикова О.А., Перепелица А.И.* Применение ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов // *Проблемы особо опасных инфекций.* - 2015. -№1. [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-ultrafiltratsii-dlya-kontsentrirvaniya-i-ochistki-antigenov>

78 Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. [Електроний ресурс]. Режим доступу: [http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Struchkova\\_Kalyasova.pdf](http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Struchkova_Kalyasova.pdf)

79 *Янышева Наталья Васильевна.* Выделение, иммобилизация и практическое использование липолитического комплекса *Rhizopus oryzae* 1403 : Дис. ... канд. хим. наук : 03.00.23 : Москва, 2005

80 *Цыперович А.С.* Ферменты (основы химии и технологии). — Київ: Техніка, 1971. — 361 с.

- 81 Сушка распылением. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.activestudy.info/sushka-pishhevyx-produktov-raspyleniem/>
- 82 Технология и принцип работы распылительной сушилки. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://mida.ru/articles/articles\\_06.php](https://mida.ru/articles/articles_06.php)
- 83 Кормова ліпаза. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://russian.alibaba.com/product-detail/feed-grade-lipase-granule-enzyme-60359914792.html>
- 84 Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н //Прикладная Энзимология [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://books.ifmo.ru/file/pdf/2440.pdf>
- 85 Псхацьева З.В. Использование бентонитовой подкормки со свободным доступом для цыплят-бройлеров [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.dissercat.com/content/ispolzovanie-bentonitovoi-podkormki-so-svobodnym-dostupom-dlya-tsyplyat-broilerov>
- 86 Паперові мішки з поліетиленовим вкладишем [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ias.ua/uk/products/paperovi-mishky-z-polietylenovym-vkladyshem>
- 87 Мішки-вкладиші [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://polimer.ltd/meshky-vkladyshy/>
- 88 Фасувально-пакувальний автомат сипучих в готові мішки. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prompak.in.ua/ua/p592543057-fasovochno-upakovochnyj-avtomat.html>
- 89 *Rhizopus* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/zygomycetes/rhizopus/>
- 90 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cde.nuft.edu.ua/message/index.php?user1=11624&user2=-10>
- 91 Штамм микроскопического гриба [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://patenton.ru/patent/SU1112060A1>
- 92 *Rhizopus* 400x magnification [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://en.wikipedia.org/wiki/Rhizopus#/media/File:Rhizopus\\_fungus.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Rhizopus#/media/File:Rhizopus_fungus.jpg)

93 Morphological characteristics of *Rhizopus oryzae* isolated from *Rubus crataegifolius*. (A) Colony on PDA 7 days after incubation, (B) Sporangium and sporangiophore, (C) Columella, (D) Sporangiospores, (E) Rhizoids. [Електронний ресурс]. Режим доступу [https://www.researchgate.net/figure/Morphological-characteristics-of-Rhizopus-oryzae-isolated-from-Rubus-crataegifolius-A\\_fig2\\_273984569](https://www.researchgate.net/figure/Morphological-characteristics-of-Rhizopus-oryzae-isolated-from-Rubus-crataegifolius-A_fig2_273984569)

94 Microscopy showing unbranched sporangiospore with rhizoids of *Rhizopus* ( $\times 40$ ) [Електронний ресурс]. Режим доступу [https://www.idoj.in/viewimage.asp?img=IndianDermatolOnlineJ\\_2015\\_6\\_2\\_92\\_153010\\_f8.jpg](https://www.idoj.in/viewimage.asp?img=IndianDermatolOnlineJ_2015_6_2_92_153010_f8.jpg)

95 М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.

96 Определение активности ферментов [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.piboc.dvo.ru/structure/ext\\_labs/met/activity.php](http://www.piboc.dvo.ru/structure/ext_labs/met/activity.php)

97 Демьянцева Е.Ю., Копнина Р.А. Ферментативный катализ в ЦБП: учебно-методическое пособие/СПбГТУРП. СПб., 2014. – 35-39 с

98 Куц А.М., Бондар М.В., Булій Ю.В. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» спец. «Технологія продуктів бродіння і виноробства» /– Київ: НУХТ, 2011. – 53 с.

99 . Джа Т. В., Коновалова Е. Ю, Клименко С. В.. Дослідження жирокислотного та амінокислотного складу насіння хеномелесу (*Chaenomeles Lindl.*) різних видів.

100 Рунова В. Ф., Бендас Л. Г. и др. Методические указания по применению физико-химических методов контроля питательных сред // – М., 1977. – 18 с.

101 Демьянцева Е.Ю., Копнина Р.А. Ферментативный катализ в ЦБП: учебно-методическое пособие/СПбГТУРП. СПб., 2014. – 35-39 с

102 Кормова ліпаза. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://russian.alibaba.com/product-detail/feed-grade-lipase-granule-enzyme-60359914792.html>

103 Ваги-вологомір Radwag MA 50.X.A [Електронний ресурс]. Режим доступу :<https://www.avtoves.ua/ukr/catalog/vlagomery/product.html?id=1816>

104 Філімоненко О.Ю. Методичні вказівки досамостійної роботи студентів з дисципліни "Загальна біотехнологія" для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія– Кам'янське, ДДТУ, 2019 р., 41 стор.

105 Гвоздяк П. За принципом біоконвеєра (біотехнологія охорони довкілля) // Вісник.-2003. - №3. [Електронний ресурс]. Режим доступу .  
<http://dspace.nbu.gov.ua/bitstream/handle/123456789/70340/05-Gvozdyak.pdf?sequence=1>

106 Утилизация отходов пивных дрожжей [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.eko-track.com/services/utilizatsiya-zhidkikh-otkhodov/utilizatsiya-otkhodov-pivnykh-drozhzhey/>

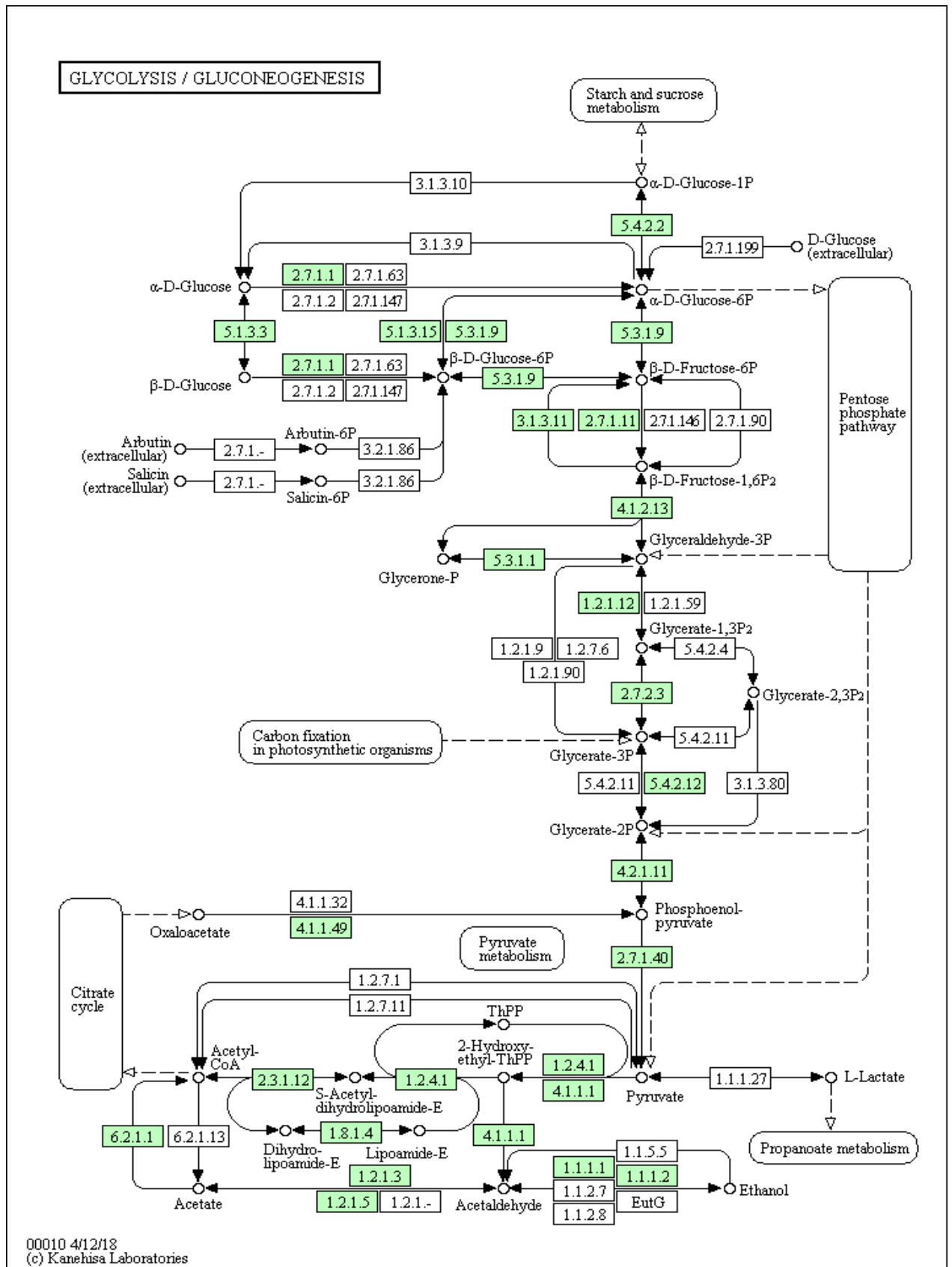
107 Нікітченко О. Ю. Конспект лекцій з дисципліни “Промислова екологія” (для студентів 3 курсу денної форми навчання за напрямом підготовки 6.170202“Охорона праці”) // Харк. нац. акад. міськ. госп-ва. – Х.:ХНАМГ, 2013. – 164 с. [Електронний ресурс]. Режим доступу <https://core.ac.uk/download/pdf/11336906.pdf>



Description	Claims (1)	Hide Dependent ^
<p>Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в хлебопекарной промышленности.</p>	<p>1. Способ получения комплексного ферментного препарата липазы и липоксигеназы, предусматривающий глубинное культивирование штамма-продуцента <i>Rhizopus chinensis</i> VKM F-1062 на питательной среде следующего состава, мас. %:</p>	
<p>Известен способ получения фермента липазы путем культивирования <i>Rhizopus farinosus</i> 1403 на среде состава (%), соевый жмых 1,7, олеиновая кислота 0,35, кукурузный экстракт 0,7, <math>(NH_4)_2HPO_4</math> 0,4. Начальное значение pH среды 6,8-7,0, температура выращивания - 30°С, продолжительность выращивания - 60 ч. Активность липазы в культуральной жидкости составляет 1350 ед/см<sup>2</sup>. (Оптимизация условий биосинтеза липазы / С.А. Шенарова, Н.А. Жеребцов, В.В. Щеголев // Ферментная и спитовая промышленность. - 1984. - №4. - С.26-28).</p>	<p>соевый жмых 2,5-3,5 подсолнечное масло 0,5-0,8 дрожжевой экстракт 0,9-1,4 дигидрофосфат натрия 0,25-0,29 гидрофосфат калия 0,32-0,39 вода дистиллированная остальное</p>	
<p>Известен способ получения фермента липоксигеназы путем глубинного культивирования продуцентов <i>Aspergillus oryzae</i> 3-9-15 или <i>Aspergillus awamori</i> 466 на питательной среде, содержащей соевое масло, соевую муку, азотнокислый натрий, сернокислый магний, однозамещенный фосфорнокислый калий, начальное значение pH 6,0-7,0. Выращивание проводят при аэрации среды, температуре 28-32°С в течение 48 ч. Активность липоксигеназы, определенная каротиноксидазным методом, составляет 20000-50000 усл.ед. на 1 см<sup>2</sup> культуральной жидкости (а.с. 888542 СССР, МКИ С 12 N 9/02 /Способ получения ферментного препарата липоксигеназы / Р.Р. Токарева, Е.А. Двадцатова, М.В. Соловьева, В.Л. Яковенко, В.Л. Коротвич, Е.В. Будницкая, №2949321 /28-13 заявл. 30.05.80; опубл. 15.08.83, Бюл. №30).</p>	<p>при начальном значении pH 7,0 с последующим его выделением.</p>	
<p>Ферментативные превращения жировых продуктов в технологии</p>		

## ДОДАТОК Б

# ДОДАТОК В



## ДОДАТОК Г

критерия Стьюдента.

### Глава 4. Выделение, очистка, физико-химические свойства препарата липазы из *Rhizopus japonicus* 1403

Для получения препарата экзолипазы из *Rhizopus japonicus* 1403 культивирование продуцента проводили глубинным способом в колбах объемом 500 мл в 100 мл питательной среды на рефрижераторной качалке с частотой вращения 180 об/мин. Начальное значение pH среды 7,0; рациональный режим культивирования: температура выращивания 30 °С, продолжительность 72 чг

Установлено, что для наиболее эффективного осаждения липазы из экстракта микромицета целесообразно использовать 70% раствор ацетона при pH экстракта 6,5, в этом случае наблюдается максимальный выход фермента (49,8 %) и наибольшая каталитическая активность (569,0 ед/мг).

Предварительная ультрафильтрация на мембране УАМ-30 обеспечила концентрирование культуральной жидкости в 5 раз, удельная активность на данной стадии составила 1396 ед/мг, степень очистки - 10,3.

Для изучения физико-химических свойств и молекулярных механизмов функционирования ферментов необходимо проводить эксперименты с высокоочищенными препаратами. В этой связи был разработан эффективный способ очистки липазы, включающий стадии гель-фильтрации на сефадексе G-150 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Результаты по очистке липазы *Rhizopus japonicus* 1403 представлены в таблице 1. Достигнута 74,7-кратная очистка изоформы I и 58-кратная очистка изоформы П, с выходом по активности 8,38% и 14,15 % соответственно/Гомогенность полученных фракций подтверждена методом электрофореза. Молекулярные массы изоформ I и П липазы составили  $91 \pm 2,0$  кДа и  $95 \pm 2,0$  кДа соответственно.

В ходе исследования физико-химических свойств полученного препарата липазы установлено, что оптимальными условиями гидролиза триглицеридов являются: температура катализа 37 \*С; pH - 6,5. Показано, что кинетика ферментативного расщепления трибутирина не подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Кривая V(S) характеризуется сигмоидной формой, что позволяет сделать предположение о наличии четвертичной структуры в молекуле липазы *Rhizopus japonicus*. Оптимальная концентрация трибутирина для исследуемого фермента составляет  $1,75 \cdot 10^{-6}$  моль/л. Для характеристики реакции гидролиза

**ИНДУКЦИЯ БИОСИНТЕЗА ЛИПАЗ МИКРОМИЦЕТОМ *RHIZOPUS ORYZAE* 1403****С.А. Шеламова<sup>1</sup>,  
Ю.А. Тырсин<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Воронежский государственный университет инженерных технологий, Россия, 394017, г. Воронеж, пр. Революции, 19  
E-mail: shelam@mail.ru<sup>2</sup> Московский государственный университет пищевых производств, Россия, 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11

Биосинтез липазы *Rh. oryzae* 1403 индуцируется триацилглицеролами, жирными кислотами и их производными – тринами. Самый высокий эффект дали оливковое масло, твин 80 и олеиновая кислота. Этот продуцент способен синтезировать два липолитических фермента. Молекулярная масса была одинаковой у двух изоферментов и равнялась 44±2 кДа. Между изоформами наблюдалось большое соответствие в аминокислотном составе.

Ключевые слова: липаза, *Rhizopus*, биосинтез.

**Введение**

Синтез липолитических ферментов микроорганизмами, за некоторыми исключениями [1], является индуцибельным. Для каждого продуцента необходим выбор индуктора [2–5]. Эффективность индукции, кроме того, зависит от состава питательной среды [6]. По данным многих исследователей биосинтез липазы стимулируют жиры, масла, жирные кислоты и их полиоксизетиленовые эфиры на основе сорбита – твины [1, 7–11]. Есть данные по добавлению твинов в среды как отдельного компонента, так и вместе с маслами (в качестве поверхностно-активных веществ). В первом случае увеличение активности составляет от 2,5 до 6 раз [12, 13]; во втором – на 25% [14].

Для некоторых продуцентов липаз установлено наличие нескольких изоформ этого фермента [15–18]. Они отличаются структурой, молекулярной массой, каталитическими свойствами, стабильностью. Количество работ, посвященных связи между условиями культивирования штаммов-продуцентов липаз и профилем изоферментов, ограничено. Однако это имеет очень большое значение для надежности оценки свойств неочищенных препаратов одного и того же продуцента, так как они могут содержать различное соотношение изоформ.

**Объекты и методы исследования**

Продуцент получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Набор калибровочных белков «Амгешам» (США), твины Sigma Chemical Co (США), реагенты для электрофореза «Sigma» (США); масла: оливковое «Aceites Borges Pont» (Испания), подсолнечное и хлопковое «ЭФКО», льняное «Эколен», горчичное «Родос ТД», касторовое «Тулская фармацевтическая фабрика» (Россия); другие реагенты отечественного производства марки х.ч.

Выращивание продуцента проводили глубинным способом на лабораторной качалке (скорость вращения 1,7–1,8 с<sup>-1</sup>) в колбах Эрленмейера объемом 500 см<sup>3</sup>, содержащих 100 см<sup>3</sup> питательной среды; 72 ч при температуре 30°C и pH 7,0.

Для выявления множественности форм липазы препараты, полученные из фильтрата культуральной жидкости осаждением ацетоном в соотношении 1 : 2,5 об./об., подвергали электрофорезу в ПААГ в градиенте концентраций геля 5–20%. Полосы с липазной активностью обнаруживали по цветной реакции [19].

Определение молекулярной массы липаз проводили методами гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-100 Superfine (Pharmacia, Швеция) [20] и электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS [19].

Аминокислотный состав липаз определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА-339Т МИКРОТЕХНА (Чехословакия).

Гидролитическую активность липазы определяли модифицированным методом Yamada и Machida [21]. Субстрат – оливковое масло. За единицу активности липазы принимали такое количество фермента, которое освобождает 1 μмоль жирной кислоты за 1 мин.

**Результаты и их обсуждение**

Индукция биосинтеза липазы *Rh. oryzae* 1403 исследовалась в присутствии твинов (они были взяты в качестве источников жирных кислот, которые являются твердыми при температуре 30°C); растительных масел, жирных кислот. Исследования проводились на



## Химические наука и образование в России

Председатель федеративной организации «Содержание ношера»

статья

**16 МБ.109. Оптимизация процессов концентрирования и сушки ферментного препарата пилгавы** Янышева Н.В., Рязанов А.Н., Шеломова С.А. Материалы 39 Отчетной научной конференции Воронежской государственной технологической академии за 2000 год. Воронеж, 2001. Ч. 1. Воронеж, Изд-во ВГТА. 2001, с. 84-85. Рус.

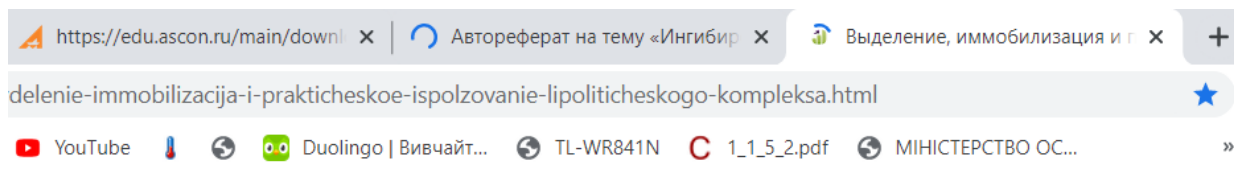
Для исследований использовалась культуральная жидкость гриба *Rhizopus javanicus* 1403 продуцента пилгавы. В качестве методов концентрирования были выбраны: ультрафильтрация и вакуум-выпаривание. В исходной культуральной жидкости содержание сухих в-в (СВ) составляло 1,5%, белка – 3,5 мг/мл, липиды: активность (ПА) – 0,10,0 ед/мл, уд. акт – 231,0 ед/г белка. Ультрафильтрацию осуществляли на МБ с основой ароматич. полиамид УТМ-100, УТМ-50М при т-ре 18,0±0,5°С, давл. 0,2 МПа. На МБ УТМ-50М происходило удаление белковых в-в и накопление фермента в концентрате. В конечном итоге концентрат составил 2,8%, белка – 12,6 мг/мл, ПА – 4400,0 ед/мл, уд. акт – 380,0 ед/г белка. Вакуум-концентрирование культуральной жидкости проводили на пилгавы в установке при т-ре испарителя 35,0±0,5°С, давл. 0,1 МПа в течение 2 ч. В результате получен р-р ферментного препарата пилгавы с СВ – 7,5%, ПА – 4800,0 ед/мл, уд. акт – 203,5 ед/г белка. Сушка ферментного р-ра пилгавы осуществлялась вакуум-сублимационным методом на установке периодич. действия КС-30 (Чехия). Установлено, что при данном способе сушки сохранялось 95,0% активности фермента, а применение предварит. концентрирования сохраняло длительность процесса в 2-4 раза.

**Ключевые слова:** акт ферментные препараты% и пилгавы% акт концентрирование% к сушка% акт оптимизация процесса% акт мембраны полимерные% и ароматич. полиамиды УТМ-100, УТМ-50М% и использование

[Полки по серверу](#)

Сервер создается при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований  
Не разрешается копирование материалов и размещение на других Web-сайтах  
Версукане, Сорфити (С) И. Минялова и В. Минялов  
Сорфити (С) Химический факультет ИГУ  
Написать письмо редактору

## Додаток Ж



### Получение технических препаратов липазы

Цель настоящей работы состояла в усовершенствовании технологии получения ферментного препарата липазы *Rhizopus oryzae* 1403 с использованием современных методов концентрирования и фракционирования.

На первом этапе проводилось концентрирование фильтрата культуральной жидкости продуцента, для чего использовали ультрафильтрацию. Начальное содержание сухих веществ в фильтрате культуральной жидкости (КЖ) составляло — 1,5 %, белка - 3,6 мг/см, активность липазы - 40,5 ед/см, удельная активность -11,55 ед/мг белка. В качестве субстрата использовали оливковое масло.

Ультрафильтрацию культуральной жидкости продуцента осуществляли на установке плоскокамерного типа циклического действия при температуре  $20 \pm 1$  С с использованием ацетатцеллюлозных мембран марки УАМ («Влади-пор» г. Владимир). Ацетатцеллюлозные мембраны широко используются для ультрафильтрации ферментов [111, 115]. Успешные результаты достигнуты Т. А. Григорьевой и др. [25] при ультрафильтрации липазы из *Penicillium* sp. Процесс осуществляли в два этапа. На первом освободили раствор липазы от высокомолекулярных веществ, при помощи ацетил целлюлозных мембран с размером пор 220 нм. На втором использовали те же мембраны с размером пор 50-100 нм, а также мембраны винилового ряда, для концентрирования раствора липазы, и одновременного удаления низкомолекулярных белков. Степень концентрирования достигла 1,2-1,3 раза.

Подбор мембраны нами был произведен по таким специфическим при-знакам, как проницаемость (G, л/м<sup>2</sup>·ч) и селективность (R, %), характеризующим скорость процесса и степень задерживания концентрируемого вещества.

В основном фермент удерживался мембраной, но незначительная активность была обнаружена и в фильтрате - потери её составили 1,3 %.

Таким образом, проведенные исследования показали, что для ультрафильтрации фильтрата культуральной жидкости может быть использована аце-татцеллюлозная мембрана УАМ-30.

При помощи ультрафильтрации удалось сконцентрировать раствор фермента в 2,5 раза по СВ, происходила и его частичная очистка, о чем свидетельствует повышение удельной активности в 1,75 раза. Потери при ультраконцентрировании были минимальными и составляли 1,5-2,0 %.

Предварительно сконцентрированный ферментный раствор подвергали вакуум-сублимационной сушке.

Процесс замораживания - неотъемлемая часть технологии вакуум-сублимационного обезвоживания, поэтому представляло интерес исследование влияния низких температур на специфическую активность.

При замораживании ферменты ведут себя по-разному, сохраняя или теряя свою активность, что зависит от природы белка [43, 71]. Для выбора рациональных режимов охлаждения было изучено влияние скорости и температуры замораживания на активность исследуемой липазы (рис. 3.1. а, б). Установлено, что при понижении температуры от 0 до минус 5 С активность фермента несколько снижается, а в интервале минус 15-20 С увеличивается на 15-35 % по сравнению с исходной.

### Похожие диссертации на Выделение, иммобилизация и практическое использование

Выделение, иммобилизация и практическое использование

19–11]. В настоящей работе проведен скрининг продуцентов липолитических ферментов среди ксилотрофных базидиомицетов, а также выявлены особенности продуцирования липаз наиболее перспективными штаммами на плотных средах и в погруженной культуре.

### Материал и методы

**Реактивы.** Трибутирин и глицерин были приобретены у «Sigma-Aldrich» (США), фосфорная кислота, гидрофосфат калия, дигидрофосфат калия были приобретены у «CarlRoth» (Германия), гуммиарабик, олеиновая кислота, сульфат аммония и сульфат магния были приобретены у ООО «Русхим» (Россия), агар-агар, глюкоза, ферментативный пептон и дрожжевой экстракт были приобретены у ООО «НТК ДИА-ЭМ». В работе использовали полуобезжиренную соевую муку, молочную сыворотку, пивное сусло (4° по Баллингу) и подсолнечное масло пищевого качества.

**Штаммы.** Штаммы *Flammulinave lutipes* 42, *Flammulinave lutipes* F-526, *Ganoderma lucidum* 5.1, *Lentinu sedodes* cs-53, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* 1 были получены из коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА». Штаммы *Armillariamelea* 0738, *Flammulinave lutipes* 1483, *Flammulina rossica* 1981, *Ganoderma lucidum* 1319, *Grifola frondosa* 2639, *Grifola frondosa* 0917, *Hericium erinaceus* 0912, *Hericium corraloides* 045, *Hericium corraloides* 1891, *Hypsizigu sulmarius* 1018, *Hypsizigu sulmarius* 1320, *Laetiporus sulphureus* 1429, *Laetiporus sulphureus* 1336, *Phallusim pudicus* 0613 были получены из коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В. П. Комарова РАН. Штаммы *Aspergillus niger* 823, *Aspergillus terreus* 826, *Aspergillus foetidus* 734 и *Yarrowia lipolytica* 8218 были получены из немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур («Leibniz-Institut DSMZ», Германия). Рабочие культуры хранили на скошенном картофельно-глюкозном агаре при 4°C.

**Скрининг продуцентов липаз.** На этапе скрининга для оценки липолитической активности исследуемые штаммы выращивали на среде, содержащей (г/л водопроводной воды): агар-агар — 15,0; трибутирин — 10,0; пептон — 5,0 и дрожжевой экстракт — 3,0. Трибутирин предварительно эмульгировали в воде ультразвуком в течение 1 мин (выходная мощность 85 Вт; ультразвуковой излучатель S-450D, «Branson», США).

**Условия погруженного культивирования.** Погруженное культивирование отобранных штаммов проводили в колбах Эрленмейера ёмкостью 750 мл, содержащих 100 мл среды, при 220 об/мин и температуре 28°C. Объём посевного материала составлял 10% объёма ферментационной среды. В качестве посевного материала использовали 9-суточную культуру *H.erinaceus* 0912 и 5-суточную культуру *T.versicolor* 1, выращенную в описанных выше условиях на среде, содержащей (г/л водопроводной воды): глюкозу — 20,0; соевую муку — 10,0; дигидрофосфат калия — 2,5 и сульфат магния — 0,25 [12].

Биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через лавсановую ткань, фильтрат использовали для дальнейших исследований. Биомассу высушивали при 50°C в течение суток.

**Определение липазной активности.** Липолитическую активность фильтрата культуральной жидкости определяли газохроматографическим методом с использованием эмульсии трибутирина в качестве субстрата. Субстрат готовили добавлением трибутирина (10% вес.) в водный раствор гуммиарабика (1% вес.) и обработкой смеси ультразвуком в течение 2 мин. К 400 мкл раствора субстрата добавляли 400 мкл фильтрата культуральной жидкости и инкубировали смесь при 37°C в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Реакцию ферментативного гидролиза прерывали добавлением 30 мкл фосфорной кислоты (85%). Реакционную смесь центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g, концентрацию масляной кислоты в водной фазе определяли на газовом хроматографе Кристалл-5000.2 («Хроматек», Россия) с колонкой Хромосорб 102 (3 м × 3 мм, «Sigma-Aldrich», США). За единицу липолитической активности (U) принимали количество масляной кислоты (µмоль), образующееся при каталитическом воздействии липаз, приходящихся на 1 мл фильтрата культуральной жидкости или 1 мг белка. Содержание белка определяли методом Лоури с использованием липазы *Rhizopusoryzae* («Sigma-Aldrich», США) в качестве стандарта.

**Выделение и очистка липаз.** Все этапы выделения и очистки липаз проводили при 4°C. Фильтрат культуральной жидкости центрифугировали 20 мин при 10000 g для отделения остатков биомассы и нерастворимых компонентов питательной среды. К супернатанту при постоянном перемешивании добавляли сульфат аммония до 80% насыщения и оставляли на 4 ч. Суспензию центрифугировали 20 мин при 10000 g, осадок растворяли в минимальном количестве фосфатного буфера (pH

## ДОДАТОК К

### Матеріали і методи дослідження

Метою даної роботи було дослідження жирнокислотного та амінокислотного складу насіння хеномелесу. Об'єктом вивчення було насіння хеномелесу прекрасного (*Ch. speciosa (Sweet) Nakai*) сорту «Симоні», інтродукованого в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України та сортів хеномелесу, виведених у відділі акліматизації рослин Національного ботанічного саду: хеномелесу японського (*Ch. japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach.*) сорту «Ян» та хеномелесу чудового (*Ch. superba (Frahm) Rehd.*) сорту «Амфора». Насіння хеномелесу заготовляли з плодів, зібраних у серпні 2011 року.

Аналіз жирокислотного складу ліпофільної фракції здійснювали методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот на газовому хроматографі «Селміхром-1» з полум'яно-іонізаційним детектором. Колонка газохроматографічна, сталевана, завдовжки 2,5 м із внутрішнім діаметром 4 мм, наповнена нерухою фазою – інертоном, обробленим 10 % діетиленглікольсукцинатом (DEGS).

На хроматографі встановлено такі параметри роботи:

- температура термостату колонок – 180 °С;
- температура випарника – 230 °С;

© Колектив авторів, 2012

92

- температура детектора – 220 °С;
- швидкість потоку газу-носія (азот) – 30 см<sup>3</sup>/хв;
- об'єм проби – 2 мм<sup>3</sup> розчину метилових ефірів кислот у гексані.

Ідентифікацію метилових ефірів жирних кислот проводили за часом утримування піків у порівнянні зі стандартною сумішшю. Розрахунок складу метилових ефірів проводили методом внутрішньої нормалізації за загальноприйнятою методикою.

В якості стандартів використовували стандарти насичених і ненасичених метилових ефірів жирних кислот фірми «Sigma». Метиліві ефіри жирних кислот одержували за модифікованою методикою Пейскера, яка забезпечує повне метилування жирних кислот. Для метилування використовували суміш хлороформу з метанолом і