

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

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

«__» __ червня 2024 р.

«__» __ червня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Біосинтез пектофоетидину *Aspergillus foetidus*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

ОДНОРОГ Ірина Миколаївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КАРЛАШ Юрій Васильович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти
(ім'я та прізвище) (підпис)
(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ
“ 01 ” березня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ОДНОРОГ Ірина Миколаївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез пектофоетидину *Aspergillus foetidus*

керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович, доц., к.т.н.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи Продукт: пектофоетидин. Біологічний агент: *Aspergillus foetidus*

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Опис пектофоетидину. Обґрунтування вибору *Aspergillus foetidus*. Техніко-економічне обґрунтування пектофоетидину. Біосинтез пектофоетидину. Обґрунтування вибору технологічної схеми пектофоетидину. Специфікація обладнання для виробництва пектофоетидину. Опис технологічної схеми пектофоетидину. Контроль виробництва пектофоетидину. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва пектофоетидину

5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема - 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема - 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Опис пектофоетидину	01.03.24 – 05.03.2024	
2	Обґрунтування вибору <i>Aspergillus foetidus</i>	06.03.24 – 14.03.2024	
3	Техніко-економічне обґрунтування пектофоетидину	15.03.24 – 22.03.2024	
4	Біосинтез пектофоетидину	23.03.24 – 29.03.2024	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми пектофоетидину	01.04.24 – 14.04.2024	
6	Специфікація обладнання для виробництва пектофоетидину	14.04.24 – 19.04.2024	
7	Опис технологічної схеми пектофоетидину	20.04.24 – 26.04.2024	
8	Контроль виробництва пектофоетидину	27.04.24 – 11.05.2024	
9	Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва пектофоетидину	12.04.24 – 17.05.2024	
10	Підготовка графічного матеріалу (креслень)	18.05.24 – 24.05.2024	
11	Оформлення кваліфікаційної роботи	25.05.24 – 28.05.24	

Здобувач

(підпис)

Ірина ОДНОРОГ

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Юрій КАРЛАШ

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробленню біотехнологічного процесу синтезу пектофоетидину культивуванням *Aspergillus foetidus* NCIM 514. Розглядаючи основні способи використання пектофоетидину, для річної потреби було обрано використання ферменту для внесення в кормові добавки під час годівлі свиней, в результаті дії ферменту відбувається збільшення поживної цінності кормів з чого впливає що підприємцям (тваринникам) необхідна менша кількість корму. В результаті розрахунків було визначено що річна потреба становить 166 кг ферменту з активністю 6000 Од/г. При біосинтезі пектофоетидину культивуванням *Aspergillus foetidus* NCIM 514, який синтезує 36,5 Од/мл за 72 год, та прийнявши що кількість робочих трудоднів становитиме 30 діб необхідний об'єм виробничого ферментера становить 10 м³.

Виробничий процес синтезу пектофоетидину передбачає допоміжні роботи, до яких входить підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, приготування пектину з шкірки манго, а також підготовка та стерилізація поживного середовища для етапів накопичення посівного матеріалу, та виробничого біосинтезу, а також сам технологічний процес, до якого входять підготовка посівного матеріалу та виробничого біосинтезу пектофоетидину.

Кваліфікаційна робота включає опис стадій санітарної підготовки виробництва, вибір мийних та дезинфікуючих засобів, ідентифікацію пектофоетидину та аналіз систем екологізації одержання пектофоетидину.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів та списку літератури із 100 найменувань. Загальний обсяг роботи – 99 сторінок. У цій роботі міститься 15 таблиць та 7 рисунків, а також графічна частина (2 креслення формату А1).

Ключові слова: пектинази, промислове використання, шкірка манго, технологія виділення пектину, *Aspergillus foetidus*, пектофоетидин, ідентифікація, знешкодження.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of a biotechnological process for the synthesis of pectofetidine by cultivation of *Aspergillus foetidus* NCIM 514. Considering the main ways of using pectofetidine, the use of the enzyme was chosen for the annual need to be added to feed additives during pig feeding, as a result of the action of the enzyme, the nutritional value of feed increases, which means that entrepreneurs (animal breeders) need less feed. As a result of the calculations, it was determined that the annual need is 166 kg of enzyme with an activity of 6000 units/g. In the biosynthesis of pectofetidine by cultivating *Aspergillus foetidus* NCIM 514, which synthesizes 36.5 Units/ml in 72 hours, and assuming that the number of working days will be 30 days, the required volume of the production fermenter is 10 m³.

The production process of pectofetidine synthesis involves auxiliary works, which include the preparation of aeration air, the preparation of titration agents, the preparation of pectin from mango peel, as well as the preparation and sterilization of the nutrient medium for the stages of seed accumulation and production biosynthesis, as well as the technological process itself, to which include seed preparation and production biosynthesis of pectofetidine.

The qualification work includes a description of the stages of sanitary preparation of the production, the selection of detergents and disinfectants, the identification of pectofetidine and the analysis of environmental protection systems for the production of pectofetidine.

The qualifying work consists of an introduction, nine chapters and a bibliography of 100 titles. The total volume of work is 99 pages. This work contains 15 tables and 7 figures, as well as a graphic part (2 A1 format drawings).

Key words: pectinases, industrial use, mango peel, pectin extraction technology, *Aspergillus foetidus*, pectofetidin, identification, neutralization.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОПИС ПЕКТОФОЕТИДИНУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ <i>ASPERGILLUS FOETIDUS</i>	14
2.1. Обґрунтування вибору продуцента пектофоетидину та поживного середовища для його культивування	14
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища	20
2.3. Морфолого-культуральні ознаки <i>Aspergillus foetidus</i>	22
2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>Aspergillus foetidus</i>	23
2.5. Таксономічний статус <i>Aspergillus foetidus</i>	24
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ПЕКТОФОЕТИДИНУ	25
3.1. Потреба у пектофоетидині	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва пектофоетидину	26
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	28
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	29
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ПЕКТОФОЕТИДИНУ	34
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у <i>Aspergillus foetidus</i>	34
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у пектофоетидин	37
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПЕКТОФОЕТИДИНУ	42
5.1. Вибір умов і способу культивування	42
5.2. Вибір типу ферментера	43
5.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	44
5.4. Обґрунтування та вибір стадій санітарної підготовки виробництва пектофоетидину	45
5.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для <i>Aspergillus foetidus</i>	53
5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН	58
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ПЕКТОФОЕТИДИНУ	60

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПЕКТОФОЕТИДИНУ	63
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПЕКТОФОЕТИДИНУ	72
8.1. Мікробіологічний контроль	72
8.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища	72
8.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури	73
8.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю	75
8.2.1. Визначення концентрації джерела вуглецю	75
8.2.2. Визначення концентрації джерела азоту	76
8.3. Визначення показників біосинтезу	78
8.3.1. Визначення концентрації біомаси	78
8.3.2. Визначення концентрації ферменту	78
8.3.3. Визначення активності ферменту	79
8.4. Ідентифікація пектофоетидину	80
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА ПЕКТОФОЕТИДИНУ	82
9.1. Системи знешкодження рідких відходів	83
9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів	87
9.3. Системи знешкодження твердих відходів	88
ЛІТЕРАТУРА	91

ВСТУП

Пектинази є зростаючими ферментами біотехнологічного сектору, демонструючи поступове зростання свого ринку. Вони займають лідируючі позиції серед промислових ферментів промислового виробництва. Ці ферменти є екологічно чистим інструментом природи, який широко використовується в різних галузях промисловості, таких як виноробна промисловість; харчова промисловість; паперова промисловість для відбілювання целюлози та переробки макулатури; при переробці овочів-фруктів, чаю-кави, кормів для тварин; добування рослинної олії та очищення рослинних волокон. Крім того, ферментативний каталіз є кращим перед іншими хімічними методами, оскільки він є більш специфічним, менш агресивним і економить енергію [1].

Пектинази належать до сімейства полісахаридів, які сприяють розщепленню пектинів з різних рослин і також відомі як пектолітичні або пектинові ферменти. Пектинази зберігали середньорічні темпи зростання на 2,86% з 27,6 мільйонів доларів США у 2013 році до 30,0 мільйонів доларів США у 2016 році. Пектинази визначаються як консорціум трьох ферментів, включаючи пектатліазу, полігалактураназу і пектинестеразу. Пектинази широко використовуються в промислових процесах, що становить приблизно 75% частки в світовому продажі ферментів для харчової промисловості. Пектинази демонструють потенціал у численних промислових процесах, таких як обробка харчових продуктів, освітлення фруктових соків, відварювання натуральних волокон, очищення пектинових стічних вод, ферментація кави чи чаю, екстракція харчової олії, управління відходами, перетворення біомаси на біоетанол тощо [2].

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Однорог І.М.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					8	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Наразі утилізація сільськогосподарських і харчових відходів промисловості є основним джерелом забруднення навколишнього середовища в країнах, що розвиваються. Крім того, ці відходи можуть бути ефективно перетворені на сполуки з доданою вартістю, включаючи ферменти пектинази, кількома різними мікробними штамами. Вони головним чином беруть участь у деполімеризації довгих і стійких молекул під назвою пектин [2].

Пектин є одним з основних компонентів клітинної стінки рослин. У рослинах пектинестерази відіграють важливу роль у метаболізмі клітинної стінки під час дозрівання плодів. Ферментативна деетерифікація пектинів призводить до низькометоксилованого пектину, який у присутності іонів кальцію утворює міцний гель. Ферментативне перетворення високометоксилованого пектину в низькометоксилований пектин робить можливим утворення гелю і може, у таких продуктах, як джем і кетчуп, зробити подальше додавання загусників непотрібним. Пектинестераза також зміцнює фрукти та овочі після введення їх у тканини [3].

Існують комерційні препарати пектиназ. Наприклад, гетерологічну пектинестеразу виробляє штам *Aspergillus oryzae* IF0 4177, який несе ген, що кодує пектинестеразу з *A. aculeatus*. Отриманий ферментний препарат продається під торговою назвою Rheozyme™, який використовується для гелеутворення рослинних матеріалів, згущення рослинних препаратів, зміцнення фруктів і овочів і контрольованого деметилювання високометоксилованих пектинів. Його можна знайти у фруктових напівфабрикатах, компоті, сидру, джемі та помідорах [3].

Враховуючи те, що пектинази викликають високий інтерес, актуальністю теми є біотехнологічний синтез даних ферментів для подальшого його реалізацію в промисловість.

Новизною теми є застосування відходів манго, а саме шкірки, з якого одержується гідролізат для синтезу пектофоетидину шляхом культивування *A. foetidus* NCIM 514 [4].

РОЗДІЛ 1. ОПИС ПЕКТОФОЕТИДИНУ

Пектофоетидин — це ферментний препарат, який отримується з мікроорганізму *Aspergillus foetidus* і містить кілька різних ферментів, зокрема полігалактуроназу, поліметілгалактуроназу, пектинметілестеразу, геміцелюлазу, целюлазу та кислу протеїназу. Кожен з цих ферментів має свою функцію:

Полігалактуроназа: Розщеплює пектин, руйнуючи полімери галактуронової кислоти.

Поліметілгалактуроназа: Діє на метильовані пектини, розщеплюючи зв'язки галактуронової кислоти.

Пектинметілестераза: Знімає метильні групи з пектинів, створюючи вільні карбоксильні групи.

Геміцелюлаза: Розщеплює геміцелюлози, такі як ксилани та маннани.

Целюлаза: Розщеплює целюлозу.

Кисла протеїназа: Розщеплює білки при низькому рН [1].

Цей ферментний комплекс має широкий спектр застосувань, переважно в харчовій промисловості та біотехнологіях. Наприклад, такі ферменти часто використовуються у виробництві соків, де вони допомагають розщеплювати пектини і целюлозу, що підвищує ефективність віджиму та фільтрації. Також вони можуть використовуватися у виноробстві, обробці текстильних виробів та інших галузях.

Відповідно до розпорядження Кабінету Міністрів України № 392-р від 31 травня 1994 року, пектофоетидин віднесено до номенклатури матеріальних цінностей державного резерву з рівнем накопичення 250 кг. Відповідальним за розміщення, зберігання та реалізацію цього препарату є Ладизинське виробниче об'єднання "Ензим"[2].

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Опис пектофоетидину	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Однорог І.М.					10	4
Перевір.		Карлаш Ю.В.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

На сьогоднішній день пектофоетидин не є широко доступним ферментів із ступенем очищення ГЗХ, але в Ладижинському виробничому об'єднанні "Ензим" є інші ферментні препарати, які містять компоненти, подібні до пектофоетидину. Наприклад, "Пектолад" — це препарат, що містить комплекс пектиназ, який використовується для розщеплення рослинних полісахаридів, і може мати подібні застосування до пектофоетидину [4].

Зважаючи на те, що пектофоетидин це ферментний комплексом, основним розчинником для нього, ймовірно, є вода чи інші полярні розчинники. Неполярні розчинники, такі як гексан або толуен, можуть бути непридатними для розчинення ферментів.

Ферменті комплекси зазвичай розчинні в полярних розчинниках, оскільки їхні амінокислоти, з яких вони складаються, часто мають гідрофільні (водорозчинні) групи. Деякі ферменти можуть розчинятися в інших полярних розчинниках, таких як метанол або етанол, але це залежить від конкретної структури ферменту і умов середовища, зокрема від рН, температури та іонної сили розчину [5]

Специфіка розчинення ферменту пектофоретидину ГХ20 у полярних та неполярних розчинах визначається його хімічною структурою та властивостями. Ось деякі ключові моменти:

Полярні розчинники:

Полярні розчинники, такі як вода, ефективно розчиняють пектофоретидин Г20Х завдяки здатності утворювати водневі зв'язки та іон-дипольні взаємодії з полярними групами ферменту.

Водні розчини пектинів, до яких належить пектофоретидин, мають високу в'язкість, що пояснюється сольватацією макромолекули.

Неполярні розчинники:

Неполярні розчинники, такі як гексан або бензен, не утворюють водневі зв'язки і тому менш ефективні для розчинення пектофоретидину ГЗХ.

Ферменти зазвичай мають обмежену розчинність у неполярних розчинниках через відсутність полярних взаємодій.

Пектофоетидин (іноді також відомий як пектинфоетидин) є специфічним хімічним сполуком, який вивчений у межах біохімії та медицини. Він не є широко відомим у загальній літературі, але має потенціал для різноманітних застосувань завдяки своїм унікальним властивостям. Пектофоетидин є похідним пектинових сполук, які є складними полісахаридами. Ці полісахариди видобуваються з клітинних стінок рослин і є важливими компонентами, що забезпечують структурну цілісність рослин. Пектини складаються переважно з галактуранових кислот, які можуть бути метилестерифіковані або ацетиловані, що визначає їх здатність до гелеутворення та розчинність. Вони також можуть містити нейтральні цукри, такі як арабіноза, галактоза та рамноза, що впливають на їх функціональні властивості. Пектофоетидин може бути модифікований для покращення своїх властивостей, наприклад, шляхом додавання функціональних груп, що підвищують його біосумісність або покращують гелеутворення.

Пектофоетидин має здатність до гідратації, що означає, що він може вбирати велику кількість води. Це важлива властивість для утворення гелів, які можуть бути корисними у медичних та харчових додатках. Утворення гелів відбувається при певних умовах рН і температури; зокрема, низький рН і наявність іонів кальцію можуть сприяти зміцненню гелевої структури. Пектофоетидин добре розчиняється у воді, утворюючи в'язкі розчини, що дозволяє використовувати його в різних водних середовищах, зокрема у фармацевтичних та медичних препаратах.

Висока біосумісність пектофоетидину робить його перспективним для використання в медичних додатках. Він не викликає імунної відповіді і добре приймається організмом, що важливо для матеріалів, що контактують з тканинами або рідинами тіла. У трансплантології він може бути використаний як матриця для клітинних культур або як частина біосумісних покриттів для імплантів. Завдяки своїм властивостям гелеутворення,

пектофоетидин може сприяти загоєнню ран. Гелеві структури можуть створювати оптимальне середовище для регенерації клітин, забезпечуючи захист від інфекцій і підтримуючи вологість рани. У регенеративній медицині гелі на основі пектофоетидину можуть бути використані як матриці для культивування стовбурових клітин або інших регенеративних елементів, сприяючи відновленню пошкоджених тканин.

Крім того, завдяки своїм властивостям загущення і стабілізації, пектофоетидин може використовуватися в харчовій промисловості для створення гелевих десертів, соусів та інших продуктів. У фармацевтичних додатках пектофоетидин може бути використаний як носій для контрольованого вивільнення ліків, оскільки гелеві матриці можуть забезпечувати поступове вивільнення активних речовин. Пектофоетидин є перспективним сполуком з широкими можливостями застосування завдяки своїм унікальним хімічним, фізичним та біохімічним властивостям. Його дослідження та подальший розвиток можуть відкрити нові шляхи для інновацій у різних галузях науки та промисловості [5]

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ *ASPERGILLUS* *FOETIDUS*

2.1. Обґрунтування вибору продуцента пектофоетидину та поживного середовища для його культивування

Сьогодні мікроорганізми регулярно використовуються у великомасштабних процесах ферментації для комерційного виробництва таких ферментів, як протеази, целюлази та пектинази. Економічність таких процесів може бути покращена шляхом перевиробництва натуральних продуктів, засвоєння недорогої та складної сировини або скорочення часу культивування. Пектофоетидин – це комплексний препарат пектиназ, який має різний, в залежності від виробника склад.

Для вибору нашого біологічного агента пропонується зосередити увагу на одержанні полігалактуранази як цільового продукту, оскільки саме цей фермент відіграє найбільшу роль у препараті пектофоетидину, а іноді є йогооединою складовою. Полігалактураназа (PG) відіграє важливу роль у перетворенні протопектину, наявного в клітинних стінках плодів, у розчинну форму під час дозрівання плодів. Він відіграє ключову роль у розм'якшенні плодів під час дозрівання шляхом деполімеризації середньої пластинки, присутньої в клітинній стінці плоду [4].

Більшість PG грибового походження, окремо або в комплексі з іншими пектиназами, мають декілька комерційних застосувань у харчовій промисловості та виробництві напоїв. У виробництві фруктових соків додавання відповідних PG може погіршити пектин, вивільнивши більше поживних речовин і покращивши смак. Використання PG також знайшло своє місце у виробництві комбікормів. Руйнування стінки рослинної клітини за допомогою PG робить рослинний корм для птиці більш засвоюваним курчатами [4, 6, 7].

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Однорог І.М.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору <i>Aspergillus foetidus</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					14	10
Реценз.						Кафедра БТМ –		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Мікробне виробництво цього ферменту є кращим, у порівнянні з альтернативними шляхами синтезу, через легкість утворення та екстракції. Повідомлялося про різноманітні мікроорганізми, включаючи види *Aspergillusniger*, *A. tamari*, *A. oryzae*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Fusarium* і *Saccharomyces* для одержання PG біотехнологічним шляхом [7].

Одним з прикладів може бути глибинне культивування *A.tamarii*MG772816. Культуральне середовище складалося з меленої апельсинової цедри (40 г/л) і сульфату амонію (2,75 г/л). Процес тривав 3 дні і за цей час вдалося отримати 1,27 г/л неочищеного ферменту, при цьому активність його складала 25,32 Од/мг [7]. На тому ж самому середовищі вирощували *A. sojae* ATCC 20235. Гриби культивували протягом 216 години (9 діб). За цей час концентрація неочищеного ферменту становила всього 0,04 г/л, а активність PG становила 854,7 Од/мг [8].

Також, є інформація стосовно використання пектолітичних дріжджів *Wickerhamomycesanomalus*, які також можуть синтезувати обраний фермент. В середовище для виробничого біосинтезу входили азотиста основа дріжджів (6,7 г/л), глюкоза (5 г/л) та цитрусовий пектин (5 г/л). Культивування тривало 10 год, а кінцева концентрація білку становила 0,05 г/л з активністю 148 Од/мг [9].

Відомі випадки використання харчових відходів для синтезу PG. Біологічним агентом виступав гриб *A. foetidus* NCIM 514. Як основне джерело карбону використовували цедру манго (27,3 г/л). Тривалість культивування на оптимізованому середовищі становила 72 години. Кінцева концентрація ферменту становила 0,525 г/л, а активність – 152,95 Од/мг [4].

В іншій роботі вказується можливість утилізації лушпиння єгипетської цибулі. Основним продуцентом PG виступав *Trichoderma viride* EF-8, а концентрація відходів в середовищі становить 65 г/л. Відзначається, якщо під час чотирьохденного культивування підтримувати рН 3, то концентрація ензиму біде найвищою, та становитиме 0,32 г/л, а активність – 0,38 Од/мг [10].

Ще в одній роботі зазначається використання *A. foetidus*, але штаму MTCC 10559. Культивування проводили глибинним методом протягом 8 діб. Основними компонентами поживного середовища виступали пектин (10 г/л) та дріжджовий екстракт (1 г/л). Кінцева концентрація білку становила 0,111 г/л, а його активність – 369,3 Од/мг [11].

Також, є інформація стосовно твердофазної ферментації для одержання PG. В дослідженні використовували *A. fumigatus*(штам не вказано). Середовище становило всього 10 г сухих речовин, 9,97 г з яких складала порошкоподібна шкірка апельсину. Після стерилізації вміст вологи доводили до 70% за допомогою дистильованої води. На цьому середовищі за 14 днів культивування вдалось одержати 21,63 г PG. Активність ферменту при цьому становила 8,73 Од/мг [12].

Тож, спираючись на можливу екологічну складову, пропонується для порівняння обрати продуцентів, які утилізують різні органічні рештки. При цьому, твердофазне культивування розглядати не будемо, через його недоліки, основним з яких є забезпечення стерильності процесу, оскільки культивування проходить при 37 °С, що підходить для мезофільних мікроорганізмів.

Попереднє порівняння біологічних агентів показано в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Характеристика продуцентів полігалакторунози

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Режим культивування	Активність ферменту, 10 ⁴ Од/л	Джерело
<i>A. foetidus</i> NCIM 514	Пептон – 5, КН ₂ РО ₄ – 2,2, MgSO ₄ – 0,2, Сечовина – 2, Пектин з цедри манго* – 27,3	72 год pH=5,8 30 °С 150 об/хв	3,65	[4]
<i>Aspergillus</i> sp. SO5	Дріжджовий екстракт – 4, Пектин – 6, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 0,2, MnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,07	144 год, 30 °С pH=5 100 об/хв	3,421	[10]
<i>A. awamori</i>	Пектин – 10, K ₂ HPO ₄ – 0,2,	72 год pH=5,5	1,78	[11]

MTCC 9166	KCl – 0,5, NaNO ₃ – 0,2, FeSO ₄ – 0,03	28 °C 200 об/хв	Закінчення табл. 2.1	
-----------	--	--------------------	----------------------	--

Примітка: робиться власноруч шляхом гідролізу

Найвищу активність PG має *A. foetidus* NCIM 514 та становить 36,5 Од/мл. При цьому, його час культивування є найменшим. Найнижча активність PG притаманна притаманна грибам *A. awamori* MTCC 9166. Але ці гриби мають такий самий час культивування, як і *A. foetidus* NCIM 514 – 3 доби. Посередні показники має *Aspergillus* sp. SO5, час культивування становить 6 діб, а активність дуже подібна до *A. foetidus* NCIM 514.

Нажаль, дана картина не дає можливості повноцінного порівняння біологічних агентів для синтезу обраного ферменту. Тому, пропонується прорахувати вартість поживного середовища для кожного мікроорганізму. Розрахунки представлено в табл.2.2.

Таблиця 2.2.

Визначення вартості поживних середовищ для синтезу

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>A. foetidus</i> NCIM 514	Пептон – 5	258,37	1,29	1
	KH ₂ PO ₄ – 2,2	50	0,11	2
	MgSO ₄ – 0,2	22,8	0,004	3
	Сечовина – 2	38	0,08	4
	Цедра манго – 105**	20,3**	2,13	5
	Вартість 1 л середовища ≈3,61 грн			
<i>Aspergillus sp.</i> SO5	Дріжджовий екстракт – 4,	1100	4,4	6
	Пектин – 6	599	3,6	7
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 0,2	20	0,004	8
	MnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,07	57,6	0,004	9
	Вартість 1 л середовища ≈8,01 грн			
<i>A. awamori</i> MTCC 9166	Пектин – 10	599	5,99	7
	K ₂ HPO ₄ – 0,2	120	0,024	10
	KCl – 0,5	60	0,03	11
	NaNO ₃ – 0,2	64,8	0,013	12
	FeSO ₄ – 0,03	28,8	0,001	13
	Вартість 1 л середовища ≈6,06 грн			

полігалакторунози

Примітка (ціни наведено станом на лютий 2023 року): 1 - https://www.alibaba.com/product-detail/Peptone-Peptobak-Bacterion-KN-CAS-73049_1600573648919.html?spm=a2700.7724857.0.0.571b23120IWnRH, 2 - <https://kreond.com.ua/ua/p919924538-kalij-monofosfat.html>, 3 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu>, 4 - <https://prom.ua/p266105325-karbamidmochevinatchchda.html>, 5 - <https://fruit-time.ua/product/mango-06-kgst-imp.html>, 6 - <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>, 7 - <https://prom.ua/p1592443993-pektin-yablochnyj-1kg.html>, 8 - <https://harkiv-torg.com.ua/ua/p740948461-sulfat-ammoniya-ammoniumsulphate.html>, 9 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu>, 10 - <https://flagma.ua/kaliy-fosfornokisly-2-zameshchenny-ch-o2563762.html>, 11 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-kalij-hlorystyj>, 12 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-natrij-azotystokyslyj-nitryt-natriyu>, 13 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-zalizo-sirchanokysle-7-vodne>

** - за наявною літературою, в цедрі манго знаходиться близько 26% пектину [12]. Оскільки пектин робиться власноруч, кількість цедри манго яка потрібна становить: $27,3/0,26=105$ г на 1 л. На ринку України легко знайти свіжий манго або сушений, але не його відходи. Тому, пропонується розрахувати умовну вартість шкірки манго за свіжим манго. Вартість за 1 кг становить 181 грн [13]. За наявними даними, шкірка манго на плоді від його загального об'єму займає 11,2% [14]. Тоді, умовна вартість відходу

становитиме $181 \times 0,112 \approx 20,3$ грн. Ці відходи можна брати на заводах фруктових консерв, сокових виробництв а також на виробництвах, які роблять сушене манго.

За одержаними розрахунками найдешевше середовище для культивування належить *A. foetidus* NCIM 514. Ціна на 1 л поживного бульйону становить 3,61 грн. Друге за вартістю середовище використовує *A. awamori* MTCC 9166, але різниця між попереднім продуцентом майже в 2 рази більша. Найдорожче середовище використовує *Aspergillus* sp. SO5, а його вартість складає 8,01 грн.

Варто врахувати, що у кожного продуцента активність ензиму відрізняється. Тому, для більш наглядного порівняння, варто розглядати як вартість поживного середовища, так і активність ферменту разом.

Відповідні розрахунки продемонстровано в табл.2.3.

Таблиця 2.3.

Кінцеве порівняння продуцентів полігалактурунози

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Тривалість культивування, год	Активність ферменту, 10 ⁴ Од/л	Вартість Грн/10 ⁴ Од
<i>A. foetidus</i> NCIM 514	3,61	72	3,65	1,01
<i>Aspergillus sp.</i> SO5	8,01	144	3,421	2,34
<i>A. awamori</i> MTCC 9166	6,06	72	1,78	3,04

За кінцевими розрахунками очевидна перевага *A. foetidus* NCIM 514, оскільки активність ферменту є найвищою, а ціна за 1 л середовища і тривалість культивування є найнижчими. Вартість його становить 1,01 Грн за 10⁴ Од активності.

Інші продуценти, а саме *Aspergillus sp.* SO5 та *A. awamori* MTCC 9166 мають менші значення. *Aspergillus sp.* SO5 має подібну активність ферменту як *A. foetidus* NCIM 514, проте тривалість його культивування є дуже довгою, а PGвід *A. awamori* MTCC 9166 має такий самий час культивування, що й *A. foetidus* NCIM 514, але активність майже в 2 рази нижче. Обидва продуценти мають більш дороге середовище, тому їх використовувати не доцільно.

Тож, за кінцевим порівнянням обираємо штам *A. foetidus* NCIM 514.

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

В загальному, ферменти складаються із послідовно побудованих амінокислот. Біохімічний склад полігалактурунози [15] показано в табл.2.4.

Таблиця 2.4.

Аміно-кислота	Кількість в ферменті, %	Хімічна формула	Молекулярна маса, г/моль	Кількість карбону на 100 г PG, г	Кількість азоту на 100 г PG, г
Аланін	8,9	C ₃ H ₇ NO ₂	89	3,6	1,4
Аргінін	0,8	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174	0,33	0,26
Аспарагін	6,1	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132	2,2	1,29
Аспартат	8,1	C ₄ H ₇ NO ₄	133	2,92	0,85
Цистеїн	1,7	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121	0,51	0,2
Глутамін	1,7	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146	0,7	0,33
Глутамат	1,7	C ₅ H ₉ NO ₄	147	0,69	0,16
Гліцин	12,6	C ₂ H ₅ NO ₂	75	4,03	2,35
Гістидин	0,8	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155	0,37	0,22
Ізолейцин	6,7	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131	3,68	0,72
Лейцин	5			2,75	0,53
Лізін	7	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146	3,45	1,34
Метіонін	0,6	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	146	0,25	0,06
Фенілаланін	3,6	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165	2,36	0,31
Пролін	2,8	C ₅ H ₉ NO ₂	115	1,46	0,34
Серин	11,2	C ₃ H ₇ NO ₃	105	3,94	1,49
Треонін	10,3	C ₄ H ₉ NO ₃	119	4,15	1,21
Триптофан	0,6	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204	0,39	0,08
Тирозин	2	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181	1,19	0,15
Валін	7,8	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117	4	0,93
Всього для одержання 100 г ферменту				42,97 г	39,96

Отже, 42,97% ферменту припадає на карбон, а 39,96% - на азот. Основними джерелами вуглецю в середовищі виступає пептон та пектин. В пептоні знаходиться 41,87% карбону. Отже, з 5 г пептону виходить $5 \times 0,4187 \approx 2,1$ г карбону. Щодо пектину, його усереднена формула - C₆H₁₀O₇,

а молекулярна маса – 194 г/моль. Отже, на 194 г пектину припадає 72 г карбону. Тоді, на 27,3 г пектину кількість карбону становить: $27,3 \times 72 / 194 \approx 10,13$ г. Тоді загальна кількість карбону в середовищі становить: $10,13 + 2,1 = 12,33$ г. При цьому, варто враховувати, що 40% піде на окиснення, тоді кількість карбону, яке піде на синтез ферменту становить: $12,33 \times 0,6 = 7,398$ г. З цієї кількості карбону можна отримати: $7,398 / 0,4297 \approx 17,22$ г ферменту.

Щодо азоту, основними джерелами виступають пептон та сечовина. Кількість азоту в пептоні становить в середньому 14,34%, Тоді, з пептону можна одержати $5 \times 0,1434 = 0,717$ г азоту. Сечовина має формулу $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, та молекулярну масу 60 г/моль. Тоді, на 60 г сечовини припадає 14 г азоту. В середовищі кількість сечовини становить 2 г, тоді, кількість мінерального азоту становить $2 \times 14 / 60 \approx 0,47$ г. Загальна кількість азоту в середовищі становить $0,47 + 0,717 = 1,187$ г. З цієї кількості можна одержати $1,187 / 0,3996 = 2,97$ г ферменту.

Тож, можна зробити висновок про те, що кількість ферменту буде лімітуватись азотом. Також, варто зазначити, що ці концентрації є максимально можливими з виходу зазначеного середовища і не враховують синтез біомаси обраного продуцента. Оскільки обраний продуцент є грибом, виконати правильний розрахунок буде неможливо, оскільки невідомо його біохімічного клітинного складу. В основній статті кількість біомаси не зазначається.

2.3. Морфолого-культуральні ознаки *Aspergillus foetidus*

На дріжджовому агарі Чапека (Czapeck Yeast Agar – CYA) при вирощуванні протягом 7 діб та температурі 25°C культура *Aspergillus foetidus* утворює колонії розміром 62-65 мм від темно-коричневого до чорного кольору, іноді від сірого до коричневого в центрі колонії. На середовищі Malt Extract Agar (MEA) культура утворює колонії діаметром 62-66 мм чорного кольору, продукція склероцій не спостерігається [16].

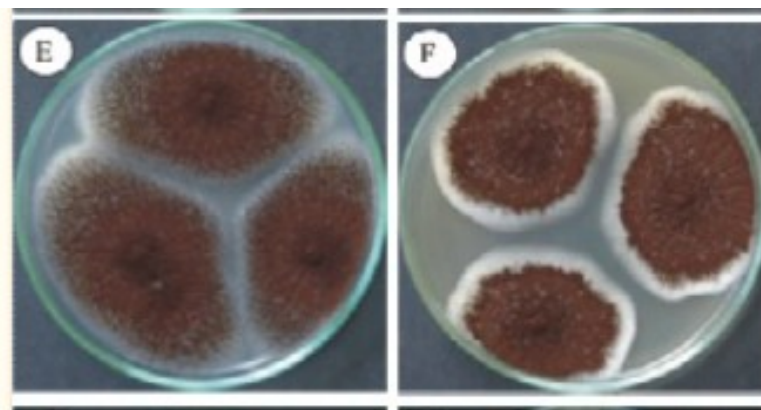


Рис. 2.1. Вигляд колоній *Aspergillus foetidus* після вирощування на середовищах СҮА та МЕА відповідно протягом 7 діб при 25°C [16].

Однак *A. foetidus* можна відрізнити за його характерним конідіальним орнаментом, який при своєму формуванні виглядає злегка колючим, а при дозріванні являє собою гладкі конідії. Діаметр конідій становить 4-5 мкм, текстура дещо колюча/гладка, форма кругла, діаметр везикул 34-69 мкм [16].

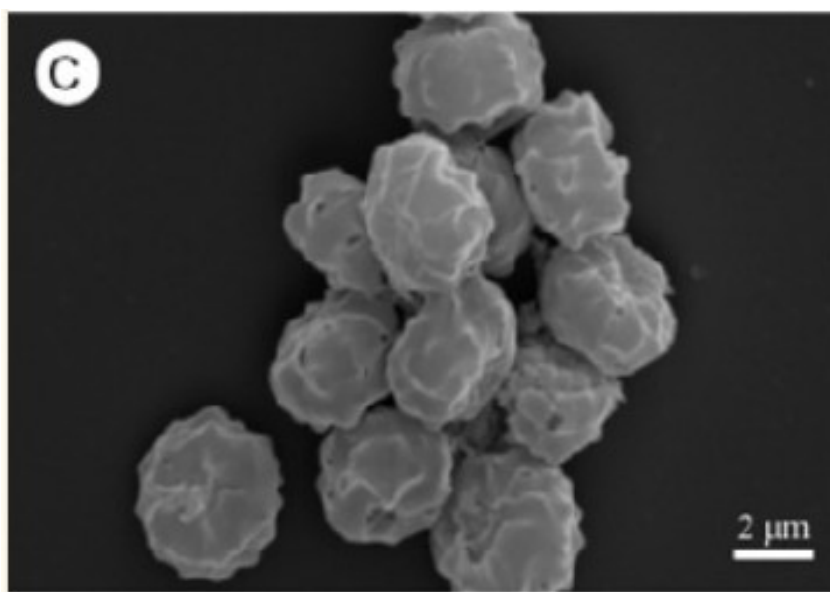


Рис. 2.2. Скануюча електронна мікрофотографія конідій *Aspergillus foetidus* [16].

2.4. Фізіолого-біохімічні ознаки *Aspergillus foetidus*

Умови культивування *A. foetidus* наступні: оптимальна температура росту становить 28-32 °C, а значення рН для біосинтезу – 5,3-5,5. При глибинному культивуванні режим аерації повинен становити 50-60 м³/кг×год, а для поверхневого – 0,1-0,2 м³/кг×год. Хоча життєдіяльність

A.foetidus відбувається за достатньої наявності кисню, він може рости при зниженому його вмісті (у фруктових соках) [17].

A. foetidus добре розвивається на субстратах, де присутні складні полімери. У малих кількостях вживає декстрини, крохмаль, сахарозу, мальтозу, лактозу, глюкозу, гліцерин. Даний вид виділяє ферментні системи, які дозволяють рости на відповідних комплексних субстратах: пектині, крохмалі, ксилані, ламінарині, бета-глюкані, лихеніні, галактоманані, ксилоглюкані. *A. foetidus* гарно асимілює нітратні та амонійні солі, глюкозу, лактозу, гліцерин, галактозу, ксилозу, D-маніт, манозу, трегалозу, L- и D-арабінозу, сорбозу, сорбіт, рибозу.

Якщо підбирати середовище для промислового культивування, то з точки зору простоти та економічності найбільше підходить середовище, що у своєму складі має пшеничні висівки (74-87%), буряковий жом (10-20%), нітратні солі лужних металів (3-6%). Це пов'язано з доступністю складових та з можливістю налаштування безвідходного виробництва [17].

2.5. Таксономічний статус *Aspergillus foetidus*

З огляду на дані, наведені у сучасних інформаційних джерелах, таксономічний статус *A. foetidus* виглядає наступним чином [18]:

Царство	<i>Fungi</i>
Тип	<i>Ascomycota</i>
Клас	<i>Eurotiomycetes</i>
Порядок	<i>Eurotiales</i>
Родина	<i>Aspergillaceae</i>
Рід	<i>Aspergillus</i>
Вид	<i>foetidus</i>
Штам	MTCC 10559

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ПЕКТОФОЕТИДИНУ

3.1. Потреба у пектофоетидині

Пектофоетидин це ферментний препарат отриманий з *Aspergillus foetidus* та містить полігалактуроназу, поліметілгалактуроназу, пектинметілестеразу, геміцелюлазу, целюлазу, і кислу протеїназу [5].

Згідно розпорядження Кабінету Міністрів України № 392-р, від 31 травня 1994 року (нині діючий) пектофоетидин віднесено до номенклатури матеріальних цінностей державного резерву з рівнем накопичення 250 кг, відповідальним за розміщення, зберігання та реалізацію даного засобу згідно даного розпорядження є Ладизинське виробниче об'єднання "Ензим". На сьогоднішній день даний препарат відсутній у вільному доступі, але переглядаючи наявну до реалізації продукцію вищезазначеного підприємства, можна спостерігати ферментні препарати які мають компоненти наявні в препараті пектофоетидин, а саме препарат «Пектолад» - містить комплекс пектиназ (використовується для розчеплення рослинних полісахаридів) [19], «Целюлаза» - містить целюлазу (використовується для розчеплення целюлози на моносахариди) [20], а також «Проторизин» - кисла протеаза (використовується для підвищення перетравності білкової складової раціонів і кращого використання кормів) [21]. Враховуючи цільове призначення даних препаратів а також враховуючи можливу комбінації їх, можна зробити висновок що оптимальним використанням комплексу даних ферментів є застосування в якості харчової добавки у тваринництві, так як використання даних ферментів дозволить покращити вивільнення поживних елементів з кормових сумішей рослинного походження (наприклад силос, жом, барда) та дозволить зменшити кількість використовуваного корму.

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування пектофоетидину	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Однорог І.М.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					24	9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

3.2. Розрахунок потужності виробництва пектофоетидину

Визначивши сферу використання пектофоетидину розрахуємо теоретичну можливу річну потребу в даному препараті. Враховуючи що за статистичними даним в Україні в тваринництві по кількості голів значно переважають свині для подальших розрахунків будемо використовувати наявні дані норм внесення пектофоетидину в їх корм [22], од. активності/т преміксу:

- для поросят віком до 60 днів – 2400;
- для поросят віком 61-120 днів та старше – 1200.

Враховуючи поділ на дві вікові категорії (до 60 днів та старше) необхідно розрахувати, яку стандартну кількість корму споживають дані категорії. Згідно даних [23], за два місяці годівлі молодих поросят витрачається приблизно 20 кг корму, а в подальшому починаючи 2 місячного віку кількість спожитого корму до досягнення 8 місячного віку становить 438,5 кг, дані наведено в табл. 3.1 [24].

Таблиця 3.1

Розрахунок кількості спожитого корму за віком

Вік, порося	Витрати корму на добу, г/добу	Загальна кількість корму, кг
2 місяці	-	20
3 місяці	1050	31,5
4 місяці	1550	46,5
5 місяців	2250	67,5
6 місяців	2550	76,5
7 місяців	3200	96
8 місяців	3350	100,5
Разом:		438,5

Дізнавшись яку кількість корму споживає одне порося, розрахуємо кількість корму яку споживають свині в двох областях з найбільшою кількістю даних тварин. Згідно даних Державної служби статистики України, станом на 1 січня 2023 року в Київській та Львівській областях знаходиться найбільша кількість поголів'я свиней, яка становить 639,8 та 464,4 тис. голів, відповідно [25]. Сумарна кількість свиней становить:

$$639,8 + 464,4 = 1104,2 \text{ тис. голів}$$

Так як серед даної кількості наявні як поросята так і свиноматки і дорослі кнури, то з заданого значення прийmemo що цільовий діапазон складає 70 % (поросята віком до 8 місяців) від заданого значення.

$$1\,104\,200 \times 0,7 = 772\,940 \text{ голів}$$

Враховуючи що від віку поросяти залежить кількість спожитого корму прийmemo що в рік підтримується стале співвідношення молодих поросят до більш дорослих та відповідає співвідношенню 1 до 5, тобто молодих віком до 2 місяці становить $772\,940 \text{ голів} / 5 = 154\,588 \text{ голів}$, а старше 2 місяців $447\,860 \text{ голів} / 5 * 4 = 618\,352 \text{ голів}$, тоді кількість спожитого корму становить:

$$154\,588 \times 20 \text{ кг} = 3\,091\,760 \text{ кг} = 3\,091,8 \text{ т}$$

$$618\,352 \times 438,5 \text{ кг} = 271\,147\,352 \text{ кг} = 271\,147,4 \text{ т}$$

Враховуючи що раніше було прийнято що в рік підтримується стале співвідношення поросят віком до 2 місяців та старше, розраховану кількість корму потрібно збільшити з розрахунком на рік, тоді загальна кількість корму спожита в рік становитиме:

$$3\,091,8 \text{ т} \times (12 \text{ місяців} / 2 \text{ місяці вік поросят}) = 18\,551 \text{ т (до 2 місяців в рік)}$$

$$271\,147,4 \text{ т} \times 6 = 1\,626\,885 \text{ т (від 2 до 8 місяців в рік)}$$

З врахуванням наведених раніше норм внесення ферменту відповідно до віку поросят, необхідна кількість ферменту яку необхідно внести на дану кількість корму становить:

$$18\,551 \text{ т} \times 2400 \text{ Од/т} = 44\,522\,400 \text{ Од}$$

$$1\,626\,885 \text{ т} \times 1200 \text{ Од/т} = 1\,952\,262\,000 \text{ Од}$$

Загальна кількість становитиме:

$$44\,522\,400 \text{ Од} + 1\,952\,262\,000 \text{ Од} = 1\,996\,784\,400 \text{ Од}$$

З огляду на стандартну активність препарату, яка становить 6000 Од/г [26], можна визначити необхідну кількість ферменту для забезпечення необхідної активності:

$$1\,996\,784\,400 \text{ Од} / 6\,000 \text{ Од/г} = 332\,797,4 \text{ г, або } 332,8 \text{ кг}$$

Враховуючи що не всі підприємці (тваринники) будуть використовувати даний препарат, або будуть використовувати конкуруючі препарати з схожою дією, прийемо що кількість продукту яку можна реалізувати з врахуванням конкуренції становитиме 45 % від загальної потреби, тоді річна потреба препарату становить:

$$332,8 \text{ кг} \times 0,5 = 166,4 \text{ кг прийемо } 166 \text{ кг}$$

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

Річна потужність виробництва пектофоеїдину: $G_{\text{гп}} = 166 \text{ кг/рік}$;

Кількість робочих днів: $T_{\text{рд}} = 30 \text{ трудоднів}$;

Стандартна активність препарату, Од/г препарату: $A_{\text{ст}} = 6\,000$

Активність препарату в культуральній рідині, Од/мл: $A_{\text{кр}} = 36,5 [4]$

Концентрація фермента в КР, $\text{кг/м}^3 \text{ КР}$: $P_{\text{кр}} = 0,026 [4]$

Частка сухих речовин в готовому продукті: $CP_{\text{гп}} = 0,95$;

Час виробничого циклу: $T_{\text{цф}} = 80 \text{ год}$ (72 год культивування + 8 год підготовка ферментера);

Коефіцієнт запасу нестерильних операцій: $K_1 = 1,1$;

Коефіцієнт заповнення ферментера: $K_3 = 0,6$;

Сумарні втрати фермента при виділенні, частка: $E_{\text{св}} = 0,18$;

Сумарні втрати активності фермента при виділенні, частка $E_a = 0,4$

Втрата культуральної рідини при краплевиносі: $E_{\text{ф}} = 0,1$

Враховуючи заплановану кількість трудоднів та час виробничого циклу, кількість виробничих циклів за рік становитиме:

$$N_{\text{цк}} = 24 \times K_1 \times T_{\text{рд}} / T_{\text{цф}} = 24 \times 1,1 \times 30 / 80 = 9,9 \text{ циклів, прийемо } 10$$

Визначивши кількість виробничих циклів, розрахуємо кількість препарату, яка утворюється за даний один виробничий цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{гп}} / N_{\text{цк}} = 166 / 10 = 16,6 \text{ ум.кг/цикл}$$

Кількість одиниць активності ферменту, що знаходиться в 1 умовному кг фермента становить:

$$A_{\text{цк}} = A_{\text{ст}} \times 1000 = 6000 \times 1000 = 6 \times 10^6$$

Розрахувавши кількість пектофетицину яка отримується за один цикл, вирахуємо кількість одиниць активності ферменту в культуральній рідині з врахуванням втрат активності при виділенні.

$$A_{\text{крт}} = A_{\text{кр}} \times 10^6 (1 - E_a) / P_{\text{кр}} = 36,5 \times 10^6 \times (1 - 0,4) / 0,026 = 8,423 \times 10^8$$

Кількість товарного ферменту за цикл становить:

$$G_{\text{цкт}} = A_{\text{цк}} \times G_{\text{цк}} / A_{\text{крт}} = 6 \times 10^6 \times 16,6 / 8,423 \times 10^8 = 0,118 \text{ тов.кг/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, який отримують за одну виробничу ферментацію з врахуванням втрат ферменту при виділенні становить:

$$V_{\text{кр}} = G_{\text{цкт}} \times C_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 0,118 \times 0,95 / (0,026 \times (1 - 0,18)) = 5,26 \text{ м}^3$$

За один виробничий цикл отримують $5,26 \text{ м}^3$ культуральної рідини, так як під час ферментації відбуваються втрати культуральної рідини в результаті краплиносу, кількість культуральної рідини з врахуванням даних втрат, становитиме:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 5,26 / (1 - 0,1) = 5,84 \text{ м}^3$$

З врахуванням коефіцієнту заповнення, приблизний геометричний об'єм ферментера становитиме:

$$V_{\text{пф}} = V_{\text{ф}} / K_z = 5,84 / 0,6 = 9,73 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий ферментер з стандартним геометричним об'ємом 10 м^3 , тоді дійсний коефіцієнт заповнення становитиме:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{кр}} / V_{\text{пф}} = 5,84 / 10 = 0,58$$

Дане значення коефіцієнту заповнення, знаходиться в допустимих межах для аеробного процесу ферментації, отже, обраний ферментер задовольняє наші вимоги.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримуємо $V_{\text{пц}} = 5,26 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Під час отримання культуральної рідини необхідно передбачити втрати КР в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\text{ф}}$), які становлять 10%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1-E_{\text{ф}}} = \frac{5,26}{1-0,1} = 5,84 \text{ м}^3$$

Робочий об'єм ферментера складається з суми об'єму поживного середовища (ПС) $V_{\text{пс1}}$ та об'єму посівного матеріалу (ПМ) $V_{\text{пм1}}$. Посівний матеріал готується в посівному апараті (ПА) та його об'єм дорівнює 10 % від об'єму поживного середовища який подається до ферментера:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 5\,840 / (1 + 0,1) = 5\,309 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 5\,840 - 5\,309 = 531 \text{ л}$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для посівних апаратів

Посівний матеріал для ферментера об'ємом 531 л готується у посівному апараті з робочим об'ємом $V_{\text{роб2}}$

$$V_{\text{роб2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{пм}}) = 531 / (1 - 0,13) = 610 \text{ л}$$

де $E_{\text{пм}} = 0,13$ – втрати культуральної рідини при вирощуванні посівного матеріалу в посівному апараті за рахунок краплиносу частини культуральної рідини під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{\text{пс2}}$ та кількість посівного матеріалу який становить 10% від об'єму поживного середовища $V_{\text{пс2}}$

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб2}} / (1 + X_{\text{пм2}}) = 610 / (1 + 0,1) = 554,6 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 610 - 554,6 = 55,4 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму посівного апарата $V_{\text{па1}}$ використовуємо $V_{\text{роб2}}$ та $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{па1}} = V_{\text{роб2}} / K_{\text{зап}} = 610 / 0,6 = 1\,016 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Aspergillus foetidus* NCIM 514 можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{\text{па}} = 1,0 \text{ м}^3$.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення становитиме:

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб2}} / V_{\text{па}} = 610 / 1\,000 = 0,61, \text{ що знаходиться в допустимих межах.}$$

Посівний матеріал об'ємом 55,4 л готується у посівному апараті з робочим об'ємом $V_{роб3}$

$$V_{роб3} = V_{пм1} / (1 - E_{пм}) = 55,4 / (1 - 0,13) = 63,68 \text{ л}$$

де $E_{пм} = 0,13$ – втрати культуральної рідини при вирощуванні посівного матеріалу в посівному апараті за рахунок крапливиносу частини культуральної рідини під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{пс3}$ та кількість посівного матеріалу $V_{пм3}$ який становить 10% від об'єму поживного середовища:

$$V_{пс3} = V_{роб3} / (1 + X_{пм3}) = 63,68 / (1 + 0,1) = 57,89 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 63,68 - 57,89 = 5,79 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму посівного апарата $V_{па2}$ використовуємо $V_{роб3}$ та $K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{па2} = V_{роб3} / K_{зап} = 63,68 / 0,6 = 106,1 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Aspergillus foetidus* NCIM 514 можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{па2} = 0,1 \text{ м}^3$.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення становитиме:

$$K_{зап2} = V_{роб2} / V_{па} = 63,68 / 100 = 0,63, \text{ що знаходиться в допустимих межах.}$$

Розрахунок ПС та ПМ для інокулятора

Посівний матеріал для посівного апарата $0,1 \text{ м}^3$ готується в інокуляторі з робочим об'ємом $V_{роб4}$

$$V_{роб4} = V_{пм3} / (1 - E_{пм4}) = 5,79 / (1 - 0,05) = 6,09 \text{ л ,}$$

де $E_{пм4} = 0,05$ – це втрати КР при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі за рахунок крапливиносу частини КР під час аерації середовища. Для одержання посівного матеріалу $V_{пм3}$ потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{пс4}$ та кількість посівного матеріалу $V_{пм4}$, яка дорівнює 10% від об'єму поживного середовища

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб4}} / (1 + X_{\text{пм4}}) = 6,09 / (1 + 0,1) = 5,54 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 6,09 - 5,54 = 0,55 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму інокулятора $V_{\text{ін1}}$ використовуємо $V_{\text{роб4}}$ та $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{ін1}} = V_{\text{роб4}} / K_{\text{зап}} = 6,09 / 0,6 = 10,15 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Aspergillus foetidus* NCIM 514 можна отримати при культивуванні в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін1}} = 10 \text{ л}$.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення становитиме:

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб3}} / V_{\text{ін}} = 6,09 / 10 = 0,61, \text{ що знаходиться в допустимих межах.}$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для качалочних колб

Кількість посівного матеріалу, що готується в колбах на качалці $V_{\text{пм4}} = 0,55 \text{ л}$. Втратами при культивуванні в колбах нехтуємо, оскільки вони малі.

$$V_{\text{роб5}} = V_{\text{пм4}} = 0,55 \text{ л}$$

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{\text{пс5}}$ та кількість посівного матеріалу $V_{\text{пм5}}$, що дорівнює 10% від об'єму поживного середовища

$$V_{\text{пс5}} = V_{\text{роб5}} / (1 + X_{\text{пм5}}) = 0,55 / (1 + 0,1) = 0,5 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм5}} = V_{\text{роб5}} - V_{\text{пс5}} = 0,55 - 0,5 = 0,05 \text{ л}$$

Для культивування використовуємо колби об'ємом $V_{\text{кол}} = 0,75 \text{ л}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зап}} = 0,2$, тоді кількість колб становитиме:

$$N_{\text{к}} = V_{\text{роб4}} / V_{\text{кол}} \times K_{\text{зап}} = 0,55 / 0,75 \cdot 0,2 = 3,6 \text{ колб, тобто 4 колби}$$

Підсумовуючи можна зазначити, що процес одержання посівного матеріалу для синтезу пектофоетидину у ферментері об'ємом 10 м^3 і з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи, узагальнені дані об'ємів апаратів на дані стадії наведено в табл. 3.2.

Об'єми апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу *Aspergillus foetidus* NCIM 514 та виробничого біосинтезу ферменту

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{Г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм ПС, $V_{\text{ПС}}$, л	Об'єм ПМ, $V_{\text{ПМ}}$, л
1	$0,750 \times 4$ колб	0,2	0,55	0,5	0,05
2	10	0,61	6,09	5,54	0,55
3	100	0,63	63,68	57,89	5,79
4	1 000	0,61	610	554,6	55,4
5	10 000	0,58	5 840	5 309	531

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ПЕКТОФОЕТИДИНУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Aspergillus foetidus*

Пектофоетидин – це комерційний препарат, який містить в собі цілий спектр петираз. В залежності від виробника він може змінюватись. Тому, було обрано синтез полігалакторунози за допомогою культивування *Aspergillus foetidus* NCIM 514. Для виробничого культивування використовується наступне середовище (г/л) [27]:

Пептон – 5,

KH₂PO₄ – 2,2,

MgSO₄ – 0,2,

Сечовина – 2,

Пектин з цедри манго – 27,3

Отже, основним джерелом вуглецю є пектин. В базі даних KEGG зазначено синонім до *A. foetidus*, а саме *A. luchuensis* тому будемо орієнтуватись по метаболічним картам саме цього біологічного агента. За інформацією з даної енциклопедії відомо, що пектин, шляхом низки реакцій біотрансформації, перетворюється в гліцерин. В свою чергу гліцерин синтезує проміжкові метаболіти гліколізу, а саме гліцерон-фосфат та 3-фосфогліцерат, які є серединою гліколітичного шляху та глюконеогенезу. В *A. luchuensis* функціонує як гліколіз так і глюконеогенез, тому катаболітичний шлях пектину буде мати частково шляхи гліколізу та глюконеогенезу [27-32].

Рис.41. показує схему катаболізму пектину в піруват.

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4.Біосинтез пектофоетидину	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Однорог І.М.					33	8
Перевір.		Карлаш Ю.В.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

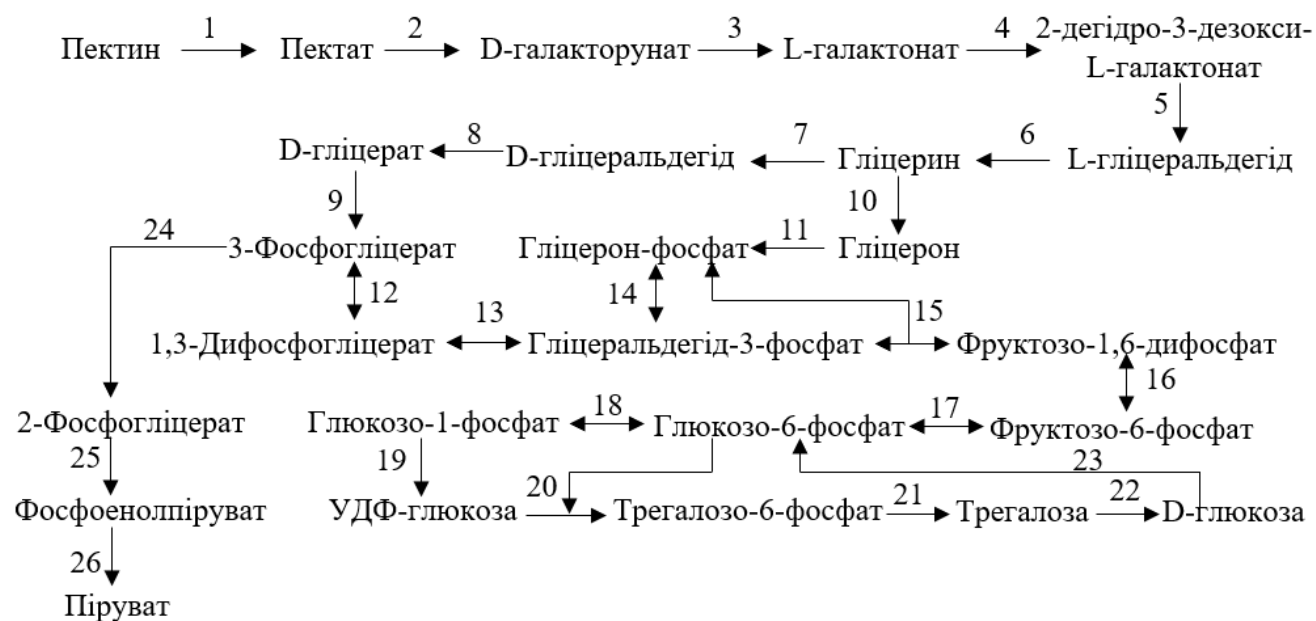


Рис.4.1. Шлях катаболізму пектину до пірувату

Ферменти: 1 - пектинестераза [ЕС:3.1.1.11], 2 - полігалактуроназа [ЕС:3.2.1.15], 3 - D-галактуронатредуктаза [ЕС:1.1.1.-], 4 - L-галактонатдегідратаза [ЕС:4.2.1.146], 5 - L-трео-3-дезоксигексозонатальдотлаза [ЕС:4.1.2.54], 6 - L-гліцеральдегідредуктаза [ЕС:1.1.1.372], 7 - алкогольдегідрогеназа (NADP+) [ЕС:1.1.1.2], 8 - альдегіддегідрогеназа (NAD+) [ЕС:1.2.1.3], 9 - D-гліцерат 3-кіназа [ЕС:2.7.1.31], 10 - гліцерол-2-дегідрогеназа (NADP+) [ЕС:1.1.1.156], 11 - дигідроксіацетонкіназа [ЕС:2.7.1.29], 12 - фосфогліцераткіназа [ЕС:2.7.2.3], 13 - гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа [ЕС:1.2.1.12], 14 - тріозофосфатізомераза [ЕС:5.3.1.1], 15 - фруктозо-дифосфатальдотлаза [ЕС:4.1.2.13], 16 - фруктозо-1,6-дифосфатаза [ЕС:3.1.3.11] та 6-фосфотриозофосфаткіназа [ЕС:2.7.1.11], 17 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза [ЕС:5.3.1.9], 18 - фосфоглюкомутаза [ЕС:5.4.2.2], 19 - УДФ-глюкозо-1-фосфатуридилтрансфераза [ЕС:2.7.7.9], 20 - регуляторна субодиниця трегалозо-6-фосфатсинтазного комплексу [ЕС:2.4.1.15], 21 - регуляторна субодиниця трегалозо-6-фосфатсинтазного комплексу [ЕС:3.1.3.12], 22 - альфа,альфа-трегалаза [ЕС:3.2.1.28], 23 - гексокіназа [ЕС:2.7.1.1], 24 - 2,3-

дифосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза [EC:5.4.2.12], 25 - енолаза [EC:4.2.1.11], 26 - піруваткіназа [EC:2.7.1.40].

Потрібно зазначити, що глюконеогенез в *A. luchuensis* доходить лише до глюкозо-1-фосфат, а з нього в грибній системі відсутні відповідні ферменти для безпосереднього синтезу глюкози. Тому, синтез цього цукру відбувається через трегалозу. Отже, пектин переходить в гліцерин під дією 6 ферментів: пектинестерази, полігалактуранази, D-галактуронатредуктази, L-галактонатдегідратази, L-трео-3-дезоксигексизонатаальдолази, та L-гліцеральдегідредуктази. Після чого, гілка синтезу ділиться на 2 частини. Одна для синтезу гліцерон-фосфату (за допомогою дигідроксіацетонкінази та фосфогліцераткінази), а інша – для синтезу 3-фосфогліцерату (під впливом алкогольдегідрогенази, альдегіддегідрогенази та D-гліцерат 3-кінази). Ці сполуки в подальшому залучаються до синтезу глюкози через глюконеогенез, але доходять лише до глюкозо-1-фосфат (за допомогою ферментів фосфогліцераткінази, гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогенази, тріозофосфатізомерази, фруктозо-дифосфатаальдолази, фруктозо-1,6-дифосфатази, глюкозо-6-фосфат-ізомерази та фосфоглюкомутази). Далі, глюкозо-1-фосфат перетворюється в УДФ-глюкозу за допомогою УТФ-глюкозо-1-фосфатуридилтрансферази. До наступної реакції залучається синтезований раніше фруктозо-6-фосфат і під дією регуляторної субодиниці трегалозо-6-фосфатсинтазного комплексу з кодом [EC:2.4.1.15] утворюється трегалозо-6-фосфат. З нього, з цієї ж субодиниці, але з іншим кодом [EC:3.1.3.12] утворюється трегалоза. Дана речовина переходить в глюкозу під дією альфа,альфа-трегалази. Сама глюкоза залучається до гліколітичного шляху за допомогою гексокінази. Шлях доходить до синтезу 2-фосфогліцерату за допомогою дифосфогліцератнезалежної фосфогліцератмутази. З нього далі синтезується фосфоенолпіруват (за дії енолази) та піруват (за допомогою піруваткінази).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у пектофоеидин

Полігалакторуноза містить усі 20 амінокислот [33]. Тому, на схемі обов'язко має бути наведено ще й цикл трикарбонових кислот, оскільки 2-оксоглутарат та оксалоацетат, які є метаболітами ЦТК є попередниками низки амінокислот [34-44].

В *A. lychuensis* функціонує декілька анаплоротичних реакцій. Це синтез оксалоацетату з малату (за допомогою малат дегідрогенази) та з пірувату (за допомогою піруват карбоксилази), а також синтез фосфоенолпірувату з оксалоацетату (в присутності фосфоенолпіруват карбоксилази). Також, ЦТК поновлюється під час синтезу аргініну, оскільки, окрім амінокислоти, за допомогою аргініносукцинат ліази утворюється фумарат.

Піруват – як кінцевий метаболіт гліколізу, є попередником аланіну, валіну, лейцину та ізолейцину. Фруктозо-6-фосфат відповідає за синтез гістидину, триптофану, фенілаланіну та тирозину. Найбільша кількість амінокислот синтезується з 2-оксалоацетату та 3-фосфогліцерату. 2-Оксоглутарат є попередником глутамату, глутаміну, проліну, аргініну та лізину. З 3-фосфогліцерату утворюється серин, гліцин, треонін, цистеїн, метіонін. Оксалоацетат синтезує аспартат та аспарагін.

Ферменти: 1 - пектинестераза [EC:3.1.1.11], 2 - полігалактураназа [EC:3.2.1.15], 3 - D-галактуранатредуктаза [EC:1.1.1.-], 4 - L-галактонатдегідратаза [EC:4.2.1.146], 5 - L-трео-3-дезоксигексизонатальдозаза [EC:4.1.2.54], 6 - L-гліцеральдегідредуктаза [EC:1.1.1.372], 7 - алкогольдегідрогеназа (NADP+) [EC:1.1.1.2], 8 - альдегіддегідрогеназа (NAD+) [EC:1.2.1.3], 9 - D-гліцерат 3-кіназа [EC:2.7.1.31], 10 - гліцерол-2-дегідрогеназа (NADP+) [EC:1.1.1.156], 11 - дигідроксіацетонкіназа [EC:2.7.1.29], 12 - фосфогліцераткіназа [EC:2.7.2.3], 13 - гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа [EC:1.2.1.12], 14 - тріозофосфатізомераза [EC:5.3.1.1], 15 - фруктозо-дифосфатальдозаза [EC:4.1.2.13], 16 - фруктозо-1,6-дифосфатаза [EC:3.1.3.11] та 6-фосфотриозофосфаткіназа [EC:2.7.1.11], 17 - глюкозо-6-фосфат-ізомераза [EC:5.3.1.9], 18 - фосфоглюкомутаза [EC:5.4.2.2], 19 - УТФ-глюкозо-1-фосфатуридилтрансфераза [EC:2.7.7.9], 20 - регуляторна субодиниця трегалозо-6-фосфатсинтазного комплексу [EC:2.4.1.15], 21 - регуляторна субодиниця трегалозо-6-фосфатсинтазного комплексу [EC:3.1.3.12], 22 - альфа,альфа-трегалаза [EC:3.2.1.28], 23 - гексокіназа [EC:2.7.1.1], 24 - 2,3-дифосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза [EC:5.4.2.12], 25 - енолаза [EC:4.2.1.11], 26 - піруваткіназа [EC:2.7.1.40], 27 - альфа-субодиниця компонента піруватдегідрогенази E1 [EC:1.2.4.1] та компонент піруватдегідрогенази E2 [EC:2.3.1.12], 28 - цитратсинтаза [EC:2.3.3.1], 29 - аконітатгідратаза [EC:4.2.1.3], 30 - ізоцитратдегідрогеназа (NAD+) [EC:1.1.1.41], 31 - Компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази E1 [EC:1.2.4.2] та Компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази E2 [EC:2.3.1.61], 32 - альфа-субодиниця сукциніл-КоА-синтетази [EC:6.2.1.4 6.2.1.5], 33 - субодиниця якоря мембрани сукцинатдегідрогенази [EC:1.3.5.1], 34 - фумаратгідратаза [EC:4.2.1.2], 35 - малатдегідрогеназа [EC:1.1.1.37], 36 - фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (АТФ) [EC:4.1.1.49], 37 - піруваткарбоксилаза [EC:6.4.1.1], 38 - транскетолаза [EC:2.2.1.1], 39 - трансальдозаза [EC:2.2.1.2] та транскетолаза [EC:2.2.1.1], 40 - рибозо-

фосфат-пірофосфокіназа [EC:2.7.6.1], 41 - рибулозофосфат-3-епімераза [EC:5.1.3.1], 42 - рибозо-фосфат-пірофосфокіназа [EC:2.7.6.1], 43 - АТФ-фосфорибозилтрансфераза [EC:2.4.2.17], 44 - фосфорибозил-АТФ пірофосфогідролаза [EC:3.6.1.31], 45 - гістидинолдегідрогеназа [EC:3.5.4.19], 46 - фосфорибозилформіміно-5-аміноімідазол карбоксамід риботид ізомераза [EC:5.3.1.16], 47 - імідазолгліцеролфосфатсинтаза [EC:4.3.2.10], 48 - імідазолегліцерин-фосфатдегідратаза [EC:4.2.1.19], 49 - гістидинол-фосфатамінотрансфераза [EC:2.6.1.9], 50 - гістидинол-фосфатаза [EC:3.1.3.15], 51,52 - гістидинолдегідрогеназа [EC:1.1.1.23], 53 - 3-дезоксид-7-фосфогептулатсинтаза [EC:2.5.1.54], 54 - пентафункціональний поліпептид AROM [EC:4.2.3.4], 55 - пентафункціональний поліпептид AROM [EC:4.2.1.10], 56 - пентафункціональний поліпептид AROM [EC:1.1.1.25], 57 - пентафункціональний поліпептид AROM [EC:2.7.1.71], 58 - пентафункціональний поліпептид AROM [EC:2.5.1.19], 59 - хоризматсинтаза [EC:4.2.3.5], 60 - антранілатсинтаза [EC:4.1.3.27], 61 - антранілатфосфорибозилтрансфераза [EC:2.4.2.18], 62 - фосфорибозилантранілатізомераза [EC:5.3.1.24], 63 - індол-3-гліцеролфосфатсинтаза [EC:4.1.1.48], 64 - триптофансинтаза [EC:4.2.1.20], 65 - хоризматна мутаза [EC:5.4.99.5], 66 - префенатдегідратаза [EC:4.2.1.51], 67,69 - аспаратамінотрансфераза, мітохондріальна [EC:2.6.1.1], 68 - префенатдегідрогеназа (NADP+) [EC:1.3.1.13], 70 - аланінтрансаміназа [EC:2.6.1.2], 71 - глутаматсинтаза (NADH) [EC:1.4.1.14], 72 - 1-піролін-5-карбоксилатдегідрогеназа [EC:1.2.1.88], 73 - піролін-5-карбоксилатредуктаза [EC:1.5.1.2], 74 - глутамінсинтетаза [EC:6.3.1.2], 75 - орнітинкарбамоїлтрансфераза [EC:2.1.3.3], 76 - аргініносукцинатсинтаза [EC:6.3.4.5], 77 - аргініносукцинатліаза [EC:4.3.2.1], 78 - аргіназа [EC:3.5.3.1], 79 - орнітинкарбамоїлтрансфераза [EC:2.1.3.3], 80 - гомоцитратсинтаза [EC:2.3.3.14], 81 - гомоаконітаза [EC:4.2.1.-], 82 - гомоаконітатгідратаза [EC:4.2.1.36], 83 - гомоізоцитратдегідрогеназа [EC:1.1.1.87], 84 - 2-аміноадипаттрансаміназа [EC:2.6.1.39], 85,86,87 - L-2-аміноадипатредуктаза

[EC:1.2.1.95], 88 - сахаропіндегідрогеназа (NADP+) [EC:1.5.1.10], 89 - сахаропіндегідрогеназа (NAD+) [EC:1.5.1.7], 90 - аспартатамінотрансфераза, мітохондріальна [EC:2.6.1.1], 91 - аспарагінсинтаза [EC:6.3.5.4], 92 - D-3-фосфогліцератдегідрогеназа [EC:1.1.1.95], 93 - фосфосеринамінотрансфераза [EC:2.6.1.52], 94 - фосфосеринфосфатаза [EC:3.1.3.3], 95 - гліцингідроксиметилтрансфераза [EC:2.1.2.1], 96 - треонін-альдолаза [EC:4.1.2.48], 97 - треонінсинтаза [EC:4.2.3.1], 98 - гомосеринкіназа [EC:2.7.1.39], 99 - гомосерин O-ацетилтрансфераза [EC:2.3.1.31], 100 - цистатіонін гамма-синтаза [EC:2.5.1.48], 101 - цистатіонін гамма-ліаза [EC:4.4.1.1], 102 - цистеїн-S-кон'югат бета-ліази [EC:4.4.1.13], 103 - гомоцистеїн S-метилтрансфераза [EC:2.1.1.10], 104 - треоніндегідратаза [EC:4.3.1.19], 105,110 - велика субодиниця ацетолактатсинтази [EC:2.2.1.6], 106,107,111,112 - редуктоізомераза кетолової кислоти [EC:1.1.1.86], 108,113 - дигідроксикисла дегідратаза [EC:4.2.1.9], 109,114 - амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом [EC:2.6.1.42], 115 - 2-ізопропілмалатсинтаза [EC:2.3.3.13], 116,117 - 3-ізопропілмалатдегідратаза [EC:4.2.1.33], 118 - 3-ізопропілмалатдегідрогеназа [EC:1.1.1.85], 119 - амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом [EC:2.6.1.42].

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПЕКТОФОЕТИДИНУ

5.1. Вибір умов і способу культивування

Aspergillus foetidus NCIM 514 обрано як цільовий продуцент полігלקторунози. Оптимальною температурою росту для аспергілови грибів вважається 25-30 °С [45]. Враховуючи те, що зазначений продуцент культивується за 30 °С [4], можемо зробити висновок про доцільність підбраного параметру.

Задля максимального біосинтезу ферментів для обраного біологічного агента оптимальним рівнем рН вважається 5,0 [46]. Культивування *A. foetidus* NCIM 514 проходить при рН 5,8, що відрізняється від значення оптимуму. Тому, пропонується використати оптимальне значення для синтезу полігלקторунози.

Аспергілові гриби культивують і глибинним і поверхневим методом. Поверхневий метод для цих грибів передбачає в першу чергу тверді середовища [47]. До того ж, для такого середовища дуже важко забезпечити стерильні умови, які нам необхідні через температуру культивування, яка підходить великій кількості біологічних агентів. Також важко контролювати рівень рН, оскільки при твердофазному культивування його розподіл буде далеко не найкращим. Ще одним моментом, чого не можна застосувати дану технологію для *A. foetidus* NCIM 514 – це рідке середовище, на якому гриб культивується. Поверхневий метод дуже незручний, оскільки в будь-якому випадку потребує великих площ для нормального біосинтезу. Через що, пропонується обрати глибинний, який має більшу кількість переваг, а також дозволяє автоматизувати процес.

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми пектофоетидину	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Однорог І.М.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					41	17
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Глибинне культивування проводять за допомогою періодичного або безперервного методу. Полігакторуноза має як антибактеріальні [48], так і протигрибкові властивості [49]. Тому, виключати можливий фактор інгібування росту *A. foetidus* NCIM 514 неможна. Через це, використання безперервного способу буде лише ускладнювати процес культивування, оскільки в якийсь момент біомаса продуцента може частково або повністю загнути. Для використання цього методу необхідно проводити додаткові дослідження, щоб можна було оптимізувати цей процес. Періодичний метод є більш бажаним для даної ситуації, а також дозволяє його автоматизувати.

A. foetidus NCIM 514 – це аеробні гриби, які потребують кисню для свого культивування [50]. Через це, варто передбачити підготовку аераційного повітря. Крім того, потрібно визначити швидкість перемішування даної культури, оскільки є потреба в кисні, а також культивування відбувається глибинно. Швидкість обертів при вирощуванні грибів *A. foetidus* варіюється від 120 до 250 об/хв [51-53]. *A. foetidus* NCIM 514 культивується при 150 об/хв [4], що можна вважати оптимальним значенням для нормального росту продуцента.

Підсумовуючи вищенаведене, умови культивування будуть наступними: підготовка аераційного повітря, 30 °C, pH 5,0, 150 об/хв, асептичність процесу, глибинне культивування періодичним методом.

5.2. Вибір типу ферментера

Цільовим продуктом виробництва є фермент, а тому пропонується обрати ферментер на 10 м³. Даний фермент є екзометаболітом, тобто виділяється в супернатант. Тому біомасу зберігати в цілісності не є обов'язковим. Оскільки ферментер має великий об'єм, пропонується виготовити його на замовлення.

З виконанням цього завдання можуть впоратись компанія LABOAO, яка працює за стандартом ISO9001. В даній компанії є досвід роботи з виготовленн япромислових ферментерів [54].



Рис.5.1. Приклад роботи LABOAO [54]

Для забезпечення наших потреб необхідно виконати ферментер з подвійною сорочкою. З нержавіючої сталі типу AISI 316L. Обов'язково ферментер повинен мати мішалку (оскільки збереження біомаси не є головною ціллю. Можна обійтись звичайною лопатевою мішалкою). Також, апарат має бути обладнаним датчиками контролю температури, рН, розчиненого кисню, також контролерами подачі повітря. Обладнання та комунікації до нього мають витримувати температурний режим стерилізації, а також повинен мати можливість підключення до СІР мийки.

5.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Aspergillus foetidus є аеробом тому процес отримання посівного матеріалу та виробничий синтез повинен відбуватись з аерацією. З огляду на необхідність дотримання асептичних умов перед внесенням повітря в посівні апарати та виробничий ферментер, його необхідно очистити. Для отримання стерильного повітря необхідно провести наступні стадії:

1. Забір атмосферного повітря
2. Очищення на фільтрі грубого очищення
3. Стиснення повітря
4. Охолодження стиснутого повітря
5. Видалення конденсованої вологи
6. Стабілізація тиску та нагрівання повітря

7. Очищення в фільтрах тонкого очищення та індивідуальних фільтрах

Для початку необхідні відібрати повітря, відбір повітря відбувається в найвищій точці виробничої будівлі + 2-3 м. Відібране повітря в подальшому направляють на фільтр грубого очищення для видалення крупних частинок пилу та досягнути ступінь очищення 90 %. Після проходження фільтра грубого очищення, повітря направляють в компресор де відбувається його стиснення для подолання опору фільтрувальних матеріалів на наступних етапах підготовки. Під час процесу стиснення відбувається збільшення температури до 120-200 °C. В результаті чого після даної стадії його подають в теплообмінник для охолодження та конденсації зайвої вологи, охолодження відбувається до точки роси. Після охолодження його направляють в ресивер для зменшення пульсації руху повітря (врівноваження потоку) а також остаточного видалення зайвої вологи, та в подальшому направляють на теплообмінник для нагрівання до оптимальної температури. Заключним етапом очищення повітря є пропускання його крізь фільтр тонкого очищення та пропускання крізь індивідуальні фільтри які встановлюються безпосередньо перед апаратами в які повітря направляється.

5.4. Обґрунтування та вибір стадій санітарної підготовки виробництва пектофоетидину

При виборі миючих та дезінфікуючих засобів потрібно враховувати, що не можна застосовувати тривалий час один вид дезінфікуючого засобу, бо може виникнути резистентна мікрофлора. Тому слід комбінувати/чергувати різні види миючих засобів. Так, рекомендовано дезінфікуючий засіб змінювати кожні 2 тижні або застосовувати декілька типів.

При виборі підходящого дезрозчину варто орієнтуватися на ціну (економічність), ефективність проти різних форм мікроорганізмів (бактерицидна та фунгіцидна дії), доступність та можливу токсичність. Використовуваний засіб не повинен згубно впливати на організм людини, або потрібно використовувати його в такій концентрації, яка не шкодить здоров'ю працюючого персоналу [55].

Для обробки стін, підлоги, вікон та дверей пропонується використовувати хлорамін і перекис водню. Бо дані засоби мають наступні переваги: відносна дешевизна, доступність, висока активність до патогенних мікроорганізмів.

Перекис водню (пергідроль, H_2O_2 , ГОСТ 177-88) – прозора, безколірна, негорюча, пожежовибухонебезпечна, водоподібна рідина, являє собою сильний окислювач, здатна самотійно розкладатися на воду та кисень. Розчини низької концентрації можуть розкладатися при нагріванні, в присутності органічного пилу або речовин, що діють каталітично (метали, солі металів) [55, 56].

Хлорамін-Б (натрієвою сіллю хлорамідубензолсульфокислоти) - антисептичний засіб; кристалічний порошок білого кольору або зі світло-жовтим відтінком і з незначним запахом хлору. У цьому засобі міститься від 24 до 27 відсотків активного хлору [55, 57].

Варто пам'ятати, що обробка стін, підлоги, вікон та дверей має здійснюватися на щоденній основі, тому використовувати хлорамін і перекис водню доволі вигідно через їхню відносно низьку вартість. До переваг даних деззасобів є те, що вони швидко розкладаються в навколишньому середовищі, а з точки зору екологізації виробництва це неодмінна перевага. Хоч дані дезінфекційні розчини і мають погані антикорозійні властивості, але використовувати на технологічному обладнанні їх не планується, а для стін та підлоги це не критично.

Для обробки обладнання використовувати робочий розчин Біомой 0,3% та Новохлор-екстра. Дезінфікуючий засіб Біомой (лужна фосфатаза) випускається у вигляді концентрату в пластиковій пляшці об'ємом 1 л. а відміну від інших мийних засобів, виявляє високу мийну активність при температурі не вище $(40 \pm 5) ^\circ C$. Перевагою є те, що даний розчин не ушкоджує об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю, емалі. Засіб

належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007), не виявляє кумулятивні, шкіряно-резорбтивні та алергенні властивості [58].

Новохлор-екстра - Рідкий універсальний концентрований лужний дезінфекційний засіб на основі гіпохлориту натрію і комплексу допоміжних функціональних компонентів (мийні, ароматизуючі, антикорозійні компоненти, стабілізатор вмісту активного хлору). Засіб ефективний проти широкого спектра мікроорганізмів. Відноситься до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007-76). Не має сенсibilізуючої і мутагенної дії. Розчини «Новохлор-Екстра» з вмістом активного хлору від 0,01% до 0,1% можуть застосовуватися в присутності осіб, не причетних до проведення дезінфекційних робіт. Засіб і його розчини не ушкоджують вироби з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів (в т. ч. полістиролу, поліетилену, полівініл-хлориду, поліуретану), деревини, кераміки, лакофарбове, гальванічне і полімерне покриття. Можна використовувати як вручну так і для CIP – мийки [55, 59].

Також, для обробки обладнання та миття резервуарів пропонується використовувати **розчин Ecolab та каустичну соду**. Обробляти обладнання цими засобами можна здійснювати за допомогою CIP- мийки, а не вручну, бо це більш економічний метод (витрати миючих засобів для одного циклу становить 20%...30%, а в ручну 50% об'єму) [55].

Ecolab COSA CIP 90 — це м'яко лужний миючий засіб, що містить поверхнево-активну речовину, для чистого очищення на місці (CIP) у фармацевтичному технологічному обладнанні, включаючи змішувачі трубопроводів, псевдозріджені шари, резервуари та ємності для зберігання. Майже нейтральна формула Ecolab COSA CIP 90 також дозволяє чистити вручну (у певних ситуаціях це може бути корисно). Підтримується повним пакетом валідації, включаючи методи визначення прийнятних залишкових рівнів і аналітичні методи кількісного визначення залишків. Його формула поверхнево-активних речовин і секвестрантів

використовується для широкого очищення від різних видів контамінантів [55, 61].

Спираючись на досвід проходження практики на сучасному фармацевтичному підприємстві ТОВ «БІОФАРМА ПЛАЗМА» можна сказати, що на підприємствах для обробки рук персоналу часто використовують «Стериліум», розчин рецептури «С-4» (суміш розчинів перекису водню та мурав'їної кислоти), 76% розчин етилового спирту, «Неостерил М».

Серед наведених антисептичних засобів, перевагу варто надати найбільш безпечному для шкіри рук працівників, адже обробка рук повинна проводитися регулярно і агресивні антисептичні засоби значно погіршують стан шкіри, таким засобом є «Стерилліум» [62].

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: діючі речовини: 2-пропанол 43,0-47,0; 1-пропанол — 28,5-31,5; мецетроніюетилсульфат 0.18-0,22; допоміжні речовини: зволожуючі, пом'якшуючі компоненти.

Асептичний засіб «Стерилліум» має такі властивості: - зменшує кількість транзитної мікрофлори шкіри за 30 секунд у 100 тисяч разів;

- швидкодіючий засіб, що зберігає свою дію протягом 1 години на незахищеній шкірі рук;

- не подразнює шкіру;

- не порушує водно-жирового балансу шкіри. Засіб володіє фунгіцидною, туберкулоцидною та пролонгованою бактерицидною дією. Враховуючи, що засоби для дезінфекції треба комбінувати, щоб не виникла резистентна мікрофлора, то оберемо ще одну речовину для обробки рук персоналу [62].

Враховуючи, що як розчин рецептури «С-4» так і етиловий спирт негативно впливають на шкіру рук працівників, зупинимо свій вибір на «Неостерил М».

Неостерил М містить неіоногенні і амфотерні поверхнево-активні речовини, полігексанід, зволожуючі компоненти. Засіб має бактерицидну (в т. ч. проти *E.coli*, *S.aureus* і *P.aeruginosa*), фунгіцидну (проти *C.albicans*) і віруліцидну (в т. ч. проти вірусів грипу, герпесу, ротавірусів та ін.) дії. Належить до 4 класу небезпеки за ДСТУ 12.1.007-76. Тобто є доволі безпечним для шкіри рук [63].

Для загальної дезінфекції часто використовують 3% розчин перекису водню. Це ефективний спосіб боротьби з бактеріями, вірусами та грибами. У разі потреби у більш інтенсивній дезінфекції можна використовувати більш концентровані розчини, наприклад, 6-10%.

Щодо хлораміну-Б, його концентрація зазвичай коливається від 0,5% до 2%. Цей засіб ефективний проти багатьох мікроорганізмів, включаючи бактерії, грибки та віруси.

Новохлор-екстра рекомендується використовувати у концентрації від 0,1% до 1%. Цей засіб може бути ефективним для дезінфекції різноманітного обладнання та поверхонь у медичних закладах, громадських приміщеннях тощо.

Щодо Ecolab COSA CIP 90, концентрація для дезінфекції обладнання також може варіюватися в залежності від потреб та вимог. Рекомендується дотримуватися інструкцій виробника, які зазвичай надаються на упаковці або в технічних документах.

У випадку Неостерилу М, зазвичай використовується розчин з концентрацією від 0,5% до 2% для ефективної дезінфекції обладнання та приміщень. Цей засіб може бути ефективним проти багатьох патогенних мікроорганізмів.

Обробка рук персоналу

Серед найбільш поширених засобів можна відзначити «Стериліум», та «Неостерил М». Однак, з огляду на частоту використання та здоров'я шкіри, варто обирати найбільш безпечні для неї засоби.

«Стериліум», який містить 2-пропанол, 1-пропанол та мецетроній етилсульфат, вирізняється м'якою дією та високою ефективністю проти мікроорганізмів. Він зменшує кількість транзиторної мікрофлори шкіри вдвічі за 30 секунд і зберігає свою дію до 1 години. При цьому, він не подразнює шкіру і не порушує її водно-жировий баланс, а також має бактерицидну та фунгіцидну дію.

«Неостерил М» містить неіоногенні та амфотерні поверхнево-активні речовини, полігексанід і зволожуючі компоненти. Він має широкий спектр антимікробної дії, включаючи бактерицидну, фунгіцидну та віруліцидну активність. Класифікований як засіб 4-го класу небезпеки, він вважається безпечним для шкіри рук персоналу.

«Неостерил М» є оптимальним вибором для регулярної обробки рук персоналу, оскільки забезпечує ефективний захист від мікроорганізмів, при цьому дбайливо впливаючи на шкіру, зберігаючи її здоров'я та комфорт. З урахуванням цих фактів, «Неостерил М» є оптимальним вибором для регулярної обробки рук персоналу, оскільки забезпечує ефективний захист від мікроорганізмів, при цьому м'яко діє на шкіру, зберігаючи її здоров'я та комфорт [63].

Для встановлення обсягів поверхонь для обробки використаємо специфікацію обладнання з його габаритними розмірами. У ферментаційному відділенні наявні інокулятори та виробничий ферментер на $6,3 \text{ м}^3$. Висота ферментера становить близько 4 м, приймаємо висоту поверху – 6 м.

Загальна площа приміщення, де встановлено дане обладнання становить $4 \text{ м} \times 6 \text{ м} = 24 \text{ м}^2$. Враховуючи, що поверхня стін даного приміщення теж підлягає миттю та дезінфекції на висоту 2,5 м, загальна площа обробки становитиме:

$$\sum F = (6 \text{ м} \times 4 \text{ м}) + (6 \text{ м} + 6 \text{ м} + 4 \text{ м} + 4 \text{ м}) \times 2,5 \text{ м} = 24 \text{ м}^2 + 20 \text{ м}^2 = 44 \text{ м}^2$$

Загальний обсяг обладнання, яке підлягає миттю, становить:

$$20+10+100+630+6300 = 7060 \text{ л}$$

Оскільки при використанні СІР-мийки витрата становить 20% від обсягу обладнання, то поверхня для миття буде наступною:

$$7060 * 20\% / 100\% = 1\,412\text{л}$$

Дані щодо розрахунків розглянутих миючих та дезінфікуючих засобів представлено у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Розрахунок показників миючих та дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, грн/л	Витрати робочого розчину, л/м ²	Ефективність використання дез. розчину, Е _{дз} , грн/м ²
Перекис водню	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	3%	91	2,73	0,1	0,03
Хлорамін-Б	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	1%	275	2,75	0,1	0,03
Новохлор-екстра	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	0,5%	108	0,54	0,1	0,005
Ecolab COSA CIP 90	Обладнання	0,3%	459	1,37	0,1	0,01

5.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для *Aspergillus foetidus*

Для вирощування посівного матеріалу *Aspergillus foetidus* NCIM 514 та на виробничий синтез пектофоетидину використовують поживне середовище з наступним складом, г/л:

Пектин з шкірки манго – 27,3;

Пептон – 5;

KH_2PO_4 – 2,2;

MgSO_4 – 0,2;

Сечовина – 2.

З огляду на те що пектин з шкірки манго використовується на всіх стадіях культивування *Aspergillus foetidus* NCIM 514, а процес його отримання передбачає декілька етапів, підготовку даного компонента проводитимуть в одному реакторі на увесь технологічний процес. Процес отримання пектину з шкірки манго включає наступні етапи:

1. Висушування шкірки манго (вміст пектину в шкірці манго 26 %, для отримання 162 кг пектину, необхідно 623 кг шкірки манго, при висушуванні шкірки манго втрата по вазі складає 70%, тоді отримаємо 187 кг сухої шкірки манго);

2. Подрібнення;

3. Оброблення 0,05 М розчином хлоридної кислоти (вносять 50 мл кислоти на 15 г подрібненого манго, для 187 кг необхідно 620 л 0,05 М соляної кислоти);

4. Видалення осаду, фільтруванням;

5. Осадження пектину з фільтрату етанолом (1 об'єм фільтрату 2 об'єми етанолу);

6. Виділення осаду;

7. Сушіння осаду.

Об'єм пектину який використовується на певних стадіях технологічного процесу та його загальна кількість наведено в табл. 5.2.

Розрахунок об'єму пектину в залежності від стадії культивування

Стадія	Об'єм середовища, л	Кількість пектину, 27,3 г/л,
Колби на качалках	0,5	13,65
Інокулятор 10 л	5,54	151,24
Посівний апарат 100 л	57,89	1 580,4
Посівний апарат 1 м ³	554,6	15 140,6
Ферментер 10 м ³	5 309	144 935,7
Разом		161 821,59

Ознайомившись з складом поживного середовища розглянемо більш детально процес приготування та стерилізації компонентів в залежності від стадії технологічного процесу.

Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Для вирощування посівного матеріалу в качалочних колбах необхідно приготувати 500 мл поживного середовища, через невеликий об'єм поживного середовища стерилізації середовища відбуватиметься в автоклаві. Поділ компонентів на композиції відбувається з врахуванням відношення даних компонентів до температури та виглядає наступним чином:

Композиція А: пектин, пептон та сечовина (112 °С, 15 хв, 0,05 МПа).

Композиція Б: KH_2PO_4 (131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: MgSO_4 (131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Пектин, пептон та сечовина відносяться до термолабільних компонентів, тому їх об'єднують в одну композицію та стерилізують при 112 °С впродовж 15 хв. Сульфат магнію та калій фосфорнокислий відокремлюємо через те, що при їх сумісній стерилізації буде виділятися осад. Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування 500 мл поживного середовища наведено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

**Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для
стадії вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках**

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компоненту в 500 мл поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Пектин	27,3	13,65	А	300
Пептон	5	2,5		
Сечовина	2	1		
Вода	283 мл			
КН ₂ РO ₄	2,2	1,1	Б	100
Вода	99 мл			
МgSO ₄	0,2	0,1	В	100
Вода	100 мл			
Всього				500

Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л необхідно приготувати 5,54 л поживного середовища, з огляду на невеликий об'єм поживного середовища процес стерилізації проводитимемо в автоклаві, тоді поділ компонентів на композиції буде виглядати як і на попередній стадії. Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування 5,54 л поживного середовища наведено в табл. 5.4.

Таблиця 5.4

**Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для
стадії вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л**

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компоненту в 5,54 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Пектин	27,3	151,24	А	2
Пептон	5	27,7		
Сечовина	2	11,08		
Вода	1 810 мл			

КН ₂ РО ₄	2,2	12,19	Б	1,84
Вода	1 828 мл			
МgSO ₄	0,2	1,11	В	1,7
Вода	1 700 мл			
Всего				5,54

Вирощування посівного матеріалу в посівних апаратах об'ємом

100 л та 1 м³

Для вирощування посівного матеріалу в посівних апаратах об'ємом 100 л та 1 м³ необхідно приготувати 57,89 та 554,6 л поживного середовища, відповідно. В порівнянні з попередніми стадіями на дані стадії необхідно значно більший об'єм поживного тому процес приготування та стерилізації композицій відбуватиметься в реакторах. Поділ компонентів на композиції відбувається як і на попередніх стадіях з однією відмінністю, композиції солей об'єднують.

Композиція А: пектин, пептон та сечовина. Режим стерилізації: 112 °С протягом 15 хв при 0,05 МПа.

Композиція Б: KH_2PO_4 та MgSO_4 . Режим стерилізації: 131 °С протягом 40 хв при 0,15 МПа.

Процес стерилізації розчинів в реактор відбувається за допомогою гострої пари, тому в процесі розрахунку необхідної кількості компонентів було враховано 10 % конденсату. Розрахунок кількості компонентів для приготування поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівних апаратах об'ємом 100 л та 1 м³ наведено в табл. 2.4 та табл. 5.5, відповідно.

Таблиця 5.5

**Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для
стадії вирощування посівного матеріалу в посівному апараті
об'ємом 100 л**

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компоненту в 57,89 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Пектин	27,3	1 580,4	А	18,7
Пептон	5	289,45		
Сечовина	2	115,78		
Вода	15,1 л			
Конденсат	1,7 л			
КН ₂ РO ₄	2,2	127,36	Б	39,19
MgSO ₄	0,2	11,58		
Вода	35,49 л			
Конденсат	3,56 л			
Всього				57,89

Таблиця 5.6

**Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для
стадії вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1
м³**

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компоненту в 554,6 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Пектин	27,3	15 140,6	А	186
Пептон	5	2 773		
Сечовина	2	1 109,2		
Вода	148,4 л			
Конденсат	18,6 л			
КН ₂ РO ₄	2,2	1 220,1	Б	368,6
MgSO ₄	0,2	110,9		
Вода	330,5 л			
Конденсат	36,8 л			
Всього				

Виробничий синтез пектофоетидину в ферментері об'ємом 10 м³

Для виробничого синтезу в ферментері об'ємом 10 м³ необхідно приготувати приблизно 5,3 м³ поживного середовища, враховуючи значний об'єм середовища, процес його стерилізації доцільно провести в установці безперервної стерилізації. Для цього спочатку розчиняють компоненти в воді в одному реакторі та в подальшому направляють в УБС.

Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування 5,3 м³ поживного середовища наведено в табл. 5.7.

Таблиця 5.7

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для виробничого синтезу пектофоетидину в ферментері об'ємом 10 м³

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компоненту в 5 309 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Пектин	27,3	144 935,7	А	5 309
Пептон	5	26 545		
Сечовина	2	10 618		
КН ₂ РO ₄	2,2	11 680		
MgSO ₄	0,2	1 062		
Вода	4 052 л			
Конденсат	1 062 л			
Всього				5 309

5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Під час приготування солей для стадій вирощування посівного матеріалу в посівних апаратах об'ємом 100 л та 1 м³, сульфат магнію та монофосфат калію об'єднують в одну композиції, для того щоб при нагріванні даної композиції, під час стерилізації, не утворився осад необхідно зменшити рівень рН композиції до значення 4,0. Після стерилізації композиція солей об'єднується з іншими стерильними компонентами поживного середовища та відбувається внесення інокуляту, враховуючи що

оптимальним значенням рН для росту *Aspergillus foetidus* NCIM 514 є 5,8 необхідно внести луг для збільшення даного значення. В якості титрувальних агентів для регуляції рівня рН поживного середовища можна використовувати 6 % розчин хлоридної кислоти, та 6 % розчин гідроксиду натрію.

В процесі отримання пектину використовується 0,05 М розчин хлоридної кислоти, отже слід передбачити стадію приготування даного титрувального розчину.

Кількість лужного та кислотного титранту розраховується за принципом 2 мл на 1 л об'єму стадії. Особливості приготування та необхідна кількість титрувальних агентів на весь технологічний процес наведено в табл. 5.8.

Таблиця 5.8

Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних агентів

Об'єм середовища, л	NaOH (6%)		HCl (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
57,89	116	у колбі об'ємом 2 л	116	у колбі об'ємом 2 л
554,6	1 110		1 110	

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ПЕКТОФОЕТИДИНУ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання для біосинтезу пектофоетидину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозбірник об'ємом вироблений компанією "InnovaGroup", виготовлений з нержавіючої сталі і призначений для збирання повітря. Він може працювати при температурі до 180 °С і витримувати тиск до 1 Мпа [64].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр кишеньковий прямокутний ВКФ 600х300, вироблений компанією "Турбовент", призначений для фільтрації повітря. Фільтр має розміри 300х600х400 мм і складається з прямокутних кишеньок. Фільтрувальний матеріал, використовуваний у фільтрі, є синтетичним волокном класу G4 [65].
К-3	Компресор	1	Компресор M250B18-1. Виробник: «Matari». Продуктивність: 320 л/хв; потужність: 1,8 кВт [66].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Промисловий осушувач повітря рефрижераторного типу («Dalgakiran»). Продуктивність: 1700 м ³ /год; габарити, мм: 390х344х320; потужність: 5,7 кВт [67].
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер ПЗВ 500-600-11-01 Виробник: «Zelko». Об'єм, л: 500; максимальний тиск: 11 бар; габаритні розміри, мм: 2125х600 [68].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Нагрівач повітря НКВ 1000х500-2 Виробник: «Вентс». Мінімальний робочий тиск 16 бар, робоча температура 100 °С. Габаритні розміри, мм: 1165х540х200 [69].
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Компактний кишеньковий фільтр класу F7 NanoProtect («Philips»). Фільтрувальний матеріал: мікроскловолокло; Е>95% [70].
Р-8	Реактор	1	Реактор об'ємом 800 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, сорочкою та датчиком температури [71].

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Однорог І.М.				РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання для виробництва пектофоетидину	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						58	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Н-9 Н-14 Н-17 Н-33	Відцентровий насос	3	Насос відцентровий QHS-65-5, AISI 304, з продуктивністю 29,1 м ³ [72].
СШ-10	Сушильна шафа	1	Сушильна шафа СП-1130, об'єм внутрішньої камери 1130 л, максимальна температура 300 °С, габаритні розміри 1200х1894х1312 мм [73].
ПМ-11	Подрібнювач молотковий	1	Подрібнювач ДКУ-350, продуктивність 200 кг/год [74].
ДЗ-12 ДЗ-30	Дозатор	2	Дозатор СБ-100, максимальна вага наважки 320 кг [75].
Р-13	Реактор	1	Реактор об'ємом 1 м ³ , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, сорочкою та датчиком температури, габаритні розміри 1400*1400*2600 мм [76].
МФП-15	Мембранний фільтр-прес	1	Мембранний фільтр-прес, з продуктивністю 700 л/год [77].
Р-16	Реактор	1	Реактор об'ємом 2 м ³ , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, сорочкою та датчиком температури, габаритні розміри 2000*2000*3200 мм [76].
ІФ-18 ІФ-22 ІФ-28 ІФ-35	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр повітряний SPF-005. Фільтруючий матеріал: боросилікатне волокно; діапазон температур: 1,5-150 °С ступінь очищення повітря фільтром: 99,999 % [78].
Ін-19	Інокулятор	1	Ферментер BIOTECH-10, об'ємом 10 л виготовлений з нержавіючої сталі оснащений сорочкою, мішалкою, датчиком температури розчиненого кисню, діаметр – 300 мм, висота – 1600 мм [29].
Р-20	Реактор	1	Реактор SS-20L об'ємом 20 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, сорочкою та датчиком температури, манометром [30].
Р-21	Реактор	1	Реактор об'ємом 10 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, сорочкою та датчиком температури [31].
ПА-23	Посівний апарат	1	Ферментер BIOTECH-100, об'ємом 100 л виготовлений з нержавіючої сталі оснащений сорочкою, мішалкою, датчиком температури розчиненого кисню, діаметр – 400 мм, висота – 2000 мм [79].
Р-24	Реактор	1	Реактор об'ємом 50 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, сорочкою та датчиком температури, габаритні розміри 800*800*1600 мм [81].

Закінчення таблиці 6.1

ДЗ-25 ДЗ-31	Дозатор	2	Дозатор максимальна межа дозування 50 кг [82].
Р-26	Реактор	1	Реактор JSR-200L об'ємом 200 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, сорочкою та датчиком температури, габаритні розміри 1100*1500*2800 мм [83].
Н-27 Н-37	Насос перистальтичний	2	Насос перистальтичний МР-8118.12, продуктивністю 352 л/год [84].
ПА-29	Посівний апарат	1	Ферментер BIOTECH-1000, об'ємом 1000 л виготовлений з нержавіючої сталі оснащений сорочкою, мішалкою, датчиком температури розчиненого кисню, діаметр – 900 мм, висота – 3000 мм [79].
Р-32	Реактор	1	Реактор об'ємом 5 м ³ , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, сорочкою та датчиком температури, габаритні розміри 2700*2700*4200 мм [76].
УБС-34	УБС		Установка безперервної стерилізації продуктивністю 5 м ³
Фр-36	Ферментер 10 куб		Ферментер об'ємом 10 м ³ виготовлений з нержавіючої сталі оснащений сорочкою, мішалкою, датчиком температури розчиненого кисню [85].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПЕКТОФОЕТИДИНУ

Для культивування *Aspergillus foetidus* NCIM 514 з метою одержання пектофоетидину передбачається ряд допоміжних робіт, до яких входить підготовка аераційного повітря, підготовка титрувальних агентів, приготування пектину з шкірки манго, а також підготовку та стерилізацію поживного середовища для етапів накопичення посівного матеріалу, та виробничого біосинтезу. Технологічний процес складається з підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу пектофоетидину. Технологічна та апаратурна схеми, за якою складено даний опис, розміщена в графічній частині кваліфікаційної роботи.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрязабірник на висоті 20 м. Така висота обумовлена тим фактом, що кількість пилових часток і біологічних агентів є дуже низькою.

ДР 1.2. Груба очистка повітря

Обов'язковим кроком є очищення повітря від пилу та механічних часток. Таку операцію здійснюють у фільтрі, з затримуючою здатністю 90%.

ДР 1.3.Компресування повітря

Повітря стискають в компресорі, до тиску близько 0,4 МПа. При цьому передбачається підвищенням температури повітря, тому наступним кроком ми маємо його охолодити.

ДР 1.4. Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості

Для мінімізації контамінації, повітря різко охолоджують до 18 °С у теплообміннику. Потім одержана волога зріджується в ресивері, таким чином кінцева вологість становить близько 60 %.

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми пектофоетидину	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Однорог І.М.					61	9
Перевір.		Карлаш Ю.В.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

ДР 1.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охолоджене повітря у теплообміннику нагрівають до температури 30 °С.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Нагріте повітря пускають через головний фільтр. Ступінь очищення повітря збільшується до $E = 95 \%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед інокуляторами та ферментером встановлюють індивідуальні фільтри, ступінь очищення яких становить $E = 99,995 \%$.

ДР 2. Підготовка титрувальних агентів

ДР 2.1. Підготовка 6-% розчину гідроксиду натрію

На технічних вагах зважують 73,6 г гідроксиду натрію. Наважку переносять в колбу, об'ємом 2 л. За допомогою мірного циліндру наливають 1 226 мл води питної. Суміш ретельно перемішують. Після гомогенізації, колбу закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію в автоклав. Режим процесу становить 131 °С, 40 хв при 0,15 МПа.

ДР 2.2. Підготовка 6-% розчину соляної кислоти

В стерильну колбу об'ємом 2 л за допомогою стерильного мірного циліндру наливають 1021 мл води дистильованої. Після цього, за допомогою стерильного мірного циліндру доливають 205 мл 36-% соляної кислоти. Суміш ретельно перемішують. Після гомогенізації, колбу закривають скляною кришкою та передають на відповідну стадію.

ДР 2.3. Підготовка 0,05 М розчину соляної кислоти

Для приготування 620 л 0,05 М розчину соляної кислоти в реактор об'ємом 800 л (Р-8) вносять за допомогою лічильника 616,9 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій та вносять 3,1 л відміряної за допомогою мірного циліндра 36 % соляну кислоту. Після гомогенізації перемішуючи пристрій вимикають та зберігають розчин в реактор до використання на подальших етапах.

ДР 3. Приготування пектину з шкірки манго

ДР 3.1. Сушіння шкірки манго

За допомогою технічних ваг зважують 623 кг шкірки манго, яку поступово вручну завантажують на полиці вакуум-сушильної шафи (СШ-10). Розмістивши шкірки манго в шафі, встановлюється температура сушіння – 45 °С, тривалість процесу сушіння становить 24 години. Втрата в масі при висушуванні має становити 70%.

ДР 3.2. Подрібнення висушеної шкірки манго

Висушену шкірку манго (від ДР 3.1) з полиць вручну подають в промисловий подрібнювач (ПМ-11) з продуктивністю 200 кг/г. Процес подрібнювання триватиме 2 год.

ДР 3.3. Обробка подрібненої шкірки манго

Сухий порошок манго вручну відважують в реактор об'ємом 1 м³ (Р-13). За допомогою насоса (Н-9) доливають 620 л 0,05 М розчину соляної кислоти (від ДР 2.3), вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв). В сорочку реактора подають глуху пару та нагрівають до 100 °С розчин витримують при такій температурі протягом 1 години.

ДР 3.4. Видалення осаду

Після екстракції 0,05 М розчином соляної кислоти (від ДР 3.3), розчин за допомогою відцентрового (Н-14) насоса направляють в мембранний фільтр-прес де відбувається видалення біомаси, фільтрат направляють в реактор об'ємом 2 м³ (Р-16).

ДР 3.5. Осадження пектину етанолом

В реактор (Р-16) до фільтрат вносять 1 200 л етанолу. Розмістивши компоненти в реакторі вмикають перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу компонентів та залишають на 72 год в спокої.

ДР 3.6. Відділення пектину

В результаті осадження пектину, розчин (від ДР 3.5), за допомогою відцентрового насоса (Н-17) направляють на мембранний фільтр-прес (МФП-

15), де відбувається виділення осаду. Фільтрат направляють на відновлення для подальшого використання.

ДР 3.7. Сушіння пектину

Отриманий осад (від ДР 3.6) направляють в вакуум-сушильну шафу (СШ-10) де відбувається сушіння пектину при 50 °С впродовж 12 годин. Одержаний порошок надходить на відповідні стадії.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 13,65 г пектину (від ДР 3.7), 2,5 г пептону та 1 г сечовини. Наважки переносять в колбу об'ємом 1 л. До колби доливають 283 мл води питної відміряної за допомогою мірного циліндра. Після внесення компонентів вміст колби ретельно перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію до автоклаву при 112 °С, впродовж 15 хвилин при 0,05 МПа.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1,1 г монофосфату калію. Фосфатну сіль переносять в колбу об'ємом 250 мл. До колби доливають 99 мл води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Після внесення компонентів вміст колби ретельно перемішують та закривають ватно-марлевым корком. Закриту колбу поміщають в автоклав де проводять стерилізацію при 131 °С, впродовж 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,1 г сульфату магнію. Магнієву сіль переносять в колбу об'ємом 250 мл. В колбу доливають 100 мл води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Після внесення компонентів вміст колби ретельно перемішують та закривають ватно-марлевым корком. Закриту колбу поміщають в автоклав де проводять стерилізацію при 131 °С, впродовж 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 151,24 г пектину (від ДР 3.7), 27,7 г пептону та 11,08 г сечовини. Наважки переносять в колбу об'ємом 3 л. До колби доливають 1 810 мл води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Після внесення компонентів вміст колби ретельно перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію до автоклаву при 112 °С, впродовж 15 хвилин при 0,05 МПа.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 12,19 г монофосфату калію. Фосфатну сіль переносять в колбу об'ємом 3 л. До колби доливають 1 828 мл води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Після внесення компонентів вміст колби ретельно перемішують та закривають ватно-марлевым корком. Закриту колбу поміщають в автоклав де проводять стерилізацію при 131 °С, впродовж 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1,11 г сульфату магнію. Магнієву сіль переносять в колбу об'ємом 3 л. В колбу доливають 1,7 л води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Після внесення компонентів вміст колби ретельно перемішують та закривають ватно-марлевым корком. Закриту колбу поміщають в автоклав де проводять стерилізацію при 131 °С, впродовж 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1 580,4 г пектину (від ДР 3.7), 289,45 г пептону та 115,78 г сечовини. Наважки переносять в реактор об'ємом 20 л (Р-20). До реактору за допомогою лічильника вносять 15,1 л води питної. Після внесення компонентів в реакторі вмикають перемішуючий пристрій

(50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів та в подальшому проводять стерилізацію подаючи гостру пару в реактор впродовж 15 хв, при 112 °С, 0,05 МПа.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 127,36 г монофосфату калію та 11,58 г сульфату магнію. Солі поміщають в реактор об'ємом 10 л (Р-21) додають 5,49 л води питної та вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв), для рівномірного розподілу компонентів. В подальшому вміст реактора самоплином подають в посівний апарат об'ємом 100 л (ПА-23), та через лічильник доливають 10 л води питної та вносять 6 % розчин соляної кислоти (від ДР 2.2). В подальшому в посівному апараті проводять стерилізацію за допомогою гострої пари при 131 °С, впродовж 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1 м³

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно вагового дозатора (ДЗ-25) зважують 15 140,6 г пектину (від ДР 3.7), 2 773 г пептону та 1 109,2 г сечовини. Наважки переносять в реактор об'ємом 200 л (Р-26). До реактору за допомогою лічильника вносять 148,4 л води питної. Після внесення компонентів в реакторі вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів та в подальшому проводять стерилізацію подаючи гостру пару в реактор впродовж 15 хв, при 112С °С, 0,05 МПа.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1 220,1 г монофосфату калію та 110,9 г сульфату магнію. Солі поміщають в реактор об'ємом 50 л (Р-24) додають 30,5 л води питної та вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв), для рівномірного розподілу компонентів. В подальшому вміст реактора самоплином подають в посівний апарат об'ємом 1 м³ (ПА-29), та через лічильник доливають 300 л води питної та вносять 6 % розчин соляної кислоти (від ДР 2.2). В подальшому в посівному апараті проводять

стерилізацію за допомогою гострої пари при 131 °С, впродовж 40 хвилин при 0,15 МПа.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для біосинтезу пектофоетидину в ферментері об'ємом 10 м³

ДР 4.5.1. Приготування композиції А

В реактор об'ємом 5 м³ (Р-32) за допомогою об'ємно-вагових дозаторів (ДЗ-30, ДЗ-31) вносять 144,94 кг пектину (від ДР 3.7), 26,55 кг пептону, 10,62 кг сечовини, 11,68 кг монофосфату калію та 1,06 кг сульфату магнію. До компонентів за допомогою лічильника доливають 4 052 л води питної, та вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв). Процес перемішування триває до повного розчинення усіх компонентів.

ДР 4.5.2. Стерилізація композиції А

Одержаний розчин (від ДР 4.5.1) відцентровим насосом (Н-33) направляють в установку безперервної стерилізації (УБС34) де відбувається стерилізація гострою парою при 131 °С, протягом 5 хв при 0,15 МПа.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *A. foetidus* NCIM 514 зберігають на скошеному картопляно-декстрозному агарі при 4°С. Пересів роблять кожні 1-3 місяці. Всі роботи з культурою виконують в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з PDA, розсівають петлею на чашки Петрі із поживним агаром і вирощують при температурі 30 °С упродовж 48 год.

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках

Отримані ізольовані колонії (від ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним PDA (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). Тривалість вирощування – 48 год. Засіяні пробірки ставлять у термостат з температурою 30 °С. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу об'ємом 1 л з стерильною композицією А (від ДР 4.1.1.) в асептичних умовах вносять композиції Б та В (від ДР 4.1.2 та від ДР 4.1.3). Перемішують і розливають по 125 мл в 4 стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *A. foetidus* NCIM 514, вирощеною на PDA, вносять 10 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), стерильною піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують клітинну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування клітин здійснюється у колбах на качалках. Умови культивування наступні: температура – 30 °С, частота обертання – 200 об/хв, час вирощування – 48 год. Культура вирощується в шейкерному термостаті. Після вирощування культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

До простерилізованого охолодженого інокулятора на 10 л в асептичних умовах через засівну колбу вносять стерильну композицію А (від ДР 4.2.1), Б (від ДР 4.2.2) та В (від ДР 4.2.3). Об'єднавши композиції в реактор в строго асептичних умов вносять посівний матеріал (від ТП 5.4).

Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 48 год, рН=5,0. Під час культивування в інокулятор через барботер подається стерильне повітря.

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л

В посівний апарат об'ємом 100 л (ПА-23) з стерильною композицією Б (від ДР 4.3.2), самоплином вносять стерильну композицію А (від ДР 4.3.1) та

6 % розчин гідроксиду натрію (від ДР 2.1) Об'єднавши композиції за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 5.5)

Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 48 год, рН=5,0. Під час культивування в посівний апарат через барботер подається стерильне повітря.

ТП 5.7. Вирощування посівного матеріалу в посівного апарату об'ємом 1 м³

В посівний апарат об'ємом 1 м³ (ПА-29) з стерильною композицією Б (від ДР 4.4.2), за допомогою перистальтичного насоса (Н-27) вносять стерильну композицію А (від ДР 4.4.1) та 6 % розчин гідроксиду натрію (від ДР 2.1). Об'єднавши композиції за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 5.6).

Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 48 год, рН=5,0. Під час культивування в посівний апарат через барботер подається стерильне повітря.

ТП 6. Виробничий біосинтез пектофоетидину

ТП 6.1. Виробничий біосинтез в ферментері об'ємом 10 м³

В ферментер об'ємом 10 м³ (Фр-36) поступово надходить стерильне поживне середовище з установки безперервної стерилізації. Після стерилізації усього розчину в ферментер за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 5.7).

Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 30 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 72 год, рН = 5,0. Під час культивування в ферментер через барботер подається стерильне повітря.

Культивування ведуть до досягнення активності ферменту в 36,5Од/мл. Отриману культуральну рідину передають далі насосом (Н-37) на отримання цільового продукту.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПЕКТОФОЕТИДИНУ

8.1. Мікробіологічний контроль

Біосинтез полігалактуринози шляхом культивування *A. foetidus* NCIM 514 передбачає мікробіологічний контроль стерильності середовища, а також відсутність сторонньої мікробіоти у посівному матеріалі. Зазвичай ці методики передбачають висів на агаризовані середовища, а також мікроскопіювання.

8.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Перевірка стерильності поживного середовища виконують шляхом термостатування зразка (по 5 мл на пробірку, їх може бути декілька) кожної серії живильного середовища після його стерилізації протягом 5-ти діб при 30-35°C (якщо середовище використовується для виявлення бактерій) і 20-25°C (якщо середовище використовується для виявлення грибів). Після закінчення заданого терміну на (в) поживних середовищах повинні відсутні візуально визначаються ознаки зростання мікроорганізмів [36]. Також, зразки поживного середовища додатково можна висівати на агаризовані поживні середовища. М'ясо-пептонний агар використовують для визначення бактерій, а перевірку на мікробіологічне забруднення грибами та дріжджами виконують висівом на сусло-агар (СА), для цього на середовища за допомогою мірної піпетки вносять 0,1 мл досліджуваного зразку та розтирають шпателем Дригальського. Чашки ставлять у термостати на 30-35°C для бактерій та на 20-25°C для грибів та дріжджів [86].

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва пектофоетидину	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Однорог І.М.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					70	10
Реценз.						Кафедра БТМ ⁷		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Дані методики точно дають можливість визначити стерильність середовища, проте на виробництві зазвичай використовують метод прямого мікроскопіювання. Для цього, можна використати камеру Перфільєва, оскільки він дає виконати визначення на збільшенні 40х та 90х, що охоплює як гриби з дріжджами, так і бактерії. Під час занурення капіляра в зразок він заповнюється в силу своїх капілярних властивостей. Потім капіляр поміщають на предметне скло, заливають кінець розплавленим парафіном і підраховують клітини [86].

При відсутності клітин в капілярах – середовище вважається стерильним.

8.1.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

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

Посівний матеріал або культуральну рідину висівають на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем методом виснажувального штриха. Він передбачає поділ чашки на 3-4-зони. За допомогою мікробіологічної петлі, яку попередньо занурюють в дослідний зразок, проводять перший штрих в першій зоні. Після цього, петлю прокалюють в пальнику та, торкаючись кінця першого штриху, виводять наступний штрих в наступну зону. Дія повторюється в залежності від кількості зон. Після чого, чашки ставлять в термостат на 25 °C на декілька діб до появи колоній [86].

Для ідентифікації грибів *A. foetidus* NCIM 514 можна використовувати агар Сабуро з глюкозою [87, 88]. Приклад його росту на цьому щільному поживному середовищі зображено на рис. 8.1.

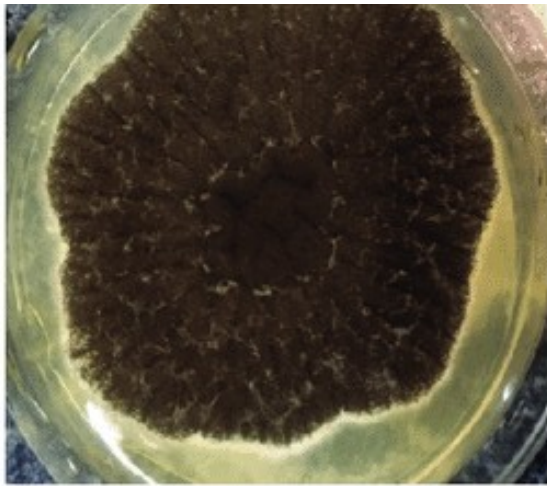


Рис. 8.1. Колонії *A. foetidus* на SMY агарі [88]

Колонії *A. foetidus* на агаризованому середовищі Сабуро з глюкозою мають формувати темно-коричневі або чорні колонії з повітряним міцелієм. При цьому, якщо перевернути чашку Петрі, внизу ці колонії мають жовтий колір.

Мікроскопіювання проводять світловим мікроскопом. Методика мікроскопіювання [86]:

Для мікроскопічного аналізу грибу *A. foetidus* потрібно приготувати препарат роздавлена крапля. Краплю суміші спирту із гліцерином (1:1) наносять у центр предметного скла. Після цього, мікробіологічною голкою відбирають невеличку кількість міцелію. Цей зросток намагаються обережно розподілити по всій товщі краплі водно-гліцеринової суміші. За потреби, використовують другу голку. Після рівномірного нанесення, препарат накривають покривним склом, намагаючись уникнути пухирців повітря. Для цього, покривне скло опускають ребром біля краю краплі. Мікроскопію грибів проводять при збільшенні в x40 [86].

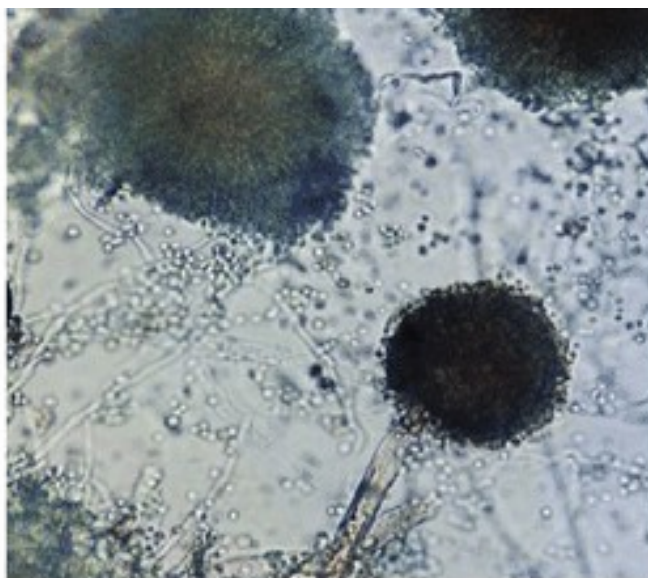


Рис. 8.2. Конідії, які утворює *A. Foetidus* (збільшення 40х)[38]

Міцелій складається з септованих розгалужених гіф. Конідіальні головки, як правило, стовпчасті (до 400 x 50 мкм, але часто набагато коротші та менші) і однорядні [89]. В полі зору мікроскопу мають проглядатися лише грибні клітини, що свідчить про чистоту культури.

8.2. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

Основним джерелом карбону виступає пектин, а основним джерелом азоту – пептон (амінний) та сечовина (амонійний). Для визначення цих речовин потрібно відділити супернатант. Центрифугування біомаси від супернатанту відбувається при 11000 об/хв протягом 10 хв [90].

8.2.1. Визначення концентрації джерела вуглецю

Концентрацію пектину можна визначити спектрофотометрично. Для цього, одержують супернатант, за допомогою центрифугування 10 мл зразка, як вказано вище. Відміряють 12,0 мл концентрованої сірчаної кислоти в 50 мл культуральну пробірку. Пробірку охолоджують на крижаній бані та додають 2-мл аліквоту досліджуваного зразку. Вміст ретельно перемішують. Пробірку охолоджують на крижаній бані до температури нижче 5°C. Після цього, пробірку нагрівають протягом 10 хвилин на киплячій водяній бані. Потім, пробірку охолоджують приблизно до 20°C, додають 1,0 мл 0,15% карбазольного реагенту, ретельно перемішують та

дати постояти при кімнатній температурі протягом 25 ± 5 хвилин. Визначають інтенсивність кольору за допомогою світла з довжиною хвилі 520 нм. Для перерахунку використовують стандартну криву. Відтворюваність даного методу знаходиться в межах приблизно 2%. Аналіз дозволяє визначити до 10 ммоль/л пектину, що відб=повідає адсорбції 0,8. При завищених значеннях аналіз варто переробити із розбавленням зразку щонайменше в 10 раз [4, 91].

Для даного визначення вистачить спектрофотометру UNICO 2800 SpectroQuest. Його зображення показано на рис.8.3.



Рис.8.3. Спектрофотометр UNICO 2800 SpectroQuest [92]

Однопроменевий спектрофотометр UV-2800 працює в спектральному діапазоні 190-1100 нм. Ця модель має спектральну щілину 4 нм і швидкість сканування до 1000 нм/хв. Прилад відрізняє високу точність визначення пропускання/оптичної щільності, установки довжини хвилі, дозвіл 0,1 нм. Повторюваність установки довжини хвилі $\pm 0,5$ нм [92].

8.2.2. Визначення концентрації джерела азоту

Концентрацію амонійного азоту, яка представлена сечовиною в культуральній рідині, визначають за допомогою реактиву Несслера [93].

Суть колориметричного методу визначення амонійного азоту зреагентом Несслера полягає в тому, що у лужному середовищі аміак реагує з йодомеркуріатом калію, утворюючи осад жовто-коричневого кольору. Занизької концентрації аміаку утворюється колоїдний розчин, придатний для колориметричного визначення [93].

До 5 мл зразку, доведеного до 50 мл бідистилятом, додають 1 – 2 краплі розчину сегнетової солі, і суміш ретельно перемішують. Після цього додають 1 мл реактиву Несслера і знову перемішують. Через 10 хв суміш колориметрують або порівнюють з серією стандартів, приготовлених у циліндрах Несслера. Забарвлення суміші не повинно змінюватись протягом 30 хв. Із значення оптичної густини вираховують значення оптичної густини холостого досліду на довжині хвилі 400 – 425 нм. За калібрувальним графіком знаходять вміст аміаку [93].

Вміст амонійного азоту у міліграмах на літр розраховують за такою формулою [93]:

$$AA = \frac{C \cdot 50}{V};$$

де С – знайдена концентрація NH_4^+ , мг/л; V – об'єм проби, взятої для аналізу, мл; 18,04 – еквівалент NH_4^+ ; 50 – об'єм проби, мл.

Для цього визначення також можна використати спектрофотометр UNICO 2800 SpectroQuest, що зазначений вище.

Визначення амінного азоту мідним способом ґрунтується на здатності амінокислот і різних пептидів утворювати комплексні розчинні сполуки з міддю, яку потім визначають йодометрично. Суть даного методу полягає у тому, що до визначеної кількості досліджуваного розчину, який містить суміш амінокислот і пептидів, приливають при слаболужній реакції надлишок суспензії суспензії фосфорнокислої міді у боратному буфері, в результаті чого після збовтування у розчин переходять мідні солі більшості амінокислот. Потім надлишок фосфату міді відфільтровують і до прозорого розчину додають оцтову кислоту і йодистий калій [94].

Йод, що виділився, відтитровують слабким розчином гіпосульфіту. Кожен мілілітр 0,01 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ відповідає 0,28 мг амінного азоту. 1–2 мл розчину, наливають у мірну колбу на 25 мл і додають одну–дві краплі тимолфталейну і по краплях 1 н. розчин NaOH до блідо-синього забарвлення.

Після цього у колбу додають 10–15 мл суспензії ортофосфату міді у боратному буфері, потім доводять вміст колби до мітки дистильованою водою. Добре збовтують і фільтрують через складчастий фільтр з малопористого фільтрувального паперу або центрифугують. Фільтрат повинен бути зовсім прозорий, бо за наявності частинок осаду завищується кінцевий результат. 5–10 мл фільтрату відбирають у конічну колбу або у фарфорову чашку, додають 0,25–0,5 мл 80 % оцтової кислоти, 0,2–0,4 г KI. Йод, що виділився, відтитровують 0,01 н. розчином тіосульфату натрію $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, додаючи в кінці титрування одну–чотири краплі крохмалю до зникнення синього забарвлення. Паралельно проводять контрольний дослід, де замість досліджуваного розчину беруть дистильовану воду. Формула розрахунку [94]:

$$X = \frac{(a - b) \cdot 0,28}{n},$$

де X – вміст амонійного азоту, мг/л; a – кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування дослідного зразка, мл; b – кількість 0,01 н. розчину тіосульфату натрію, витрачена на титрування контролю, мл; n – кількість досліджуваного розчину, яку взята для аналізу, мл [94].

8.3. Визначення показників біосинтезу

8.3.1. Визначення концентрації біомаси

Визначають ваговим методом. Міцелій грибів відокремлюють фільтруванням. Паперовий фільтр поміщають у скляну лійку й фільтрують через нього точно виміряний обсяг культури, від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою. Перед цим, фільтри висушують до абсолютно сухої маси. Після фільтрування, фільтри сушать в сушильній шафі при 105 °C до абсолютно сухої біомаси. Після чого, вагу початкового фільтру віднімають від ваги фільтру з висушеною біомасою та роблять перерахунок на г/л з врахуванням відфільтрованого об'єму [95].

8.3.2. Визначення концентрації ферменту

Фермент виділяється в супернатант. Його можна визначити методом Лоурі. Метод ґрунтується на реакції білків з реактивом Фоліна, яка дає синє забарвлення.

До 0,4 мл супернатанту додають 2 мл реакційної суміші (50 мл 2%-ого розчину Na_2CO_3 в 0,1 н. розчині NaOH + 0,3%-ого розчину $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-му розчині двозаміщеного виннокислого натрію або калію). Суміш перемішують і через 10 хв. приливають до неї 0,2 мл робочого розчину Фоліна. Інтенсивність забарвлення визначають на спектрофотометрі з довжиною хвилі 750 нм через 30 хв. Кількість білка знаходять за калібрувальною кривою[44]. Дане визначення також можна зробити на спектрофотометрі UNICO 2800 SpectroQuest.

8.3.3. Визначення активності ферменту

Для цього аналізу попередньо одержується супернатант, шляхом центрифугування 1 мл культуральної рідини, як це було описано вище. В реакційну суміш, що містить 0,3 мл супернатанту, додавали до 1 мл 1 % пектинового субстрату та 0,7 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH=4,5). Зразки інкубували при 40 °C протягом 30 хв. Відновлюючі цукри визначають за допомогою методу динітросаліцилової кислоти з галактурановою кислотою в якості стандарту. Одну одиницю активності PG (U) визначають як кількість ферменту, що вивільняє 1 ммоль галактуранової кислоти за хвилину на грам субстрату [4].

Для визначення відновлюючих цукрів спочатку готують калібрувальний графік. Відбирають стандартний розчин галактуранової кислоти в діапазоні від 0 до 3 мл у різні пробірки та доводять об'єм усіх пробірок до 3 мл концентрацією дистильованої води від 0 до 750 мг. Додають 1 мл динітросаліцилової кислоти в усі пробірки, перемішують і тримають пробірку на киплячій водяній бані протягом 5 хвилин. Після цього, пробірки мають охолонути до кімнатної температури. На спектрофотометрі визначають екстинкцію на 540 нм проти дистильованої води. Теж саме

відбувається з зразком для визначення активності. Його доводять до 3 мл, а потім повторюють тіж самі дії, що й зі стандартом [96].

Визначення можна виконати за допомогою UNICO 2800 SpectroQuest.

8.4. Ідентифікація пектофоетидину

Визначення активності пектофоетидину за допомогою спектрофотометричного методу

Пектофоетидин — фермент, що розщеплює пектин, який міститься у клітинних стінках рослин. Одиниця активності пектофоетидину визначається за кількістю розщепленого пектину та вивільнених галактуранових сполук, які можуть бути виміряні спектрофотометрично. Цей метод передбачає аналіз оптичної щільності, яка корелює з концентрацією цільового продукту в розчині.

Метод підготовки розчину та проведення аналізу

Для початку необроблений розчин пектофоетидину розводять у співвідношенні 1:10. Для забезпечення оптимальної активності ферменту до розчину додається буфер ацетату натрію, що містить 2 мМ CaCl_2 , який активує фермент. Також додається розчин пектину (по 0,5 мл). Суміш інкубують у водяній бані при температурі 40°C протягом 45 хвилин. Цей час дозволяє ферменту розщепити пектин, вивільняючи галактуранові сполуки [86].

Після завершення інкубації реакцію зупиняють, додаючи трихлороцтову кислоту. Це необхідно для того, щоб зафіксувати результати реакції та зупинити подальше розщеплення. Потім 0,5 мл отриманої суміші змішують із 4 мл ацетону в пропорції 2:1:1, додають 10 мМ лібдату амонію, 5N сірчаної кислоти, і 0,4 мл 1М лимонної кислоти. Взаємодія цих речовин призводить до утворення кольорового комплексу, який можна виміряти за допомогою спектрофотометрії.

Спектрофотометрія та інтерпретація результатів

Спектрофотометрія — це метод вимірювання оптичної щільності, або поглинання світла, що проходить через розчин. У випадку пектофоетидину,

зміщення максимуму поглинання відбувається з 465 нм до 595 нм у присутності фарбуючого барвника. Моніторинг цього зсуву при 595 нм дозволяє оцінити кількість цільового продукту у розчині. Оптична щільність вимірюється і порівнюється з градувальним графіком, який відображає залежність між оптичною щільністю та концентрацією галактуранових сполук, визначених в мкмоль/см³.

Переваги та обмеження методу

Цей спектрофотометричний метод є швидким і відтворюваним. Процес зв'язування барвника завершується приблизно за 2 хвилини, і стабільність кольору зберігається протягом 1 години. Метод не має значних втручань від інших катіонів, таких як натрій чи калій, або вуглеводів, таких як сахароза, що забезпечує точність і надійність аналізу.

Таким чином, цей метод дозволяє оцінити активність пектофетидину в кінцевому продукті з високою точністю та ефективністю, забезпечуючи важливу інформацію для подальших біотехнологічних процесів або контролю якості готового продукту [97].

РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА ПЕКТОФОЕТИДИНУ

Технологія одержання ферментних препаратів, таких як Пектофоетидин, зазвичай включає кілька етапів і процесів. Основні кроки технології виробництва Пектофоетидину можна описати наступним чином:

Вибір та культивування мікроорганізмів: Початково потрібно вибрати відповідний штам *Aspergillus foetidus*, який містить необхідні ферменти для виробництва Пектофоетидину. Після цього мікроорганізми культивуються в спеціальних умовах, забезпечуючи їхній ріст та розвиток.

Ферментація: Коли мікроорганізми досягають оптимального рівня концентрації та активності, проводиться ферментація. Цей процес відбувається у спеціальних біореакторах або бактеріальних культиваторах, де забезпечуються оптимальні умови для росту та функціонування мікроорганізмів.

Екстракція ферментів: Після завершення ферментації рідинна культура мікроорганізмів піддається екстракції, щоб виділити ферментні компоненти. Цей процес може включати фільтрацію, осадження, центрифугування та інші методи очищення та концентрування.

Формулювання та стабілізація: Отримані ферментні компоненти зазвичай піддаються додатковим обробкам для забезпечення їх стабільності та зручності використання. Це може включати додавання стабілізуючих речовин, регулювання рН, дезактивацію неконтрольованих ферментів та інші кроки.

Тестування та контроль якості: На завершальному етапі виробництва проводяться тестування для визначення активності та якості отриманих ферментних препаратів. Це допомагає гарантувати відповідність продукту встановленим стандартам якості та безпеки.

					НУХТ БТЕК 04.02.43 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва пектофоетидину	Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Однорог І.М.							
Перевір.		Карлаш Ю.В.					80	9	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							

Розглянувши дані етапи можна зазначити що місцем емісії рідких відходів є етап приготування титрувальних розчинів, відділення біомаси, санітарна підготовка виробництва. Місцем емісії газоподібних відходів є: одержання посівного матеріалу, виробничий біосинтез.

9.1. Системи знешкодження рідких відходів

На території біотехнологічного виробництва формуються три основні види стічних вод: побутові, виробничі та атмосферні. Побутові стічні води включають в себе відходи від санітарно-гігієнічних установок та побутові відходи персоналу. Виробничі стічні води включають рідинні відходи, що виникають в результаті технологічних процесів, такі як водні розчини хімічних реагентів, витяжки з біореакторів та інші рідкі відходи, які містять органічні та неорганічні забруднення. Атмосферні відходи включають газоподібні речовини, що виділяються під час процесів ферментації та інших технологічних процесів.

Зокрема, у біотехнологічному виробництві для миття та дезінфекції обладнання використовують мийно-дезінфікуючі засоби. Згідно з вимогами технологічного процесу та специфікацією обладнання, для приготування робочих розчинів зазвичай використовують мобільні циркуляційні СІР-мийки. Для цього розрахунку робочих розчинів відповідно до об'єму ємкісного обладнання, як-от реактори-збірники, інокулятори та ферментери, рекомендується використовувати 20-30% від їхнього об'єму. Такий підхід дозволяє забезпечити ефективну мийку та дезінфекцію обладнання, знижуючи ризик забруднення та зберігаючи високий стандарт гігієни виробничих приміщень.

$$V_{\text{емностей}} = V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} +$$

$$V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{ферментер}} =$$

$$6,09 + 10 + 63,68 + 100 + 610 + 1000 + 5840 + 10000 = 17629,77 \text{ л}$$

Тоді об'єм мийно-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = 17629,77 \cdot 0,2 = 3525,954 \text{ (3526) л}$$

$$V_{\text{засобів}} = 17629,77 \cdot 0,3 = 5288,931 \text{ (5289) л}$$

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 3526- 5289 л.

Відпрацьована вода після ополіскування обладнання. Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання. Як і розраховано вище, цей параметр дорівнює 3526- 5289л. Таким чином, в сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: $5289+5289= 10578$ л.

Орієнтовний об'єм стічних вод на 1 м^3 кінцевого продукту становить .

Відповідно до розрахунків за один цикл отримуємо 5840 л культуральної рідини, з концентрацією кінцевого продукту 36,5 ОД/мл (0,0365 ОД/л)

Тобто для подальших розрахунків необхідно розрахувати залишки що будуть слугувати твердими відходами.

$$\text{Тобто } 5840 \cdot 0,0365 = 213,16 \text{ ОД/кг}$$

Так як основна частина культуральної рідини є вода, то $5840-213,16= 5626,84$ л

Таким чином, за один виробничий цикл отримуємо 213,16 ОД/кг кінцевого продукту та 5626,84 л води

Тоді на 1 т готової продукції, утворюється:

$$(1000 \cdot 5626,84) / 213,16 = 26397,26 \text{ л стічних вод [57-60].}$$

Визначаємо середні витрати стічних вод від пиробничого підприємства. Для розрахунку виробничих стічних вод візьмемо до уваги данні з ТЕО – потужність виробництва становить $5,84 \text{ м}^3$, кількість циклів культивування за 10 днів.

Кількість трудоднів прийнято за 10, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = 5,84/10=0,584 \text{ м}^3$$

$$\text{Тоді, } Q_e = q_e \cdot n;$$

де q_e - норма водовідведення в л на одиницю продукції, яку випускає підприємство (орієнтовно можна прийняти відповідно до пройденої практики

тобто 50-100 л); n - кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу).

$$Q_e = 50 \cdot 584 \approx 29\,200 \text{ л/доба.}$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = q_n \cdot N = 25 \cdot 5 = 125 \text{ л/зміну,}$$

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л/зм на одного робітника (приймаємо для холодного цеху $0,025 \text{ м}^3/\text{зм люд}$); N – кількість робітників, що працюють у зміні, приймаємо 5:

1. Технолог цеху (біотехнолог): ця особа буде відповідати за процес культивування, збір та очищення біомаси з ферментера.
2. Мікробіолог ВКЯ (відповідальний за контроль якості): відповідає за контроль якості на різних етапах виробництва та забезпечує виконання стандартів GMP і вимог затверджених регулюючими органами.
3. Технік з обслуговування та ремонту обладнання: ця особа буде відповідати за обслуговування та ремонт обладнання в разі необхідності.
4. Керівник зміни: ця особа буде відповідати за керування роботою всіх працівників на зміні та вирішення питань, пов'язаних з виробництвом біомаси бактерій.
5. Санітарний робітник: цей працівник забезпечує дотримання правил санітарної гігієни та чистоти в цеху. Він займається підготовкою приміщень, дезінфікує обладнання та поверхні, контролює виконання правил особистої гігієни працівників, дотримання ними правил переодягання та захисту від шкідливих впливів, що забезпечує безпеку продукту та працівників [62].

Саме таку кількість робітників ми приймаємо, бо відповідно до вимог GMP варто мінімізувати кількість робітників на зміні, адже персонал це головне потенційне джерело контамінації. Також, якщо правильно провести процес оптимізації виробництва, то зменшення кількості робітників може допомогти знизити рівень помилок та підвищити рівень якості продукції.

Середні за добу витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = Q_n \cdot N_{зм} = 125 \cdot 3 = 375 \text{ л/добу},$$

де $N_{зм}$ – кількість змін на добу ($N_{зм} = 4$).

Загальна за добу витрата атмосферних стічних вод становлять:

$$Q_a = Q_n/15 = 375/15 = 25 \text{ л/добу}.$$

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві, становлять:

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 29200 + 375 + 25 = 29600 \text{ л/добу}.$$

Зважаючи на отримані данні пропонується використовувати систему фільтрації Aquasana Rhino EQ-3. Дана система має приблизну продуктивність 30 000 л на добу, що підходить під потреби виробництва якщо буде встановлено 6 таких одиниць. Також, Aquasana Rhino здійснює запатентовану 4х ступеневу систему очистки води:

1-й ступінь: фільтрація будь-якого осаду, що може бути у водопроводі. Коли цей осад видалено, він не може засмітити головний фільтр, таким чином збільшуючи термін служби фільтра [98].

2-й ступінь: гранули цинку та міді створюють окисно-відновний потенціал, що змінює молекулярну структуру хлору та перетворює його на нешкідливий хлорид. Враховуючи, що для дезінфекції виробництва ми будемо використовувати засоби, що містять хлор в складі (хлорамін-Б, новохлор екстра), дана система очищення доволі актуальна.

3-й та 4-й ступінь: гранули активованого вугілля різного розміру. Вугільні фільтри використовуються для видалення органічних забруднень, таких як хлор, бензол та інші хімічні речовини. Також, допомагають відфільтрувати бактеріальні клітини. Активне вугілля є ефективним поглиначем запахів, хімічних та органічних забруднень, що дозволяє очищувати стічні води від цих речовин. Після відпрацювання терміну служб, фільтри з активним вугіллям можуть бути використані повторно. Активне вугілля після регенерації знову набуває своїх фільтраційних властивостей.

Данна фільтраційна система забезпечує очистку води від бактерій, хімічних речовин, запахів та інших забруднень. Також, додатковою

перевагою Aquasana Rhino EQ-3 є його компактні розміри. Це дозволяє встановити фільтраційну систему в будь-якому місці, щоб забезпечити максимальну ефективність очищення стічних вод [98].

Також, до рідких відходів підприємства можна віднести супернатант, отриманий під час виділення біомаси бактерій центрифугуванням.

Супернатант, отриманий з *Aspergillus foetidus*, може бути використаний як цінний ресурс як для промислових, так і для сільськогосподарських потреб.

У промисловості супернатант може знайти застосування у виробництві біологічно активних добавок, ферментних препаратів, біогазу та інших біопродуктів. Оскільки *A. foetidus* виробляє різноманітні ферменти, такі як ліпази, амілази та протеази, супернатант може бути використаний як джерело цих ферментів для різних процесів у промисловості, наприклад, у виробництві харчових продуктів, медичинських препаратів або детергентів.

У сільському господарстві супернатант може бути використаний як добриво, біостимулятор для рослин, а також джерело цінних мікроорганізмів для підтримки родючості ґрунту та захисту від патогенних мікроорганізмів. Крім того, пробіотичні властивості *A. foetidus* можуть підтримувати здоров'я та імунітет тварин, що є важливим аспектом у сільському господарстві, зокрема в тваринництві.

Отже, супернатант з *A. foetidus* може мати широкий спектр застосувань як у промисловості, так і в сільському господарстві, сприяючи покращенню виробничих процесів та підтримці екологічності у виробництві [5].

9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів

У процесу культивування утворюються такі газоподібні відходи, як відпрацьований азот, що містить аерозоль клітин продуцента, а також вуглекислий газ. Для очищення газоподібних відходів пропонується встановити фільтри класу F9 Multiglas, через системи витяжної вентиляції на виході відпрацьованих газоподібних викидів в атмосферне повітря. З даною

системою очищення відпрацьованого повітря було ознайомлено під час проходження практика Фільтри F9 Multiglas належать до фільтрів тонкої очистки повітря та допомагають вловлювати мікробні часточки та пил. Ці фільтри мають високу стійкість до вологості та температурних змін, це дозволяє їх використовувати в різноманітних умовах та подовжує термін їх експлуатації. Фільтри також легко монтувати та замінювати, що забезпечує зручність в обслуговуванні [99].

Утворення газоподібних відходів, що містять аерозоль клітин у вигляді відпрацьованого повітря після аерації культуральної рідини на стадіях:

- отримання посівного матеріалу в інокуляторі 10, 100 л
- отримання посівного матеріалу в посівному апараті 1 м³
- отримання посівного матеріалу в ферментері 10 м³

Розрахуємо об'єм відпрацьованого повітря, знаючи, що він приблизно дорівнює об'ємам аераційного повітря

1. В інокуляторі 10 та 100л, робочий об'єм $6,09+66,68= 72,77$ л, отже аераційного повітря потрібно 21 л/хв, тобто $21* 72,77 = 1528,17$ л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 48 год, для цього необхідно $48*1528,17 = 73352,16$ л аераційного повітря на виробничий цикл.
2. В посівному апараті 1000 л, робочий об'єм 610 л, отже аераційного повітря потрібно 251 л/хв, тобто $251*610 = 153110$ л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 48 год, для цього необхідно $48* 153110= 7\,349\,280$ л/цикл аераційного повітря на виробничий цикл.
3. В ферментері 10 000 л, робочий об'єм 5840 л, отже аераційного повітря потрібно 251 л/год, тобто $251 *5840 = 1465840$ л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 72 год, для цього необхідно $72*1465840 = 105\,540\,480$ л/цикл аераційного повітря на виробничий цикл.

9.3. Системи знешкодження твердих відходів

Оскільки фермент біологічного агенту є цільовим продуктом виробництва, то тверді відходи представленні пакувальною тарою, та

залишками, що утворюються стадіях подрібнення та просіювання. Для утилізації пакувальної тари будемо використовувати попереднє сортування відходів з метою повної або часткової переробка з подальшим використанням, це найбільш економічний та зручний метод утилізації.

Підприємство, яке отримує ферменти з використанням мікроорганізмів, генерує різноманітні тверді відходи, які вимагають належної обробки та утилізації для збереження навколишнього середовища та дотримання екологічних стандартів. Розглянемо більш детально тверді відходи, що виникають на підприємстві під час процесу виробництва ферментів:

Бруд на фільтрах:

Під час ферментації та виробництва ферментів можуть утворюватися відпрацьовані фільтри, які містять залишки мікроорганізмів та інших забруднень.

Використані фільтри піддаються обробці в автоклаві знешкодження біологічних відходів для дезінфекції та нейтралізації будь-яких залишкових живих організмів.

Непридатні хімічні реактиви:

В процесі виробництва можуть залишатися непридатні хімічні реактиви, такі як використані культуральні середовища, реактиви для підготовки робочих розчинів тощо.

Ці реактиви слід зберігати в окремій шафі, позначеній як "небезпечні відходи", а потім передавати на утилізацію спеціалізованим організаціям.

Пакувальні матеріали:

Пакувальні матеріали, такі як пластикові пляшки, пакети, паперові коробки тощо, також можуть становити значну частину твердих відходів.

Їхнє правильне збирання та сортування в окремі контейнери з кришками сприяє подальшій переробці та вторинному використанню.

Скло:

Використане скло, яке може включати в себе пляшки від реактивів або інші контейнери, слід також відокремлювати та передавати на переробку до пунктів вторсировини.

З урахуванням різноманітності твердих відходів, необхідно впроваджувати систематичну та ефективну політику управління відходами на підприємстві. Це включає збирання, сортування, тимчасове зберігання та відправку на подальшу переробку чи утилізацію. Такий підхід допоможе зменшити негативний вплив виробництва на довкілля та забезпечить дотримання вимог екологічних стандартів [100].

ЛІТЕРАТУРА

1. Garg G., Singh A., Kaur A., Singh R., Kaur J., Mahajan R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech.* 2016, 6: 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>.
2. Mitrea L., Calinoiu L. F., Teleky B. E., Szabo K., Martău A. G., Nemes S. A., et al. Fruit and vegetable wastes for biobased chemicals. In *Fruit and Vegetable Waste Utilization and Sustainability Academic Press*. 2023. P. 43-76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91743-8.00015-0>.
3. Eck P. Recombinant DNA technologies in food. *Biochemistry of Foods*. 2013: 503-556. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091809-9.00013-3>.
4. Yannam S. K., Shetty P. R., Obulum V. S. R. Optimization, purification and characterization of polygalacturonase from mango peel waste produced by *Aspergillus foetidus*. *Food Technology and Biotechnology*. 2014, 52(3): 359-367.
5. Біологія продуктивності сільськогосподарських тварин: навчальний посібник/ Р. Л. Сусол, А. П. Китаєва, І. Б. Баньковська, О. М. Церенюк, Н. О. Кірович, Т. Д. Пушкар, С. Ю. Косенко, В. М. Ясько, О. О. Гусятинська, Л. О. Сусол, В. О. Рудь, І. Є. Ткаченко, К. О. Хамід, О. О. Безалтична. – Одеса, 2019. – 288 с.
6. Cheng Z., Chen D., Wang Q., Xian L., Lu B., Wei Y., et al. Identification of an acidic endo-polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028 and its broad use in major tropical and subtropical fruit juices production. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2017, 123(6): 665-672. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.01.013>
7. Munir M., Abdullah R., Haq I. U., Kaleem A., Iqtedar M., Ashraf S. Purification, characterization, kinetics and thermodynamic analysis of polygalacturonase from *Aspergillus tamaris* for industrial applications. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2020, 19(Sup. 1): 293-304. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1601>
8. Fratebianchi D., Cavello I. A., Cavalitto S. F. Purification and biochemical and kinetic properties of an endo-polygalacturonase from the

industrial fungus *Aspergillus sojae*. *Microbial Physiology*. 2017, 27(2): 102-109.
<https://doi.org/10.1159/000460296>

9. Martos M. A., Butiuk A. P., Rojas N. L., Hours R. A. Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Wickerhamomyces anomalus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014, 57: 587-594.
<https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402214>

10. Jalil M. T. M., Zakaria N. A., Aris F., Ibrahim D. Assessment of Cultivation Parameters Influencing Polygalacturonase Production by *Aspergillus* sp. SO5 in Submerged Fermentation. *Trends in Sciences*. 2023, 20(3): 4191-4191.
<https://doi.org/10.48048/tis.2023.4191>

11. Anuradha K., Padma P. N., Venkateshwar S., Reddy G. Effect of physical factors on pellet morphology of *Aspergillus awamori* MTCC 9166 and polygalacturonase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014, 3(4): 271-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.07.007>

12. Banerjee J., Vijayaraghavan R., Arora A., MacFarlane D. R., Patti A. F. Lemon juice based extraction of pectin from mango peels: waste to wealth by sustainable approaches. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2011, 4(11): 5915-5920.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01342>

13. Манго (~0,6 кг/шт.) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://fruit-time.ua/product/mango-06-kgst-imp.html>

14. Rodríguez Pleguezuelo C. R., Durán Zuazo V. H., Muriel Fernández J. L., Franco Tarifa D. Physico-chemical quality parameters of mango (*Mangifera indica* L.) fruits grown in a Mediterranean subtropical climate (SE Spain). *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2012, 14(2): 365-374.

15. Murtaza A., Irshad M., Asgher M., Naveed M., Anwar Z., Zubair M., Ali A. Computational analysis and applications of pectinolytic enzymes optimized by statistical design using *Shizophyllum commune*. *International Journal of Computer Science and Information Security*. 2017, 15(1): 395.

16. Silva D. M., Batista L. R., Rezende E. F., Fungaro M. H., Sartori D., Alves E. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section nigri using

polyphasic taxonomy. Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 2011, 42(2): 761–773. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110002000044>.

17. Воробей А. М., Коваль Р. В. Характеристика та практичне значення грибів *Aspergillus foetidus*. // Priority directions of science and technology development. Abstracts of the 2nd International scientific and practical conference. SPC «Sci-conf.com.ua». Kyiv, Ukraine, 2020. – P. 16-20.

18. *Aspergillus foetidus* [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://acir.aphis.usda.gov/s/cird-taxon/a0ut0000002iH1eAAE/aspergillus-foetidus>

19. Пектолад (пектиназа, pectinase) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://enzim.shop/fermenty/pektolad>

20. Целюлаза (Cellulase) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://enzim.shop/fermenty/cellulase>

21. Проторизин [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://enzim.shop/tvarynnyctvo/kormovi-fermenty/protoryzyn>

22. Біологія продуктивності сільськогосподарських тварин : підручник / І.Ю. Горбатенко, М.І. Гиль, М.О. Захаренко та ін. ; за ред. М.І. Гиль ; МНАУ. – Миколаїв : Видавничий дім «Гельветика», 2018. – 600 с [Електронний ресурс].
Режим доступу: https://www.mnau.edu.ua/files/faculty/tvpptsb/kaf_ggtb/hyl/pidr-biol-prod-sg-tvar.pdf

23. Годування поросят до півроку [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ventura.com.ua/articles/feeding-piglets-up-to-six-months/>

24. Кількість корму свині для відгодівлі [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://feedlife.com.ua/ua/info/skolko-korma-nuzhno-svine/>

25. Кількість сільськогосподарських тварин станом на 1 січня 2023 року [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2023/sg/ksgr/ksgr0123.xls>

26. Бомко В.С., Сиваченко Є.В., Сметаніна О. В. Корми і кормові добавки та ефективність їх використання в годівлі тварин: навч. посібник. –

Біла Церква, 2023. – 225с. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://rep.btsau.edu.ua/bitstream/BNAU/8420/1/Korm_dobavky.pdf

27. Yannam S. K., Shetty P. R., Obulum V. S. R. Optimization, purification and characterization of polygalacturonase from mango peel waste produced by *Aspergillus foetidus*. Food Technology and Biotechnology. 2014, 52(3): 359-367.

28. *Aspergillus luchuensis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1069201>

29. Pentose and glucuronate interconversions - *Aspergillus luchuensis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/map=aluc00040&keyword=pectin>

30. Glycerolipid metabolism - *Aspergillus luchuensis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00561>

31. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Aspergillus luchuensis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00010>

32. Starch and sucrose metabolism - *Aspergillus luchuensis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00500>

33. Murtaza A., Irshad M., Asgher M., Naveed M., Anwar Z., Zubair M., Ali A. Computational analysis and applications of pectinolytic enzymes optimized by statistical design using *Shizophyllum commune*. International Journal of Computer Science and Information Security. 2017, 15(1): 395.

34. Citrate cycle (TCA cycle) - *Aspergillus luchuensis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00020>

35. Pentose phosphate pathway - *Aspergillus luchuensis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00030>

36. Histidine metabolism - *Aspergillus luchuensis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00340>

37. Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis - *Aspergillus luchuensis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00400>

38. Alanine, aspartate and glutamate metabolism - *Aspergillus luchuensis*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00250>
39. Arginine biosynthesis - *Aspergillus luchuensis*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00220>
40. Arginine and proline metabolism - *Aspergillus luchuensis*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00330>
41. Lysine biosynthesis - *Aspergillus luchuensis*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00300>
42. Glycine, serine and threonine metabolism - *Aspergillus luchuensis*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00260>
43. Cysteine and methionine metabolism - *Aspergillus luchuensis*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00270>
44. Valine, leucine and isoleucine biosynthesis - *Aspergillus luchuensis*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kegg.jp/pathway/aluc00290>
45. Angumeenal A. R., Venkappayya D. An overview of citric acid production. *LWT-Food Science and Technology*. 2013, 50(2): 367-370. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.016>
46. Bhatia S., Singh A., Batra N., Singh J. Microbial production and biotechnological applications of α -galactosidase. *International journal of biological macromolecules*. 2020, 150: 1294-1313. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.140>
47. Nopparat C., Jatupornpipat M., Rittiboon A. Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicus* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. *Agriculture and Natural Resources*. 2009, 43(5): 172-181.
48. Hao M. J., Wu D., Xu Y., Tao X. M., Li N., Yu X. W. A Novel Endo-Polygalacturonase from *Penicillium rolsii* with Prebiotics Production Potential: Cloning, Characterization and Application. *Foods*. 2022, 11(21): 3469. <https://doi.org/10.3390/foods11213469>

49. Kalunke R. M., Tundo S., Benedetti M., Cervone F., De Lorenzo G., D'Ovidio R. An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. *Frontiers in plant science*. 2015, 6: 146. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00146>

50. Roy S., Das T. K. Effect of biosynthesized silver nanoparticles on the growth and some biochemical parameters of *Aspergillus foetidus*. *Journal of environmental chemical engineering*. 2016, 4(2): 1574-1583. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.02.010>

51. Souza P. M., Werneck G., Aliakbarian B., Siqueira F., Ferreira Filho E. X., Perego P., et al. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*. 2017, 109: 1103-1110. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.055>

52. Cunha L., Martarello R., Souza P. M. D., Freitas M. M. D., Barros K. V. G., Ferreira Filho E. X., et al. Optimization of xylanase production from *Aspergillus foetidus* in soybean residue. *Enzyme research*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6597017>

53. Li Q., Al Loman A., Callow N. V., Islam S. M., Ju L. K. Leveraging pH profiles to direct enzyme production (cellulase, xylanase, polygalacturonase, pectinase, α -galactosidase, and invertase) by *Aspergillus foetidus*. *Biochemical Engineering Journal*. 2018, 137: 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.008>

54. 10000L-25000L Large Industrial Production Fermenter. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.bioreactor-fermenter.com/products/pilot-production-bioreactor/10000l-25000l-large-industrial-production-fermenter>

55. 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.

56. Перекис водню 35% дезінфекція поверхонь стерилізація медичних інструментів, відбілювання білизни. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://xn--80aaolbmrsqie.xn--j1amh.ua/p660537251-perekis-vodoroda-dezinfektsiya.html>

57. Хлорамін Б. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/item-hloramin-b-2>

58. Біомой ® - передстерилізаційний засіб. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://farmakos.ua/ua/bimoi.html>

59. Новохлор-екстра/Інтердез. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/novohlor-ekstra>

60. COSA™ CIP 90. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ecolab.com/offerings/cosa-alkaline-cleaners/cosa-cip-90>

61. Перекачування азотної кислоти і каустичної соди. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tapflo.ua/ua/example-cases-2/perekachivanie-azotnoj-kisloty-i-kausticheskoy-sody>

62. Розчин для антисептики та гігієни рук, SterilliumClassicPure,(СтериліумКласікПур),5л. BODE CHEMIE. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vdsstomat.com.ua/product/sterillium-klasik-pur-sterillium-classic-pure-5l/>

63. НЕОСТЕРИЛ М / Baltiachemi. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/antisepticheskoe-sredstvo-neosteril-m-baltiachemi-kiev>

64. Повітрозбірники. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://innovagroup.com.ua/uk/povitrozbirniki/#1511450813682-6345e6ab-98d6>

65. Фільтр кишеньковий прямокутний Турбовент ВКФ 300х150. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://turbovent.com.ua/ua/p1581182406-filtr-karmannyj-pryamougolnyj.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=18561639117&utm_network=x&utm_adposition=&utm_device=c&utm_matchtype=&utm_target=&utm_group=&utm_term=&gclid=CjwKC_AiAy_CcBhBeEiwAcoMRHGZliIruVxFI_2xGkWltTLs6VdFDBqenG_SGWL8E1n3I-l5jPN4qYRoC640QAvD_BwE

66. Компрессор Matari M250B18-1. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://matari.ua/product/matari-m250b18-1>

67. Промислові осушувачі повітря Hankison рефрижераторного типу. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/promyslovi-osushuvachi-povitrya-hankison-refryzheratornogo-typu/>

68. Ресивери ZELKO. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.zelko.ua/vozduhopodgotovka/resivery?gclid=CjwKCAjw49qKBhAoEiwAHQVTo3bIMXMTbTvK7Ytv9QptHJcJ7JPXTFOv9ZlUH1KtZ2kqsVZ5UHSp6xoC4LIQAvD_BwE

69. Нагрівач повітря Вентс НКВ 1000х500-2. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vencon.ua/ua/products/vents-nkv-1000x500-2>

70. Фільтр NanoProtect. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.philips.ua/c-p/FY1114_10/nanoprotect-filter-series-1?origin=7_ua_ru_21fyuacrossbmcc-performmax-pure_google__search_pur_performmax-da&utm_source=google&utm_medium=paidsearch&utm_campaign=21fyuacrossbmcc-performmax-pure&utm_content=pur&gclid=Cj0KCQiAyracBhDoARIsACGFcS4ut2W5KgZWqbEVDLCzowIqFRiovIsnxl1cpB_OwhgB_uATgZUj280aAtc6EALw_wcB&gclid=aw.ds

71. Automatic Stainless Steel Chemical Reactor, Storage Capacity: 800 L [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.indiamart.com/proddetail/automatic-stainless-steel-chemical-reactor-24041001748.html>

72. Відцентровий насос QHS-65-5, AISI 304 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bts.net.ua/ua/pumping-equipment-distillery/mixing-pumps/v-dcentroviy-nasos-qhs-65-5-aisi-304/>

73. Шафа сушильна СП-1130 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://labormarket.com.ua/ua/p1006829325-shkaf-sushilnyj-1130.html>

74. Багатофункціональний електричний подрібнювач ДКУ-350 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p617909880-mnogofunktsionalnyj-elektricheskij-izmelchitel.html>

75. Ваговий дозатор сипучих матеріалів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vis.ua/product/vesovoj-dozator-sypuchih-materialov-proizvoditelnostyu-100-t-ch/>

76. 5000L Stainless Steel Chemical Jacketed Reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://karvil.en.made-in-china.com/product/xBdEFmHPbyYI/China-5000L-Stainless-Steel-Chemical-Jacketed-Reactor.html>

77. ПРЕС-ФИЛЬТР КОЛОМБО 18 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://casta-vinodelov.com/ua/catalog/filtr_pressa_dlya_masla_italiya/7226/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiA4Y-sBhC6ARIsAGXF1g7UB-0bZH2Q0Kj21qCzTCC_OYaQ4PQZbbw084uXqoseHifjdBsLGlaArumEALw_wcB

78. SPF серія, стерильні фільтри в нерж. корпусі, 16 бар. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.remeza.com/catalog/system_compressed/air_filters/spf_series/

79. 10L~1000L GMP Stainless Steel Fermentor/Bioreactor for Lab Factory University [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://shbxbio.en.made-in-china.com/product/mJzRjfExDQWk/China-10L-1000L-GMP-Stainless-Steel-Fermentor-Bioreactor-for-Lab-Factory-University.html>

80. Double Layer Stainless Steel Jacketed Reactor Chemical Vessel Sealed Tank 20L [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ebay.com/itm/334194161506>

81. 10L-50L Stainless Steel Reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.laboao.com/products/crystallization-reactor/10l-50l-stainless-steel-solid-phase-reactor>

82. ДОЗАТОР СИПУЧИХ МАТЕРІАЛІВ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://madeinua.com/ua/product/dozator-sypuchykh-materialiv-1-5-kub-m-78065.html>

83. Stainel steel jacketed reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://files.lab1st.com/documents/Lab1st%20JSR-L%20Series%20Stainless%20Steel%20Jacketed%20Reactor%20Brochure%20V1.220921.pdf>

84. Перистальтичний насос МР-8118.12 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1609971797-peristalticheskij-nasos-811812.html?&primelead=M141>

85. 10000L-25000L Large Industrial Production Fermenter [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.bioreactor-fermenter.com/products/pilot-production-bioreactor/10000l-25000l-large-industrial-production-fermenter>

86. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 252 с.

87. *Aspergillus luchuensis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1069201>

88. Sarvestani H. K., Ghazvini R. D., Hashemi S. J., Rezaie S., Mahmoudi S., Shoar M. G., et al. First molecular report of causative agent of otomycosis due to *Aspergillus luchuensis*. Journal of Wound Care. 2021, 30(Sup9a):XIVi-XIViii. <http://dx.doi.org/10.12968/jowc.2021.30.Sup9a.XIV>

89. *Aspergillus*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/hyphomycetes-conidial-moulds/aspergillus#laboratory-identification>

90. Hamayun M., Hussain A., Iqbal A., Khan S. A., Ahmad A., Gul S., et al. *Aspergillus foetidus* regulated the biochemical characteristics of soybean and

sunflower under heat stress condition: role in sustainability. Sustainability. 2021, 13(13): 7159.<https://doi.org/10.3390/su13137159>.

91. McCready R. M., McComb E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. Analytical chemistry. 1952, 24(12): 1986-1988.<https://doi.org/10.1021/ac60072a033>.

92. Спектрофотометр UNICO 2800 SpectroQuest. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://spectrolab.com.ua/ua/p10615612-spektrofotometr-unico-spectroquest.html>

93. Танащук Л.І. Основизагальноїекології. Лаборатор. практикум: Навч. посіб. – К.: НУХТ, 2005. – 161 с.

94. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Лабор. практикум для студ. напряму 6.051401 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навчання /Уклад.: Л.М. Буценко, В.О.Красінько. – К.: НУХТ, 2011. – 82 с.

95. Чебан Л.М. Загальнабіотехнологія: навчально-методичний посібник. Модуль1. – Чернівці: Чернівецький нац.ун-т, 2017. –116 с.

96. Estimation of Reducing Sugars by the Dinitro Salicylic Acid (DNS) Method. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://biocyclopedia.com/index/biotechnology_methods/biochemistry/estimation_of_reducing_sugars_by_the_dinitro_salicylic_acid_dns_method.php

97. Мельничук, М. Д., Кляченко, О. Л., Бородай, В. В., &Коломієць, Ю. В. (2014). Загальна (промислова) біотехнологія: навчальнийпосібник. Київ: ФОП Корзун Д.Ю. 252 с.

98. ENCEGmbH. (2021). Рамні фільтр-преси. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://oil-filters.ru/frame_filters/

99. Технология лекарств промышленного производства: учебник для студ. высш. учеб. завед.: в 2-х ч. Ч. 2 перевод с укр. / [В. И. Чуешов, Е. В. Гладух, И. В. Сайко и др.]. – Вінниця: Нова Книга, 2014. - 664 с.

100. Закон України «Про управління відходами» № 2320-IX від 10.06.2022 р.